

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

**Caracterização das proteínas 14-3-3 ζ expressas na fase larval de
*Echinococcus granulosus***

Dissertação de Mestrado

Daiani Machado de Vargas

Porto Alegre, junho de 2013

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

**Caracterização das proteínas 14-3-3ζ expressas na fase larval de
*Echinococcus granulosus***

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

Daiani Machado de Vargas

Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Co-orientadora: Dra. Karina Mariante Monteiro

Porto Alegre, junho de 2013

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 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradecimentos

Ao Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela orientação sempre exigente e estimulante, pela amizade e oportunidade de realização deste trabalho.

À Dra. Karina Mariante Monteiro, pela co-orientação, dedicação e grande auxílio.

À aluna de Doutorado Aline Teichmann, pela participação no projeto e auxílio na realização dos experimentos.

Ao Dr. Arnaldo Zaha, pela participação na minha comissão de acompanhamento, além do apoio, incentivo e amizade.

Ao Dr. Charley Christian Staats, pela participação na minha comissão de acompanhamento, disponibilidade e auxílio com as análises de LC-MS/MS.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), pelo suporte técnico nas análises de espectrometria de massas (proposta MAS 13423).

Ao Uniprot-MS (CBIOT) e à técnica Jozi Fernanda Rodrigues Estanislau, pelo suporte nas análises LC-MS/MS.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica das UFRGS (CME-ufrgs) e ao técnico Henrique Beck Biehl, pelo suporte nas análises de imuno-histoquímica.

Aos colegas de laboratório 204, 206, 210, Bruna, Gabriela, Guilherme, Jéssica, João, Karin, Karina L, Kendi, Martín, Sérgio, Tatiana, Poliana, Veridiana e especialmente à “minha IC” Cristine, pela colaboração, apoio e amizade.

Às minhas grandes amigas e colegas de laboratório Caroline e Edileuza, por tornarem nossos anos de convivência tão especiais.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, especialmente à Sílvia Centeno e ao Luciano Saucedo, pelo auxílio e colaboração.

À minha família e ao Marcelo, por todo amor, compreensão, apoio e incentivo.

Índice

Agradecimentos	4
Lista de abreviaturas	7
Lista de figuras	8
Lista de tabelas	9
Resumo	10
Abstract	11
1. Introdução	12
1.1. Principais espécies do gênero <i>Echinococcus</i>	12
1.2. Importância econômica e distribuição geográfica da hidatidose	15
1.3. Avanços nos estudos de <i>E. granulosus</i> e <i>E. multilocularis</i>	17
1.4. Proteínas 14-3-3.....	18
2. Justificativa e Objetivos	22
3. Materiais e Métodos	24
3.1. Cistos hidáticos de <i>E. granulosus</i>	24
3.2. Análises <i>in silico</i> dos genes <i>Eg14-3-3</i> e <i>Em14-3-3</i> e das suas sequências preditas de aminoácidos	24
3.3. Amplificação das sequências codificadoras das proteínas <i>Eg14-3-3ζ2</i> e <i>Eg14-3-3ζ3</i> e clonagem em pGEX-TEV	27
3.4. Expressão e purificação das proteínas recombinantes	29
3.5. Produção de antissoros isoforma-específicos	29
3.6. Immunoblots.....	30
3.7. Imuno-histoquímica	31
3.8. 2DE <i>gel-overlay</i>	32
3.9. <i>Crosslinking</i> e espectrometria de massas	33
4. Resultados	36
4.1. Genes codificadores de proteínas 14-3-3 em <i>E. granulosus</i> e <i>E.</i> <i>multilocularis</i>	36
4.2. Clonagem dos genes <i>Eg14-3-3ζ2</i> e <i>Eg14-3-3ζ3</i> e expressão das proteínas recombinantes correspondentes	42
4.3. Análise da expressão das proteínas <i>Eg14-3-3ζ2</i> e <i>Eg14-3-3ζ3</i> em diferentes componentes do cisto hidático de <i>E. granulosus</i>	45
4.4. Identificação dos ligantes proteicos das proteínas <i>Eg14-3-3ζ2</i> e <i>Eg14-3-</i> <i>3ζ3</i>	49
5. Discussão	56

6. Referências bibliográficas	66
Anexos	74
Anexo I (Tabela A1).	75
Anexo II (Curriculum Vitae resumido)	81

Lista de abreviaturas

cDNA: DNA complementar

CDS: sequência de DNA codificadora

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DNA: ácido dexoxirribonucleico

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

Eg14-3-3: proteínas 14-3-3 de *E. granulosus*

Em14-3-3: proteínas 14-3-3 de *E. multilocularis*

EST: marca de sequência expressa, do inglês *expressed sequence tag*

GST: glutationa-S-transferase

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa: quilodalton(s)

KOG: do inglês *eukaryotic orthologous group*

LB: Luria Bertani

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem

mRNA: RNA mensageiro

MS/MS: espectrometria de massas em tandem

pb: par(es) de bases

PBS: tampão fosfato-salina, do inglês *phosphate-buffered saline*

PCR: reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila

PVDF: fluoreto de polivinilideno

RIL: arginina, isoleucina e leucina

RNA: ácido ribonucleico

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

SAP: fosfatase alcalina de camarão, do inglês *shrimp alkaline phosphatase*

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

SDS: dodecilsulfato de sódio

Sulfo-SBED: sulfosuccinimidil - 2 - [6-(biotinamido) - 2 - (p - azido - benzamídico hexanoamido)] etil-1,3-ditiopropionato

TEV: do inglês, *tobacco etch virus*

Vh: volts-hora

2DE: eletroforese bidimensional

ϵ : épsilon

ζ : zeta

Lista de figuras

Figura 1: Ciclo de vida de <i>E. granulosus</i> e <i>E. multilocularis</i>	14
Figura 2: Representação esquemática do metacestódeo de <i>E. granulosus</i> e <i>E. multilocularis</i>	15
Figura 3: Diagrama representando a estrutura éxon-íntron dos genes 14-3-3 de <i>E. granulosus</i> e <i>E. multilocularis</i> , Eg14-3-3 e Em14-3-3, respectivamente.	38
Figura 4: Alinhamento das sequências de aminoácidos preditas das proteínas de 14-3-3 de <i>E. granulosus</i> (Eg14-3-3) e de <i>E. multilocularis</i> (Em14-3-3)..	39
Figura 5: Análise filogenética das proteínas Eg14-3-3 e Em14-3-3.	42
Figura 6: Análise dos produtos das PCR para amplificação das sequências codificadoras das proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3.	42
Figura 7: Análise dos produtos das PCR para verificação da clonagem das sequências codificadoras da Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 no vetor de expressão pGEX-TEV.	43
Figura 8: Análise da expressão das proteínas Eg14-3-3ζ2 (53 kDa) e Eg14-3-3ζ3 (55 kDa) em fusão com a GST.	44
Figura 9: Purificação das proteínas de fusão Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 por cromatografia de afinidade.	44
Figura 10: Clivagem das proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 em fusão com a GST.	45
Figura 11: Análise da especificidade dos antissoros anti-Eg14-3-3ζ2 e anti-14-3-3ζ3.	45
Figura 12: Análise da expressão das isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 nos diferentes componentes do cisto hidático.	46
Figura 13: Análise do padrão de expressão das proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 em protoescolices de <i>E. granulosus in toto</i>	47
Figura 14: Análise do padrão de expressão das proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 em secções longitudinais de protoescolices de <i>E. granulosus</i>	48
Figura 15: Análise do padrão de expressão das proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 em secções de parede do cisto hidático de <i>E. granulosus</i>	49
Figura 16: Identificação dos ligantes proteicos presentes em de extrato de protoescolices que interagem com as isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3.	50
Figura 17: Análise do efeito do peptídeo inibidor R18 nas interações detectadas por <i>gel-overlay</i>	53

Lista de tabelas

Tabela 1: Proteínas 14-3-3 usadas para construção da árvore filogenética	25
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados.	27
Tabela 3: Estrutura e característica dos genes e proteínas 14-3-3 de <i>E. granulosus</i> e <i>E. multilocularis</i>	37
Tabela 4: Proteínas de protoescólices que interagem com as proteínas Eg14-3-3ζ2 e/ou Eg14-3-3ζ3 identificadas a partir de 2DE <i>gel-overlay</i>	51
Tabela 5: Proteínas de protoescólices que interagem com as proteínas Eg14-3-3ζ2 e/ou Eg14-3-3ζ3 identificadas a partir de experimentos de <i>crosslinking</i> com o reagente Sulfo-SBED.....	54

Resumo

As proteínas 14-3-3 formam uma família altamente conservada, expressas em todos os organismos eucariotos já estudados. Através da interação com seus alvos, as proteínas 14-3-3 participam de importantes processos celulares, como controle do ciclo celular, apoptose, transdução de sinal e diferenciação celular. Neste trabalho, essa família gênica foi estudada em *Echinococcus granulosus* e em *Echinococcus multilocularis*, as espécies de maior importância do gênero *Echinococcus*. *E. granulosus* e *E. multilocularis*, na fase larval, são agentes etiológicos da hidatidose cística e da hidatidose alveolar, respectivamente, zoonoses associadas a grandes prejuízos na área da pecuária e a gastos no tratamento de pacientes humanos. Por meio da análise dos bancos de dados disponíveis e comparação com os dados genômicos, neste estudo, seis potenciais genes codificadores de proteínas 14-3-3 foram identificados para ambas as espécies, sendo denominados *Eg14-3-3* e *Em14-3-3* para *E. granulosus* e *E. multilocularis*, respectivamente. Análises filogenéticas das sequências preditas de aminoácidos codificadas por esses genes demonstram que as proteínas *Eg14-3-3* e *Em14-3-3* retêm características ancestrais, não se agrupando claramente com proteínas ortólogas de outros organismos quanto ao tipo de isoforma (zeta e épsilon), como ocorre, por exemplo, em mamíferos. A fim de caracterizar funcionalmente as proteínas *Eg14-3-3*, o padrão de expressão das isoformas *Eg14-3-3* ζ 2 e *Eg14-3-3* ζ 3 foi avaliado. A identificação dessas isoformas em componentes do metacéstodeo de *E. granulosus* que representam interfaces parasito-hospedeiro sugere a possível participação dessas proteínas em mecanismos de interação com o hospedeiro. Estudos para a identificação dos ligantes protéicos que interagem com as proteínas *Eg14-3-3* ζ 2 e *Eg14-3-3* ζ 3 também foram realizados. Entre os ligantes identificados estão chaperonas, proteínas associadas à conversão de energia, citoesqueleto, e transporte e metabolismo de carboidratos. Essas interações apontam o envolvimento da família proteica 14-3-3 em mecanismos que promovem o estabelecimento e sobrevivência de *E. granulosus*. A caracterização das interações identificadas neste estudo poderá auxiliar na elucidação de aspectos biológicos básicos do parasito, e mecanismos moleculares utilizados para o desenvolvimento e manutenção do metacéstodeo nas vísceras do hospedeiro intermediário por longo período de tempo.

Abstract

The 14-3-3 proteins form a highly conserved family, and have been shown to be actively expressed in all eukaryotic organisms studied so far. Through interaction with their targets, the 14-3-3 proteins participate in some of the major eukaryotic cellular processes, such as cell cycle regulation, apoptosis, signal transduction, and cell differentiation pathways. In the present work, this gene family has been studied in two species of the genus *Echinococcus*, namely *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis*, which, in their larval stage, are the causative agents of the cystic hydatid disease and the alveolar hydatid disease, respectively, two economically relevant zoonotic diseases associated with livestock production losses and human health care expenditures. Through analysis and comparison of available database, and searches in *Echinococcus* sequencing genome data, six candidate genes encoding 14-3-3 proteins were identified in both species, being named *Eg14-3-3* and *Em14-3-3* to *E. granulosus* and *E. multilocularis*, respectively. Interestingly, the phylogenetic analyses of deduced amino acid sequences encoded by these genes showed that *Eg14-3-3* and *Em14-3-3* proteins retain more ancestral characteristics, and do not group clearly with orthologous proteins from other organisms relative to isoform types (zeta and epsilon), as occurs, for example, in mammals. In order to functionally characterize the *Eg14-3-3* proteins, the expression patterns of the *Eg14-3-3* ζ 2 and *Eg14-3-3* ζ 3 isoforms were analyzed. The identification of both isoforms in *E. granulosus* metacestode components, that represent host–parasite interface, suggests a possible participation of these proteins on mechanisms of interaction with the host. Additionally, studies aiming the identification of proteins able to bind to *Eg14-3-3* ζ 2 and *Eg14-3-3* ζ 3 isoforms were carried out. Among the ligands identified, chaperones, proteins associated with energy production and conversion, cytoskeleton and carbohydrate transport and metabolism, were present, suggesting the involvement of 14-3-3 protein family in mechanisms that promote the establishment and survival of *E. granulosus*. Further characterization of the interactions identified in this study can help to elucidate basic biological aspects of these parasites, as well as molecular mechanisms involved in the development and maintenance of hydatid cyst in within intermediate host tissues for long time.

1. Introdução

1.1. Principais espécies do gênero *Echinococcus*

O gênero *Echinococcus* (Filo Platyhelminthes, classe Cestoda) foi descrito por Rudolphi em 1801, e compreende endoparasitos obrigatórios que necessitam de dois hospedeiros mamíferos para completar seu ciclo de vida. Dentro do gênero, *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus multilocularis* são as espécies de maior importância (McManus *et al.*, 2003; Craig *et al.*, 2007), sendo, na fase larval, os agentes etiológicos da hidatidose cística e da hidatidose alveolar, respectivamente, zoonoses associadas a grandes prejuízos na área da pecuária e a gastos no tratamento de pacientes humanos (Moro & Schantz, 2009; Cardona & Carmena, 2013). Análises de DNA mitocondrial têm demonstrado que a espécie *E. granulosus* formalmente conhecida como *Echinococcus granulosus sensu lato* é composta por um complexo de espécies/genótipos com grande variabilidade genética. Pelo menos dez genótipos distintos foram identificados dentro deste complexo (G1-10), dois genótipos característicos de ovinos (G1 e G2), dois genótipos característicos de bovinos (G3 e G5), um genótipo característico de eqüinos (G4), um genótipo de camelídeos (G6), dois genótipos de suínos (G7 e G9) e dois genótipos de cervídeos (G8 e G10), sendo que G1-G3 estão agrupados dentro do genótipo *Echinococcus granulosus sensu stricto* e G5 é considerado outra espécie, *Echinococcus ortleppi* (Tappe *et al.*, 2010; Cardona & Carmena, 2013). Os genótipos *E. granulosus sensu stricto* (G1) e *E. ortleppi* (G5) são endêmicos do sul da América do Sul e principais responsáveis pelos casos de hidatidose na região (de la Rue *et al.*, 2011; Balbinotti *et al.*, 2012). Para *E. multilocularis* estudos indicam que a variabilidade genética parece ser bem mais limitada (McManus *et al.*, 2003; Tappe *et al.*, 2010).

O verme adulto de *E. granulosus* vive no intestino delgado dos hospedeiros definitivos canídeos, principalmente o cão doméstico, é uma pequena tênia com apenas alguns milímetros de comprimento e cuja presença é virtualmente assintomática. A fase larval (metacestódeo ou cisto hidático) do *E. granulosus* se desenvolve nas vísceras dos hospedeiros intermediários, ungulados domésticos e acidentalmente o homem, o desenvolvimento do cisto hidático ocorre

principalmente nos pulmões e fígado, causando a hidatidose cística (Balbinotti *et al.*, 2012; Siracusano *et al.*, 2012a). A infecção com a fase larval de *Echinococcus* é caracterizada por um longo tempo de crescimento do metacésteo nas vísceras do hospedeiro intermediário, sendo que já foram identificados hospedeiros que portavam o metacésteo por várias décadas (Siracusano *et al.*, 2008). Os hospedeiros intermediários infectam-se com o parasito quando ingerem acidentalmente seus ovos, que são liberados no ambiente pelo verme adulto com as fezes dos canídeos. Após serem ingeridos pelos hospedeiros intermediários, os ovos das espécies do gênero *Echinococcus* eclodem no intestino delgado liberando a oncosfera que penetra na parede do intestino e é transportada através do sistema circulatório ou linfático para diferentes órgãos, onde se desenvolve no metacésteo. O ciclo de vida do parasito se completa quando o hospedeiro definitivo se infecta ao ingerir as vísceras dos hospedeiros intermediários contaminados (Figura 1). Para *E. multilocularis*, o ciclo de vida envolve raposas como hospedeiros definitivos e roedores como hospedeiros intermediários no seu ciclo selvagem (Figura 1). No entanto, cães domésticos e gatos podem adquirir o parasito ao ingerirem as vísceras de roedores infectados. A infecção de humanos com a fase larval de *E. multilocularis* geralmente é resultado do contato com cães que se alimentaram de roedores infectados (Moro & Schantz, 2009).

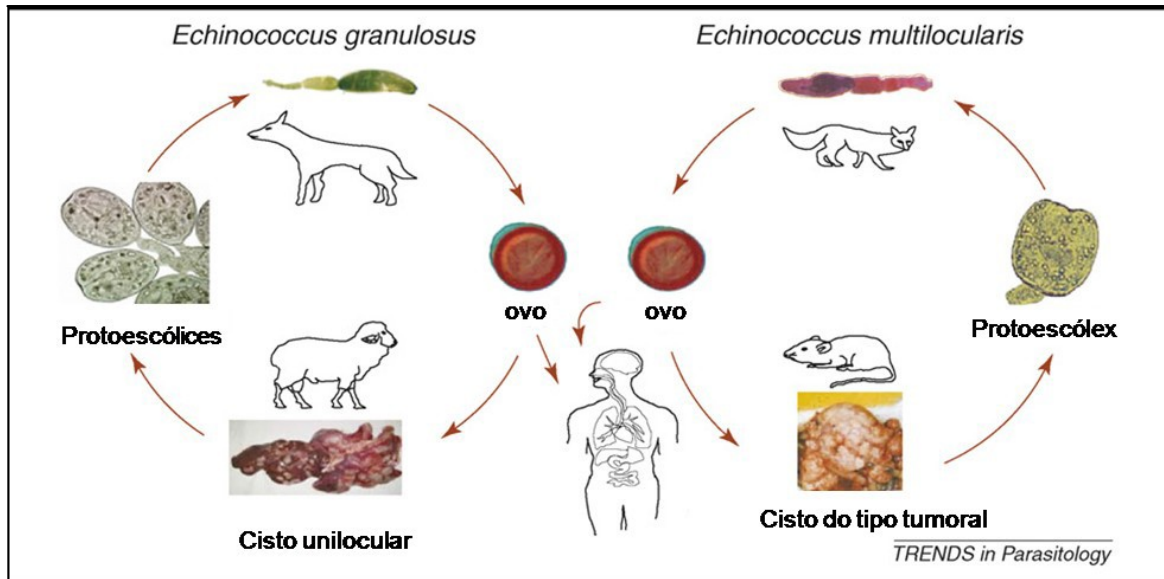


Figura 1: Ciclo de vida de *E. granulosus* e *E. multilocularis*: *E. granulosus* - O verme adulto vive no intestino delgado do hospedeiro definitivo, que são canídeos, principalmente o cão doméstico. Os ovos do verme adulto são liberados no ambiente com as fezes dos canídeos, sendo infectivos para os hospedeiros intermediários (ungulados domésticos e acidentalmente o homem). Após a ingestão, os ovos eclodem e se desenvolvem no cisto hidático. No interior do cisto desenvolvem-se os protoescolices, forma pré-adulta do parasito, que ao serem ingeridos pelos hospedeiros definitivos, evaginam e se fixam a mucosa intestinal diferenciando-se em verme adulto. *E. multilocularis* - o parasito apresenta os mesmos estágios de desenvolvimento que *E. granulosus* no entanto com um ciclo de vida selvagem com raposas, como hospedeiro definitivo, e roedores, como hospedeiros intermediários. Modificado de Zhang & McManus (2008).

O cisto hidático de *E. granulosus* é uma estrutura unilocular, internamente delimitado pela camada germinativa, uma camada celular indiferenciada, proliferativa. Separando a camada germinativa das células e matriz extracelular do hospedeiro está a camada laminar, uma camada acelular, rica em carboidratos, secretada pela camada germinativa. Externamente, o cisto é envolto pela camada adventícia, constituída por tecido conjuntivo do hospedeiro, produto da reação inflamatória em resposta à presença do parasito (Figura 2). O cisto é preenchido internamente pelo líquido hidático, composto por uma mistura de moléculas do parasito e moléculas derivadas do soro do hospedeiro (Monteiro *et al.*, 2010; Aziz *et al.*, 2011). Os protoescolices encontrados no interior do cisto são as formas pré-adultas do verme e infectivos para os hospedeiros definitivos. Os protoescolices se desenvolvem por reprodução assexual a partir das células da camada germinativa, sendo sua morfogênese um processo altamente complexo e dinâmico (Martínez *et al.*, 2005). O metacestódeo de *E. multilocularis* difere do

metacéstódeo de *E. granulosus* por não apresentar limites externos bem definidos, crescendo por brotamentos e originando um labirinto de câmaras e túbulos (Craig *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2011) (Figura 2).

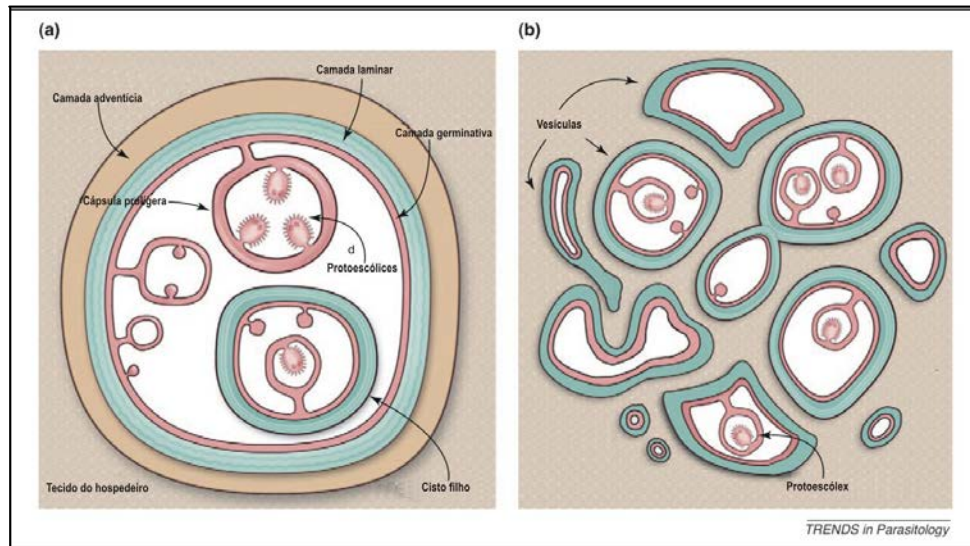


Figura 2: Representação esquemática do metacéstódeo de *E. granulosus* e *E. multilocularis*. O metacéstódeo de *E. granulosus* (a) é uma estrutura unilocular delimitada pela parede do cisto composta internamente pela camada germinativa e externamente pela camada laminar. No interior do cisto ocorre o desenvolvimento de cápsulas prolíferas e protoescólices. Externamente o cisto é envolto pela camada adventícia constituída por tecido conjuntivo do hospedeiro. O cisto é preenchido internamente pelo líquido hidático. Cisto filhos com sua própria parede ocasionalmente formam-se dentro de cistos maiores. O metacéstódeo de *E. multilocularis* (b) apresenta uma organização global semelhante ao metacéstódeo de *E. granulosus*, mas desenvolve-se como um labirinto de pequenas câmaras e não é delimitado externamente pela camada adventícia. Modificado de Díaz *et al.* (2011).

1.2. Importância econômica e distribuição geográfica da hidatidose

A hidatidose cística representa um importante problema de saúde humana e animal em muitas áreas rurais incluindo áreas da América do Sul, da bacia do Mediterrâneo, do Norte e Leste da África, da Ásia Central e Ocidental, da China e da Austrália (Cardona & Carmena, 2013). Dos 2-3 milhões de casos de hidatidose em humanos estimados mundialmente, 95% são de hidatidose cística e apenas 0,1 - 0,3 milhões de casos são associados à hidatidose alveolar, todos restritos ao hemisfério norte (Craig *et al.*, 2007). No Estado do Rio Grande do Sul a região de fronteira com o Uruguai e Argentina é considerada uma zona endêmica para

hidatidose cística. Em 1999, um levantamento sorológico realizado pela Secretaria de Saúde do Estado, em 18 municípios desta área, revelou uma grande variação na taxa de habitantes soro-positivos para essa zoonose, chegando a 89,44 por 100.000 habitantes em alguns municípios (de la Rue, 2008). Ainda segundo a Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, entre 2003 e 2005 foram analisadas 261 amostras de sangue que resultaram em 1 caso da doença em 2003, 2 em 2004 e 12 em 2005, sendo que esse aumento se deve ao maior número de exames enviados pelos municípios ao Laboratório Central do Estado (Lacen). Atualmente, a enfermidade não é de notificação obrigatória no país, então no Rio Grande do Sul, assim como ocorre em muitas outras regiões endêmicas, a prevalência da doença encontra-se subestimada pelas estatísticas oficiais (de la Rue *et al.*, 2011). Uma taxa média de infecção em bovinos entre 12-20% tem sido relatada na Argentina, Brasil e Chile nas últimas décadas (de la Rue *et al.*, 2011; Cardona & Carmena, 2013). No estado do Rio Grande do Sul, dados do Departamento de Defesa Sanitária Animal mostraram que a hidatidose cística em bovinos se manteve estável em 10% entre os animais abatidos no período 2005 a 2010, e dados da Secretaria de Agricultura do Estado mostram que dos 32.203 animais abatidos em janeiro de 2011, 18% estavam infectados com *E. granulosus* (Balbinotti *et al.*, 2012). A infecção do gado com a fase larval patogênica do *E. granulosus* frequentemente resulta em importantes perdas econômicas, associadas à produção animal devido à condenação das vísceras infectadas, diminuição da produção e qualidade de carne, leite e lã, redução da taxa de natalidade e fecundidade e retardo no crescimento dos animais (Torgerson, 2003). As perdas econômicas associadas a essa zoonose para a pecuária estão estimadas em torno de mais de 2 bilhões de dólares ao ano, afetando principalmente regiões onde essa atividade econômica tem maior importância, chegando a representar mais de 0,5% do produto interno bruto de alguns países afetados (Budke *et al.*, 2006; Torgerson & Macpherson, 2011).

A distribuição geográfica de *E. multilocularis* é restrita ao hemisfério norte, sendo as principais áreas endêmicas, Alasca (Ilha de São Lourenço), Europa (Sul da Alemanha e Norte da Suíça) Norte do Japão (Hokkaido) e sudoeste da China (Craig *et al.*, 2007). No entanto, aparentemente atividades antropogênicas estão

influenciando a expansão da distribuição geográfica desse parasito para outras regiões do hemisfério onde anteriormente não havia registros (Davidson *et al.*, 2012). Poucos casos de hidatidose alveolar em humanos têm sido descritos nas últimas décadas, a incidência anual desta doença em regiões endêmicas da Europa foi de 0,1 por 100 000 habitantes entre 1993-2000 e 0,26 por 100 000 habitantes no período de 2001 a 2005 (Moro & Schantz, 2009).

1.3. Avanços nos estudos de *E. granulosus* e *E. multilocularis*

Nas últimas décadas importantes avanços na área genômica de *E. granulosus* e *E. multilocularis* ocorreram, culminando na publicação das sequências completas dos genomas dessas espécies recentemente (Tsai *et al.*, 2013). Análises transcriptômicas, proteômicas e a caracterização de genes e proteínas relevantes na biologia desses parasitos também estão sendo realizadas e compõem esse diversificado conjunto de programas de pesquisa que visam compreender tanto aspectos básicos como aplicados da biologia de *E. granulosus* e *E. multilocularis*. A comparação das sequências genômicas de ambas as espécies revelou que seus genomas são altamente homólogos, com aproximadamente 96% de identidade a nível de sequência de nucleotídeos, nas regiões codificadoras dos genes preditos, e 91% de identidade nas regiões promotoras (Olson *et al.*, 2012). Diferenças na estrutura e sequência dos genes podem ser observadas principalmente no caso de grandes famílias de genes tais como a família das *hsp70* que contém um significativo número de pseudogenes (Koziol *et al.*, 2009).

Apesar da grande disponibilidade de dados atualmente, os mecanismos moleculares associados ao estabelecimento e manutenção do metacéstódeo nas vísceras do hospedeiro intermediário ainda não estão totalmente elucidados. A fim de melhor compreender aspectos básicos da biologia de *E. granulosus*, a identificação de genes e proteína expressos na fase larval patogênica do parasito vem sendo realizada, esses estudos incluem construção de bibliotecas de ESTs, análises transcriptômicas (Fernández *et al.*, 2002; Parkinson *et al.*, 2012), e abordagens proteômicas (Chemale *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2010; Aziz *et al.*,

2011; Virginio *et al.*, 2012). Essas abordagens revelam novos alvos interessantes de estudo, proteínas potencialmente envolvidas nas estratégias de desenvolvimento e sobrevivência do metacestódeo.

1.4. Proteínas 14-3-3

Entre os potenciais alvos de estudo que foram identificados por análises proteômicas dos componentes do cisto hidático de *E. granulosus* estão as proteínas 14-3-3 (Monteiro *et al.*, 2010; Aziz *et al.*, 2011; Virginio *et al.*, 2012). As proteínas 14-3-3 formam uma família altamente conservada, constituída por proteínas acídicas, com massa molecular de aproximadamente 30 kDa. Essas proteínas são expressas em todos os organismos eucarióticos até o momento estudados (Obsil & Obsilova, 2011). O número de isoformas identificadas em diferentes organismos apresenta grande variação; em leveduras, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, apenas duas diferentes isoformas foram identificadas; seres humanos apresentam sete diferentes isoformas, e em *Arabidopsis* já foram identificadas doze isoformas de proteínas 14-3-3 (Bridges & Moorhead, 2005). O alto grau de conservação e a natureza ubíqua destas proteínas refletem sua importância na biologia dos organismos eucarióticos, o que já foi evidenciado por diversos estudos (Fu *et al.*, 2000).

Através das interações com as proteínas alvo, as 14-3-3 regulam importantes processos celulares, como homeostase energética dos organismos, controle do ciclo celular, apoptose, transdução de sinal e diferenciação celular, entre outros (Robinson, 2010; Gardino & Yaffe, 2011; Kleppe *et al.*, 2011; Tzivion *et al.*, 2011). Dentro das células eucarióticas as proteínas 14-3-3 são encontradas principalmente no citoplasma, mas também já foram identificadas na membrana plasmática e em organelas intracelulares, como o núcleo e o aparelho de Golgi (Fu *et al.*, 2000). Em diferentes organismos, de leveduras a mamíferos, já foi demonstrado que as proteínas 14-3-3 são capazes de interagir com mais de 300 proteínas-alvo diferentes, entre os ligantes identificados estão muitas enzimas envolvidas no metabolismo primário, além de moléculas sinalizadoras, fatores de transcrição e proteínas de citoesqueleto (Schoonheim *et al.*, 2007). É estimado

que apenas aproximadamente 25% do total de proteínas que interagem com as proteínas 14-3-3 tenham sido identificados até o momento e, além disso, há grande variação entre os ligantes proteicos identificados por diferentes grupos de pesquisa. Possivelmente, essa variação seja decorrente do material biológico inicial e da isoforma específica estudada, bem como diferenças metodológicas (Bridges & Moorhead, 2005).

As proteínas 14-3-3 foram as primeiras moléculas identificadas que se ligavam especificamente a motivos com resíduos de fosfoserina e fosfotreonina (Obsil & Obsilova, 2011). Dois fosfopeptídeos presentes nas proteínas-alvo foram identificados, esses motivos são RSXpSXP e RXXXpSXP (onde R é uma arginina, S é uma serina, X corresponde a qualquer aminoácido, pS é uma fosfoserina e P é prolina) sendo que fosfotreonina (pT) pode substituir a pS (Muslin *et al.*, 1996; Yaffe *et al.*, 1997). Algumas interações das proteínas 14-3-3, no entanto, são independentes de fosforilação, por exemplo, a ligação de 14-3-3 ao peptídeo inibidor R18, à p190RhoGEF e à exoenzima S, não requer resíduos fosforilados (Petosa *et al.*, 1998; Masters *et al.*, 1999; Henriksson *et al.*, 2002).

Análises de estruturas cristalográficas demonstraram que as proteínas 14-3-3 se organizam como homo ou heterodímeros, os dímeros apresentam uma estrutura rígida e cada unidade que o compõe apresenta um sítio de ligação independente (Rittinger *et al.*, 1999). Ao interagirem com outras proteínas, as 14-3-3 podem promover mudanças conformacionais e/ou oclusão física em seus alvos resultando em alteração da estabilidade e atividade de enzimas ou alterações na localização celular de diversas proteínas. As proteínas 14-3-3 podem ainda atuar como uma estrutura para ancorar duas proteínas distintas no seu interior promovendo assim a interação entre elas (Siles-Lucas & Gottstein, 2003; Obsil & Obsilova, 2011; Bustos, 2012). As regiões responsáveis pela dimerização das proteínas 14-3-3 correspondem às porções carboxi e aminoterminal e apresentam baixo grau de conservação entre as diferentes isoformas (Bridges & Moorhead, 2005). A variabilidade máxima das sequências de aminoácidos nas proteínas 14-3-3 ocorre na extremidade C-terminal, que se apresenta como uma região desorganizada nas análises estruturais disponíveis, sendo sugerido que essa região atua na inibição de interações de uma maneira

isoforma específica (Obsil & Obsilova, 2011). Os resíduos-chave das proteínas 14-3-3 responsáveis pela ligação a outras proteínas são conservados entre as diferentes isoformas. No entanto, é possível que variações em resíduos próximos ou dentro do sítio de ligação possam contribuir para haver diferentes graus de afinidade entre as isoformas e seus diferentes ligantes (Fu *et al.*, 2000).

A redundância ou especificidade de função entre as diferentes isoformas de 14-3-3 é uma questão ainda a ser resolvida. Em leveduras, as duas isoformas de 14-3-3 existentes apresentam sobreposição de funções, evidenciada pela viabilidade dos mutantes com uma única isoforma *versus* o fenótipo letal apresentado por mutantes *knockout* de ambas as isoformas (Gelperin *et al.*, 1995). A redundância de função também é atribuída a isoformas 14-3-3 de mamíferos, porém, com a disponibilidade de mais modelos geneticamente modificados e o uso de refinados métodos de análise se espera que funções isoforma-específicas sejam descobertas (Kleppe *et al.*, 2011). As diferenças espaciais e temporais no padrão de expressão dos genes de 14-3-3 durante o desenvolvimento de plantas e animais sugerem que pode haver papéis específicos para cada isoforma durante os diferentes estágios do desenvolvimento (Siles-Lucas & Gottstein, 2003). O padrão dinâmico de expressão das várias isoformas de 14-3-3 durante a embriogênese e desenvolvimento neuronal de ratos também evidencia a importância de cada isoforma de 14-3-3 na mediação de diferentes processos celulares associados ao desenvolvimento (Watanabe *et al.*, 1993; McConnell *et al.*, 1995). A distribuição e a combinação específica dos heterodímeros das isoformas de 14-3-3 dentro das células também podem ter importante implicação nos efeitos biológicos exercidos por essas proteínas.

As proteínas 14-3-3 também já foram identificadas em diversos parasitos, entre os helmintos, espécies dos gêneros *Schistosoma* e *Echinococcus* são as que tiveram as proteínas 14-3-3 melhor estudadas. Embora, até o momento, nenhuma função adicional tenha sido atribuída às proteínas 14-3-3 em organismos parasitos, diversos estudos sugerem que além dos seus papéis centrais e conservados, as proteínas 14-3-3 possam desempenhar algumas

funções mais especializadas, no contexto do contato íntimo e de longa duração entre parasito e hospedeiro (Siles-Lucas & Gottstein, 2003).

Para *E. granulosus* e *E. multilocularis*, há evidências experimentais preliminares do envolvimento das proteínas 14-3-3 com processos potencialmente relevantes para o estabelecimento e desenvolvimento do parasito (Siles-Lucas *et al.*, 1998; Siles-Lucas *et al.*, 2000; Siles-Lucas *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2004). Siles-Lucas *et al.* (2001), por exemplo analisaram os níveis de expressão dessas proteínas no metacéstódeo, comparando *E. granulosus* e *E. multilocularis*, e observaram que elas eram expressas em níveis relativamente mais elevados na camada germinativa de *E. multilocularis*, sugerindo o envolvimento das proteínas 14-3-3 na proliferação do tipo tumoral dos cistos de *E. multilocularis*. Outro exemplo que sugere a participação das proteínas 14-3-3 em processos associados ao parasitismo é a identificação em *E. granulosus* de uma isoforma de 14-3-3 na glândula rostral do verme adulto (Siles-Lucas *et al.*, 2000), e a identificação de quatro diferentes isoformas de 14-3-3 em produtos de excreção e secreção de protoescólices em cultura (Virginio *et al.*, 2012), sugerindo envolvimento desta família de proteínas em processos secretórios possivelmente associados à fixação do parasito no intestino delgado de hospedeiros definitivos. Estudos *in vitro* com uma isoforma recombinante de 14-3-3 de *E. multilocularis* também demonstraram que esta família de proteínas está associada à redução na produção de óxido nítrico e mRNA da enzima óxido nítrico sintetase em macrófagos de ratos ativados (Andrade *et al.*, 2004), sugerindo o envolvimento dessas proteínas inclusive em mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro. No entanto, proteínas 14-3-3 já foram identificadas como proteínas imunogênicas em experimentos utilizando soro de pacientes infectados com a fase larval de *E. granulosus* (Monteiro *et al.*, 2010). Outros estudos demonstraram também que camundongos vacinados com uma proteína 14-3-3 recombinante de *E. multilocularis*, apresentaram proteção de 97% contra a infecção primária com ovos do parasito por via oral, mas não são protegidos contra infecções secundárias com cistos vesiculares via intraperitoneal, indicando um envolvimento crucial desta molécula nos primeiros estágios de desenvolvimento do parasito e (Siles-Lucas *et al.*, 2003).

2. Justificativa e Objetivos

Em estudos proteômicos do estágio larval patogênico de *E. granulosus*, realizados em nosso laboratório, quatro diferentes isoformas de 14-3-3 (Eg14-3-3) foram identificadas em protoescólices (Monteiro *et al.*, 2010), sendo que diversas evidências apontam para a importância dessa família de proteínas na biologia do parasito. Assim o estudo e caracterização dessa família de proteínas são relevantes para a elucidação de mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento, desenvolvimento e manutenção do estágio larval de *E. granulosus*. Das quatro isoformas de Eg14-3-3 identificadas sendo expressas no metacestódeo, duas isoformas do tipo épsilon (Eg14-3-3 ϵ 1 e Eg14-3-3 ϵ 2) foram clonadas e expressas como proteínas recombinantes pela aluna Aline Teichmann durante seu mestrado, e a caracterização dessas isoformas também esta sendo realizada por ela durante seu projeto de doutorado.

Os objetivos deste trabalho são estudar a família de genes codificadores de proteínas 14-3-3 em *E. granulosus* e *E. multilocularis* e caracterizar as isoformas Eg14-3-3 do tipo zeta (Eg14-3-3 ζ 2 e Eg14-3-3 ζ 3) a fim de determinar suas funções na biologia de *E. granulosus*.

Para isso este trabalho tem como objetivos específicos:

- (i) Analisar os potenciais genes codificadores de proteínas 14-3-3 presentes no genoma de *E. granulosus* (Eg14-3-3) e *E. multilocularis* (Em14-3-3);
- (ii) Confirmar a sequência codificadora e determinar a estrutura éxon-íntron dos genes Eg14-3-3 e Em14-3-3;
- (iii) Analisar a relação filogenética das proteínas 14-3-3 de *E. granulosus* (Eg14-3-3) e de *E. multilocularis* (Em14-3-3) com proteínas 14-3-3 de outros organismos eucariotos;

- (iv) Clonar as sequências codificadoras das isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 e expressar as respectivas proteínas recombinantes;
- (v) Determinar o padrão de expressão das isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 nos diferentes componentes do cisto hidático de *E. granulosus*;
- (vi) Identificar o repertório de proteínas ligantes das isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 em extratos protéicos de protoescolices de *E. granulosus*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cistos hidáticos de *E. granulosus*

Cistos hidáticos bovinos, correspondentes aos genótipos G1 (*E. granulosus sensu stricto*) e G5 (*E. ortleppi*), foram obtidos por coletas rotineiras realizadas em abatedouros da região metropolitana de Porto Alegre. No processamento dos cistos, o líquido hidático foi aspirado assepticamente com o auxílio de seringa e concentrado aproximadamente 5X por liofilização. Os protoescólices foram recuperados por sedimentação e lavados com PBS (27 mM KCl, 20 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 100 mM NaHPO₄, pH 7,4) para remoção de contaminantes. A camada germinativa foi cuidadosamente separada dos tecidos do hospedeiro com auxílio de um *scraper*, e lavada com PBS. Para preparação dos extratos, protoescólices e camada germinativa foram homogeneizados, separadamente, com homogeneizador de vidro em tampão contendo inibidores de proteases e fosfatases (50 mM Tris-Cl pH 7,5, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 1,15 mM Na₂MoO₄). Os homogeneizados obtidos foram centrifugados a 20.000 x g por 30 min a 4°C para remoção da fração insolúvel. Para cada grama de material biológico homogeneizado foram utilizados 4 ml de tampão. Os extratos proteicos foram quantificados utilizando o fluorímetro Qubit (Invitrogen) e analisados por SDS-PAGE 12%. Os extratos protéicos de protoescólices foram produzidos com material originado de diferentes cistos, enquanto amostras de camada germinativa e líquido hidático foram processadas separadamente por cisto.

3.2. Análises *in silico* dos genes *Eg14-3-3* e *Em14-3-3* e das suas sequências preditas de aminoácidos

As sequências codificadoras das proteínas 14-3-3 de *E. granulosus* e *E. multilocularis* (*Eg14-3-3* e *Em14-3-3*, respectivamente), geradas por anotação automática do genoma, foram obtidas do banco de dados públicos GeneDB (www.genedb.org). Dados de EST, gerados a partir do sequenciamento de bibliotecas de cDNA de *E. granulosus* e *E. multilocularis* produzidas a partir de mRNAs de diferentes componentes do metacéstódeo do parasito (camada

germinativa ou protoescólicas) e em diferentes situações fisiológicas (tratamento com pepsina), relacionados às proteínas Eg14-3-3 e Em14-3-3 foram obtidos do banco de dados LophoDB (<http://www.nematodes.org/NeglectedGenomes/Lopho/LophDB.php>). As sequências recuperadas de ambos os bancos de dados foram utilizadas para buscas por gene de 14-3-3 nos genomas de *E. granulosus* e *E. multilocularis* que estão organizados em *contigs/supercontigs*. Para as buscas em ambos os genomas, foi utilizando o servidor *Blast* disponibilizado pelo Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/Echinococcus>).

Para confirmação das sequências codificadoras e determinação da estrutura exón-íntron dos genes de 14-3-3 de *E. granulosus* e *E. multilocularis*, as sequências recuperadas dos *contigs/scaffolds* (2 kb *upstream* e *downstream* das prováveis sequências codificadoras) foram submetidas aos programas de predição de genes GeneMark-E (Besemer & Borodovsky, 2005), Fgenesh (Salamov & Solovyev, 2000) e geneScan (Burge & Karlin, 1998). Os genes resultantes da predição *in silico* foram alinhados com as sequências recuperadas dos bancos de dados LophoDB e GeneDB usando o programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Os alinhamentos foram editados usando o programa GeneDoc Ver. 2.7.000 (Nicholas & Nicholas, 1997).

A tradução das sequências codificadoras e as predições de massa molecular e ponto isoelétrico foram realizadas utilizando ferramentas disponíveis no site ExPASy (<http://expasy.org/>). As sequências de aminoácidos preditas das proteínas Eg14-3-3 e Em14-3-3 foram comparadas com sequências ortólogas de outros eucariotos (Tabela 1). A construção da árvore filogenética foi realizada utilizando o *software* MEGA versão 5 por *Neighbor-Joining* e os cálculos de reamostragem por *bootstrap* foram realizados (100 réplicas) para verificação da robustez da análise filogenética.

Tabela 1: Proteínas 14-3-3 usadas para construção da árvore filogenética

Organismo	Proteína	Número de acesso
<i>Homo sapiens</i>	Hs_zeta/delta	NP_003397
<i>H. sapiens</i>	Hs_gamma	NP_036611
<i>H. sapiens</i>	Hs_beta/alpha	NP_003395

<i>H. sapiens</i>	Hs_theta	NP_006817
<i>H. sapiens</i>	Hs_eta	NP_003396
<i>H. sapiens</i>	Hs_epsilon	NP_006752
<i>H. sapiens</i>	Hs_sigma	NP_006133
<i>Mus musculus</i>	Mm_zeta/delta	NP_035870
<i>M. musculus</i>	Mm_gama	NP_061359
<i>M. musculus</i>	Mm_beta/alpha	NP_061223
<i>M. musculus</i>	Mm_theta	NP_035869
<i>M. musculus</i>	Mm_eta	NP_035868
<i>M. musculus</i>	Mm_zeta/delta2	NP_001240736
<i>M. musculus</i>	Mm_epsilon	NP_033562
<i>M. musculus</i>	Mm_sigma	NP_061224
<i>Bos Taurus</i>	Bt_zeta/delta	NP_777239
<i>B. Taurus</i>	Bt_gamma	NP_777218
<i>B. Taurus</i>	Bt_beta/alpha	NP_777219
<i>B. Taurus</i>	Bt_theta	NP_001071595
<i>B. Taurus</i>	Bt_eta	NP_776917
<i>B. Taurus</i>	Bt_epsilon	NP_776916
<i>B. Taurus</i>	Bt_sigma	NP_001069380
<i>Danio rerio</i>	Dr_beta/alpha-A	NP_001076267
<i>D. rerio</i>	Dr_gamma	NP_998187
<i>D. rerio</i>	Dr_beta/alpha-B	NP_998310
<i>D. rerio</i>	Dr_epsilon	NP_997770
<i>Xenopus Tropicalis</i>	Xt_Zeta	NP_989173
<i>X. Tropicalis</i>	Xt_beta/alpha	NP_001011116
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc_Bmh1p	NP_011104
<i>S. cerevisiae</i>	Sc_Bmh2p	NP_010384
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Ce_FTT-2a	NP_509939
<i>C. elegans</i>	Ce_PAR-5	NP_502235
<i>C. elegans</i>	Ce_FTT-2b	NP_509938
<i>Drosophila melanogaster</i>	Dm_ZetaA	NP_724885
<i>D. melanogaster</i>	Dm_ZetaD	NP_476885
<i>D. melanogaster</i>	Dm_ZetaC	NP_724887
<i>D. melanogaster</i>	Dm_EpsilonA	NP_732309
<i>D. melanogaster</i>	Dm_EpsilonD	NP_732311
<i>D. melanogaster</i>	Dm_EpsilonB	NP_732310
<i>D. melanogaster</i>	Dm_EpsilonC	NP_732312
<i>Schistosoma mansoni</i>	Sm_1	Q26540
<i>S. mansoni</i>	Sm_epsilon2	CCD58944
<i>S. mansoni</i>	Sm_epsilon1	AAF21436
<i>Schistosoma japonicum</i>	Sj_1	AAD56715
<i>S. japonicum</i>	Sj_epsilon	AAC62003

3.3. Amplificação das sequências codificadoras das proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 e clonagem em pGEX-TEV

A sequência codificadora da proteína Eg14-3-3ζ2 foi obtida de uma biblioteca de cDNA de *E. granulosus*, produzidas a partir do mRNA de diferentes componentes do metacéstódeo do parasito (camada germinativa ou protoescolíces) e em diferentes situações fisiológicas disponível em nosso laboratório (Fernández *et al.*, 2002). A extração de DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina (Sambrook & Russel, 2001) e o produto da extração foi submetido à sequenciamento automático de DNA (MegaBACE 1000) para confirmação da sequência.

A sequência codificadora da proteína Eg14-3-3ζ3 foi obtida por RT-PCR. Protoescolíces foram tratados com pepsina a 0,5 mg/ml em meio Hanks' (pH 2,0) por 3 h a 37°C como descrito por Fernández *et al.* (2002). O RNA total foi extraído com TRIzol® (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante e tratado com DNase I livre de RNase (Fermentas). A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando a enzima SuperScript™ III RT e o iniciador GeneRacer™ Oligo dT do *kit* GeneRacer (Invitrogen) para amplificar somente os mRNAs com cauda poli-A. A sequência codificadora da isoforma Eg14-3-3ζ3 foi então amplificada por PCR utilizando o oligonucleotídeo GeneRacer™ 3' Primer e o iniciador gene específico EGC002546 (Tabela 2). Os produtos obtidos foram submetidos à sequenciamento automático de DNA (MegaBACE 1000).

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados (Ta: temperatura de anelamento).

Oligos	Sequências	Ta (°C)
RrecEGC002757	TAT TTT CAG GGA GAA TTC CCG GGT ATG GCA GCT ATT ACC TCT TG	57
FrecEGC02757	GCG AGG CAG ATC GTC AGT CAG TCA TTA GGA GTCGGT CTC ACA TT	57
EGC002546	CCA AAG GCA AGG ACC ACA AGC AG	63
RrecEGC002546	GCG AGG CAG ATC GTC AGT CAG TCA TTC AGC ACC CTC GGT ATT C	50

FrecEGC002546	TAT TTT CAG GGA GAA TTC CCG GGT ATG GCT GAG CTT CTG TCC AC	50
RrecII	TGA CTG ACT GAC GAT CTG CCT CGC GCG TTT CGG TGA TGA CGG TGA AAA CC	60
FrecII	TGG TTC CGC GTG GAT CTG AAA ACC TGT ATT TTC AGG GAG AAT TCC CGG GT	60
pGEX-Alt 3'	CCT GGA TGC GTT CCC AAA A	54
pGEX-Alt 5'	CGA CAC CCG CCA ACA CC	54

As sequências codificadoras completas das proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 foram amplificadas por PCR utilizando iniciadores primários contendo nucleotídeos específicos para amplificação das sequências-alvo e mais 25 nucleotídeos de homologia com o vetor (ver tabela 2 - FrecEGC002757, RrecEGC002757 para Eg14-3-3ζ2 e FrecEGC002546, RrecEGC002546 e para Eg14-3-3ζ3). Os produtos dessas reações foram utilizados como moldes para uma segunda reação de PCR com iniciadores secundários contendo uma região adicional de mais 25 nucleotídeos de homologia com o vetor (ver tabela 2 - FrecII e RrecII) para posterior clonagem.

A clonagem das sequências codificadoras das proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 foi realizada pelo método de recombinação homóloga *in vivo* (Parrish *et al.*, 2004). O vetor de expressão utilizado foi o plasmídeo pGEX-TEV, construído a partir da modificação do vetor de expressão pGEX-4T1 (GE Healthcare), para introdução da sequência codificadora do sítio de clivagem da protease TEV. O vetor pGEX-TEV foi linearizado por clivagem com endonuclease de restrição *Xho*I, defosforilado com a enzima fosfatase alcalina SAP e purificado a partir de gel de agarose utilizando o *kit* de purificação de DNA GFX (GE Healthcare). Para a clonagem, células de *Escherichia coli* da linhagem KC8 quimiocompetentes foram transformadas com 50 ng de vetor linearizado e 50 ng dos produtos de PCR contendo extremidades de homologia com o vetor em 25 µl de tampão KCM 2x (200 mM KCl, 60 mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂). Após choque térmico, as células foram incubadas em 500 µl de meio LB (Sambrook & Russel, 2001) a 37°C por 3 h, e semeadas em meio seletivo com os antibióticos ampicilina

e canamicina nas concentrações finais de 50 µg/ml e 20 µg/ml, respectivamente. A identificação dos plasmídeos recombinantes foi realizada por PCR de colônia utilizando iniciadores pGEX-Alt específicos do vetor (ver tabela 2).

3.4. Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Os plasmídeos recombinantes resultantes da clonagem em vetor de expressão foram utilizados para transformação de células de *E. coli* BL21 Codon Plus RIL (Agilent Genomics). A expressão das proteínas recombinantes em fusão com a GST foi induzida com 0,1 mM de IPTG por 3 h, sob agitação a 37°C. Após a indução, as células bacterianas foram rompidas por sonicação (6 pulsos de 30 s, com amplitude 60) em banho de gelo e o lisado foi centrifugado a 20.000 rpm durante 30 min a 4°C, para separação das frações solúvel e insolúvel. A expressão e solubilidade das proteínas recombinantes foram avaliadas por SDS-PAGE 12%. As proteínas recombinantes em fusão com a GST, presentes na fração solúvel, foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando a resina glutationa-Sepharose 4B (GE Healthcare) e eluídas com 10 mM de glutationa reduzida em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Para a recuperação das proteínas recombinantes livres da GST, as proteínas de fusão foram clivadas com a protease TEV na proporção 0,1 mg de protease/1 mg de proteína de fusão em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 0,5 mM e DTT 1 mM, a 34°C por 16 h. Após a clivagem, foi realizada a troca de tampão para PBS utilizando o sistema de ultrafiltração com poro de 3 kDa (Amicon Ultra, Millipore) conforme instruções do fabricante e as proteínas foram incubadas novamente com a resina glutationa-Sepharose 4B (GE Healthcare) por 30 min. As proteínas recombinantes livres da GST foram quantificadas utilizando o fluorímetro Qubit (Invitrogen), e a eficiência da clivagem foi analisada por SDS-PAGE 12%.

3.5. Produção de antissoros isoforma-específicos

As proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 livres da porção da GST foram utilizadas na imunização de coelhos por via subcutânea para a produção de antissoros. Foram realizadas 3 imunizações de aproximadamente 100 µg de

antígeno em intervalos de 15 dias, seguindo-se a obtenção dos soros uma semana após a última imunização. Os antígenos foram emulsificados em adjuvante completo de Freund (Sigma) na primeira imunização, e em adjuvante incompleto de Freund (Sigma) nas imunizações subsequentes.

A partir dos antissoros obtidos foi realizada a purificação dos anticorpos utilizando a coluna de proteína G (HiTrap™ HP, GE Healthcare) conforme recomendações do fabricante.

3.6. Immunoblots

Extratos proteicos dos principais componentes do cisto hidático de *E. granulosus* (líquido hidático, protoescólices e camada germinativa), aproximadamente 40 µg, foram resolvidos por SDS-PAGE 12% e eletrotransferidos para membrana de PVDF (Hybond™ – ECL™, GE Healthcare) em tampão de transferência (15,6 mM Tris-Cl, 1,2 M glicina, 20% metanol, pH 8,0) a uma voltagem constante de 70 V por 1 h e 30 min. As membranas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado, 0,1% Tween-20 em PBS, pH 7,4) por 1 h, e então incubadas com o antissoro isoforma-específico na diluição de 1:20.000 em tampão de bloqueio, por 1 h e 30 min. Após a incubação, as membranas foram lavadas com PBS - 0,1% de Tween-20 (3 lavagens de 5 min cada) e incubadas com anticorpos anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Sigma-aldrich) na diluição 1:9.000 em tampão de bloqueio por 1 h. As bandas imunorreativas foram visualizadas por quimioluminescência, utilizando os reagentes de detecção ECL Plus (GE Healthcare) e o sistema de imagem VersaDoc (Bio-Rad). As proteínas recombinantes Eg14-3-3ζ2, Eg14-3-3ζ3, Eg14-3-3ε1 e Eg14-3-3ε2, aproximadamente 50 ng, foram utilizadas para avaliar a especificidade dos antissoros. As proteínas recombinantes Eg14-3-3ε1 e Eg14-3-3ε2 foram clonadas e produzidas pela aluna de Doutorado Aline Teichmann (dados não publicados).

Foram realizadas pelo menos 5 réplicas biológicas, sendo que extratos de camada germinativa e líquido hidático são produzidos individualmente por cisto e extratos de protoescólices são produzidos a partir de material de diferentes cistos.

3.7. Imuno-histoquímica

Os experimentos de imuno-histoquímica *in toto* foram realizados conforme descrito por Koziol *et al.* (2010) com modificações. Protoescólices foram fixados em paraformaldeído 4% em PBS por 16-18 h, a 4°C. O material foi lavado com PBS e tratado com proteinase K a 20 µg/ml, em PBS, por 20 min. Após, foi realizado o tratamento com 0,1 M de glicina em PBS por 2X de 5 min e a permeabilização com 0,1% de Triton X-100 em PBS por 2X de 15 min. O bloqueio foi realizado com 1% de BSA, 0,05% de Tween-20 em PBS por 1 h. Para detecção das proteínas-alvo o material foi incubado com os anticorpos isoforma-específicos anti-Eg14-3-3ζ2 ou anti-Eg14-3-3ζ3 purificados nas diluições 1:50 e 1:25, respectivamente, em solução de bloqueio. Foi utilizado o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) na diluição 1:500 em solução de bloqueio, por 1 h. As marcações de citoesqueleto e núcleo foram realizadas com Faloidina Alexa Fluor 594 e DAPI-4,6-diamidino-2-fenilindol (Invitrogen), respectivamente, a 50 nM por 20 min. Entre as incubações do anticorpo primário, secundário e Faloidina Alexa Fluor 594 e DAPI foram realizadas 6 lavagens com 0,05% de Tween-20 em PBS por 20 min. Para a montagem das lâminas foi utilizado o meio de montagem Fluoromount (Sigma) em PBS na proporção 2:1. Para analisar a autofluorescência do material foram montadas lâminas sem a adição dos anticorpos.

Para análises por imuno-histoquímica de seções longitudinais de protoescólices e parede do cisto (camada laminar e camada germinativa), o material foi fixado em 4% de paraformaldeído por 16-18 h. Após a fixação o material foi lavado 3x em PBS, desidratado em série etanólica e incluído em parafina como descrito por Paredes *et al.* (2007). Os blocos foram cortados em seções de 5 µm em micrótomo (Laica) e após reidratação, as seções foram bloqueadas em 1% de BSA, 0,05% de Tween-20 em PBS por 1 h a 37°C. As seções foram incubadas com anticorpo primário anti-Eg14-3-3ζ2 ou anti-Eg14-3-3ζ3 na diluição 1:50 e 1:25, respectivamente, em tampão de bloqueio, em câmara úmida por 1 h a 37°C. O material foi lavado 3X de 5 min com PBS e incubado com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor

488 (Invitrogen) na diluição 1:500 em tampão de bloqueio, em câmara úmida durante 1 h a 37°C. Depois de repetidas lavagens com PBS o material foi incubado com 50 nM de DAPI-4,6'-diamidino-2-fenilindol (Invitrogen). As lâminas foram montadas em meio de montagem Fluoromount (Sigma) em PBS na proporção 2:1. Foram montadas também lâminas controle incubadas com soro pré-imune.

Todas as lâminas confeccionadas foram visualizadas no microscópio confocal Olympus FluoView 1000 no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

3.8. 2DE *gel-overlay*

Experimentos de *gel-overlay* foram realizados como descrito por Tabunoki *et al.* (2008) com algumas modificações, para identificação das proteínas que interagem com as isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 presentes em extratos de protoescólices. Primeiramente, extratos proteicos de protoescólices foram resolvidos por eletroforese bidimensional (2DE), como descrito por Monteiro *et al.* (2010). Assim, 2,5 mg de extrato foram precipitadas com acetona/ ácido tricloroacético 20% por 18 h a -20°C. As proteínas precipitadas foram recuperadas por centrifugação (14.000 rpm, 10 min) e lavadas 5 vezes com acetona gelada. As proteínas foram então solubilizadas com 300 µl de tampão de isoeletrofocalização (7 M uréia, 2 M tiouréia, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 0,2% anfólitos pH 3-10 (Bio-Rad), 0,002% Orange G (Bio-Rad)) por 40 min, a 20°C e após, centrifugadas durante 40 min a 14.000 rpm. As tiras com gradiente imobilizado de pH (pH 3-10, 17 cm, Bio-Rad) foram reidratadas passivamente com a fração solúvel das amostras por aproximadamente 16 h, e a isoeletrofocalização foi realizada no sistema Protean IEF cell system (Bio-Rad) em um total de 60.000 Vh, com voltagem máxima de 10.000 V. Após a isoeletrofocalização, as proteínas presentes nas tiras foram reduzidas e alquiladas em tampão de equilíbrio (6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 375 mM Tris-Cl, pH 8,8) contendo DTT 1% por 15 min e depois por mais 15 min com tampão de equilíbrio contendo iodoacetamida a 4%. Na segunda dimensão, as tiras foram resolvidas em SDS-PAGE 12% utilizando o sistema Protean II XI 2D Cell (Bio-Rad). As proteínas foram

visualizadas por coloração com Coomassie G e as imagens foram obtidas utilizando o *scanner* ImageScanner (GE Healthcare). Após os extratos protéicos serem resolvidos por 2DE, estes foram transferidos para membranas de Nitrocelulose (Hybond™, GE Healthcare). As membranas foram incubadas separadamente com as proteínas Eg14-3-3ζ2 ou Eg14-3-3ζ3 recombinantes a 1 µg/ml marcadas com biotina (ECL Protein Biotinylation Module, GE Healthcare). As interações foram detectadas por incubação com o conjugado estreptavidina-peroxidase (GE Healthcare), seguida de revelação com reagentes ECL (GE Healthcare). As imagens foram adquiridas no sistema VersaDoc (Bio-Rad). Para a identificação das proteínas de interação, as imagens resultantes do experimento de 2DE *gel-overlay* foram analisadas e comparadas com o mapa proteômico de protoescólices produzido por Monteiro *et al.* (2010) utilizando o programa PDQuest 8.0 (Bio-Rad).

Duas réplicas biológicas para cada isoforma foram realizadas. Como experimento controle, foi realizado 2DE *gel-overlay* utilizando a proteína GST marcada com biotina, foi realizado também o experimento controle de *gel-overlay* em eletroforese unidimensional com as proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 biotiniladas, pré-incubadas com 0,016 mM ou 0,1 mM do peptídeo inibidor R18 (Petosa *et al.*, 1998).

3.9. Crosslinking e espectrometria de massas

O *crosslinker* químico heterobifuncional Sulfo-SBED - sulfosuccinimidil-2-[6-(biotinamido)-2-(p-azido-benzamídico hexanoamido) etil-1,3-ditiopropionato (Pierce, Thermo Scientific) foi utilizado como estratégia adicional para identificação das proteínas de interação das isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 presentes em extratos de protoescólices. Para isso, 1 mg das proteínas recombinantes Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 livres de GST foram incubadas separadamente com o reagente Sulfo-SBED em uma proporção molar proteína:reagente de 1:5 por 1 h em gelo, protegido da luz. As reações foram dialisadas por 16-18 h contra PBS para remoção do excesso do *crosslinker* que não se ligou às proteínas. As proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 marcadas com Sulfo-SBED foram incubadas com 10 mg de extratos de protoescólices por 30 min

sob luz UV (365 nm) a uma distância de 5 cm, após a fotoativação, o complexo proteína recombinante – SulfoSBED – proteína de interação é formado. O reagente SulfoSBED contém uma ponte dissulfeto que ao ser rompida, após a formação do complexo, libera a proteína de interação marcada com uma biotina, essa ponte dissulfeto foi clivada com 50 mM de DTT por 1 h a 37°C. As proteínas de interação biotiniladas foram recuperadas por cromatografia de afinidade com resina de avidina monomérica (Pierce). Foi realizado também um experimento controle com a proteína GST ligada ao Sulfo-SBED.

As proteínas de interação recuperadas foram precipitadas com acetona / 20% ácido tricloroacético por 18 h a -20°C e processadas conforme descrito por Monteiro et al. (2010). As proteínas foram ressuspensas em tampão desnaturante (8 M uréia, 25 mM NH₄HCO₃ pH 8,9), reduzidas com DTT (0,02 µg/ 1 µg de proteína) e alquilada com iodoacetamida (0,1 µg/ 1 µg de proteína). As amostras protéicas foram então diluídas com NH₄HCO₃ 25 mM (pH 8,9) para uréia ficar na concentração final de 1 M e digeridas com tripsina (0,01 µg/ 1 µg de proteína) (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega). Após a digestão com tripsina, as amostras foram dessalinizadas utilizando as colunas OASIS[®]HLB (Waters, USA) e analisadas por espectrometria de massas LC-MS/MS no Laboratório Nacional de Biociências – LNBio em Campinas/SP pela aluna de Doutorado Aline Teichmann, proposta número MAS 13423. Os dados de massas resultantes foram analisados utilizando o *software* Mascot versão 2.2.1 (<http://www.matrixscience.com>) em um banco de dados local contendo as sequências deduzidas de aminoácidos a partir da anotação do genoma de *E. granulosus* disponíveis no banco de dados público GeneDB. Os parâmetros utilizados no *software* Mascot para identificação das proteínas foram: máximo de uma perda de clivagem, carbamidometilação como modificação fixa dos resíduos de cisteína, oxidação dos resíduos de metionina como modificação variável e 0,1 unidade de tolerância de massa. A validação das identificações de peptídeos e proteínas baseados nos dados de MS/MS foi realizada utilizando o *software* Scaffold versão 3.6.5 (Proteome Software, Inc. Portland, OR, USA). Foram aceitas as identificações de peptídeos com probabilidade maior que 95%, e a identificação de proteínas com probabilidade maior que 99%, como especificado

pelos algoritmos de predição de peptídeos e proteínas (Keller *et al.*, 2002; Nesvizhskii *et al.*, 2003) e contendo no mínimo 2 peptídeos únicos identificados.

A determinação das categorias funcionais das proteínas de interação identificadas foi baseada em buscas por similaridade de sequência contra proteínas com o KOG (*Eukaryotic Orthologous Group*) anotado (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/grace/kognitor.html>).

4. Resultados

4.1. Genes codificadores de proteínas 14-3-3 em *E. granulosus* e *E. multilocularis*

As buscas nos dados de sequenciamento genômico de *E. granulosus* e *E. multilocularis*, por sequências homólogas a genes de 14-3-3, resultaram na identificação de 6 prováveis genes codificadores de proteínas da família 14-3-3 em ambas as espécies (Tabela 3). Esses genes foram nomeados *Eg14-3-3* e *Em14-3-3* para *E. granulosus* e *E. multilocularis*, respectivamente, seguido de uma letra grega correspondente a isoforma codificada, determinada em trabalhos anteriores, quando for o caso. Nos bancos de dados GeneDB e LophoDB, para *E. granulosus*, estão depositados 6 e 4 sequências de *Eg14-3-3*, respectivamente, correspondentes às sequências genômicas identificadas. Para *E. multilocularis*, estão depositados 5 e 3 sequências de *Em14-3-3* nos bancos GeneDB e LophoDB, respectivamente, e também apresentam correspondência com as sequências genômicas identificadas. À exceção de uma sequência denominada *Em14-3-3.6* que não apresenta qualquer sequência relacionada nos dois bancos analisados.

O alinhamento das sequências depositadas em ambos os bancos de dados, com os genes preditos *in silico* a partir dos *contigs/supercontigs* recuperados dos dados de sequenciamento genômico, foram utilizados para a confirmação das sequências codificadoras completas das proteínas *Eg14-3-3* e *Em14-3-3* e determinação da estrutura éxon-íntron desses genes. Foi possível verificar que a estrutura éxon-íntron desses genes é bem conservada entre os ortólogos, porém uma maior variação na estrutura foi observada entre os genes parálogos de cada espécie (Figura 3). As sequências deduzidas de aminoácidos correspondentes apresentam massa molecular e ponto isoelétrico, em torno de 30 kDa e 5, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Estrutura e característica dos genes e proteínas 14-3-3 de *E. granulosus* e *E. multilocularis*.

Proteína	ID LophoDB	ID Gene DB	Contig ou Scaffold	Comprimento (pb) ^a	CDS ^b	E1	I1	E2	I2	E3	I3	E4	Comprimento (aa) ^c	Massa (Da)	pI
Eg14-3-3ζ2	EGC02757	EgrG_000364000	0012	836	747	330	44	384	45	33	-	-	248	27777.5	4.80
Eg14-3-3ζ3	EGC02546	EgrG_001060100	_0002	840	771	336	29	384	40	51	-	-	256	29412.0	4.77
Eg14-3-3ε1	EGC00123	EgrG_001192500	_0011	849	744	73	37	298	34	335	34	38	247	27945.6	4.89
Eg14-3-3ε2	EGC02229	EgrG_000231300	_0005	871	768	73	38	310	33	344	32	41	255	29217.9	4.97
Eg14-3-3.5	-	EgrG_000789700	_0001	711	636	218	42	42	33	376	-	-	211	24374.7	5.07
Eg14-3-3.6	-	EgrG_000314100	_0048	996	720	76	190	301	86	343	-	-	255	29217.9	4.97
Em14-3-3ζ2	EMC00285	EmW_000364000	_007003	821	738	330	44	388	39	20	-	-	245	27393.3	4.97
Em14-3-3ζ3	EMC00185	EmW_001060100	_007780	839	771	336	29	384	39	51	-	-	256	29414.0	4.78
Em14-3-3ε1	EMC00066	EmW_001192500	_008000	849	750	73	37	298	34	341	28	38	249	28146.8	4.90
Em14-3-3ε2	-	EmW_000231300	_62349	995	888	73	38	310	33	348	36	157	295	33837.8	6.48
Em14-3-3.5	-	EmW_000789700	_007768	711	636	219	42	41	33	376	-	-	211	24290.5	4.98
Em14-3-3.6	-	-	_006945	996	720	76	190	301	86	343	-	-	239	27115.6	5.18

Eg14-3-3 e Em14-3-3 correspondem às isoformas de proteínas 14-3-3 de *E. granulosus* e *E. multilocularis*, respectivamente.

E: éxon; I: íntron;

^a - soma dos éxons e íntrons;

^b - soma dos éxons;

^c - comprimento da sequência preditas de aminoácidos.

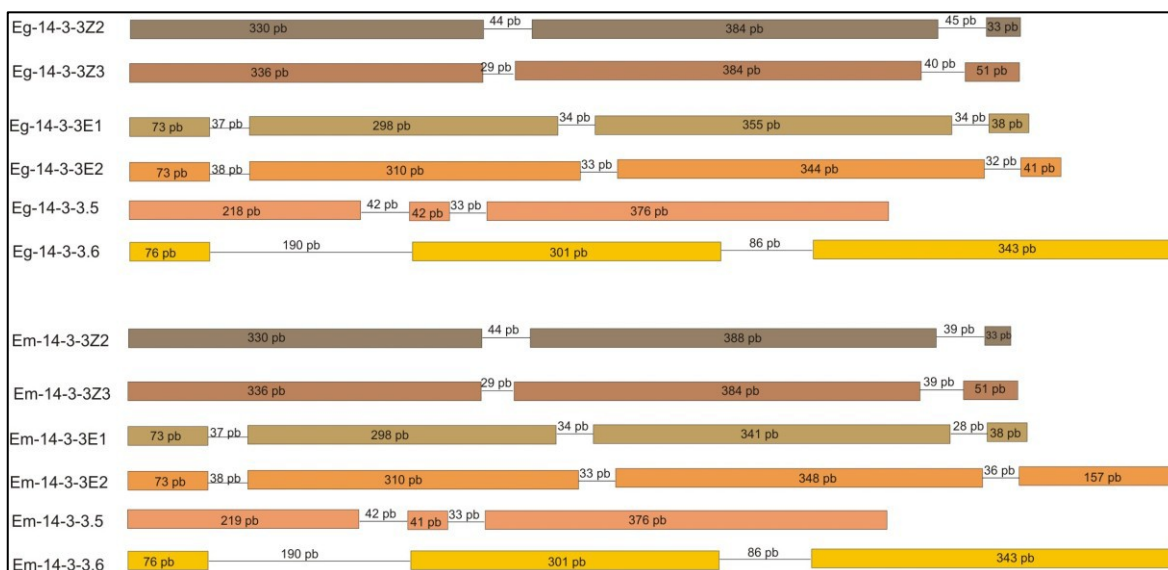


Figura 3: Diagrama representando a estrutura éxon-íntron dos genes 14-3-3 de *E. granulosus* e *E. multilocularis*, Eg14-3-3 e Em14-3-3, respectivamente. Retângulos representam os éxons e linhas representam os íntrons; o comprimento de cada segmento é indicado em pb.

O alinhamento das sequências preditas de aminoácidos também demonstra que há maior identidade/similaridade entre as proteínas ortólogas que entre proteínas parálogas. Assim, identidade/similaridade calculadas entre proteínas ortólogas foram de: 96%/96% para Eg14-3-3ζ2 e Em14-3-3ζ2, 98%/100% para Eg14-3-3ζ3 e Em14-3-3ζ3, 98%/98% para Eg14-3-3ε1 e Em14-3-3ε1, 82%/83% para Eg14-3-3ε2 e Em14-3-3ε2, 97%/98% para Eg14-3-3.5 e Em14-3-3.5 e 98%/99% para Eg14-3-3.6 e Em14-3-3.6. As proteínas parálogas de 14-3-3 de *E. granulosus* e *E. multilocularis* apresentam uma identidade que varia em torno de 25-50% e similaridade em torno de 30-70% (Figura 4). As proteínas Eg14-3-3 e Em14-3-3 também foram alinhadas com proteínas ortólogas de outros eucariotos, apresentando identidade entre 30-50% com todas as proteínas ortólogas analisadas, independentemente da isoforma (Anexo I).

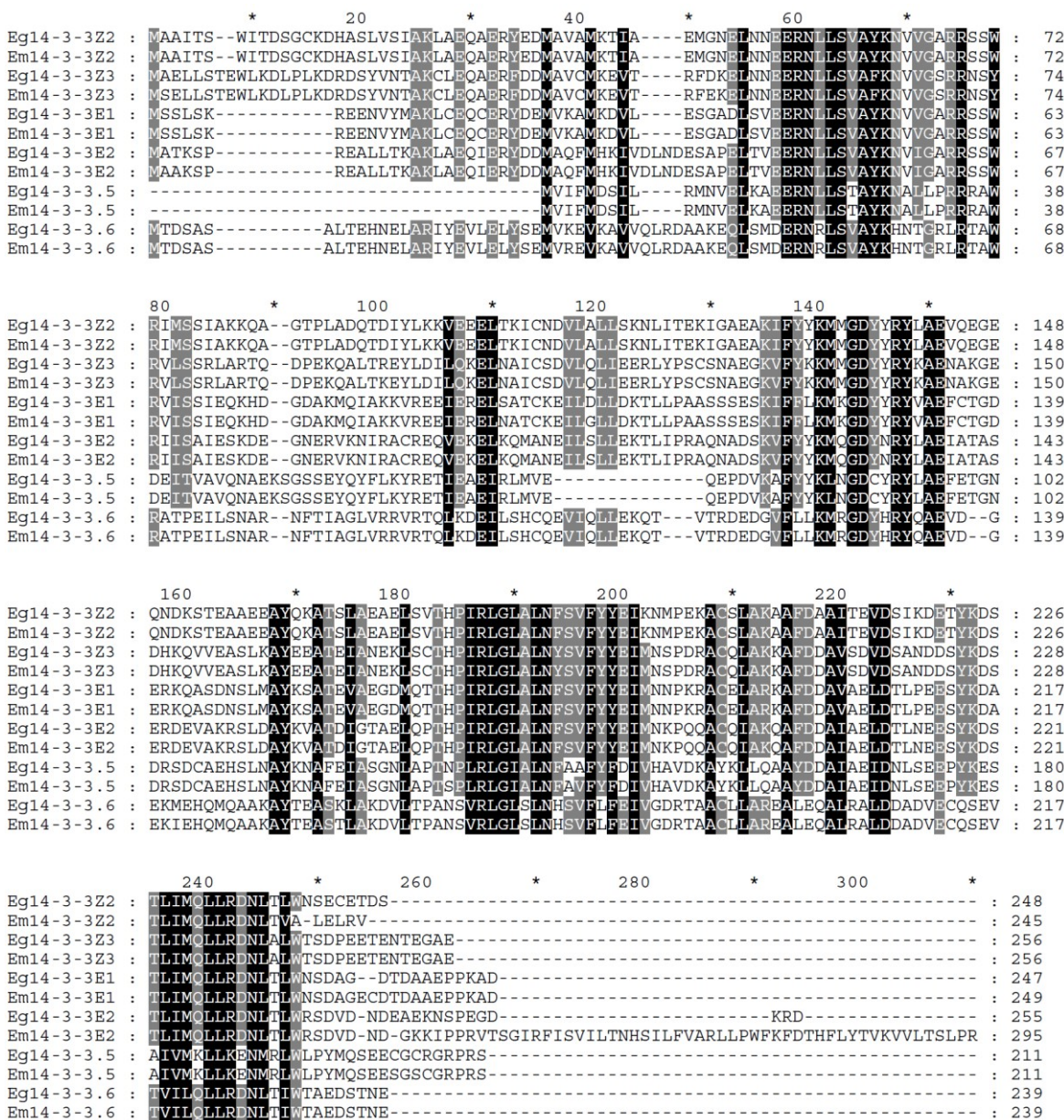


Figura 4: Alinhamento das seqüências de aminoácidos preditas das proteínas de 14-3-3 de *E.granulosus* (Eg14-3-3) e de *E. multilocularis* (Em14-3-3). z correspondem as isoformas zeta (ζ); e correspondem as isoformas epsilon (ϵ).

A análise da relação filogenética das proteínas Eg14-3-3 e Em14-3-3 com proteínas ortólogas de outros organismos eucariotos demonstrou que as proteínas Eg14-3-3 e Em14-3-3 retêm características ancestrais não se agrupando claramente com proteínas ortólogas de outros organismos quanto ao tipo de isoforma. No entanto, as isoformas Eg14-3-3 ζ 2, Em14-3-3 ζ 2, Eg14-3-3 ζ 3 e Em14-3-3 ζ 3 se agrupam com isoformas não épsilon de outros organismos, as

isoformas Eg13-3-3 ϵ 1 e Em14-3-3 ϵ 1 se encontram numa posição intermediária, entre os grupos de proteínas épsilon e não-épsilon, e as isoformas Eg14-3-3 ϵ 2, Em14-3-3 ϵ 2, parecem ser mais relacionadas com proteínas ortólogas épsilon de outros organismos. Apesar de se distribuírem em nós distintos as proteínas Eg14-3-3 e Em14-3-3 junto com as proteínas 14-3-3 de *S. mansoni* e *S. japonicum* parecem ser filogeneticamente relacionadas, todas se encontrando em uma posição central da árvore filogenética. A exceção são as isoformas Eg14-3-3.5, Em14-3-3.5, Eg14-3-3.6 e Em14-3-3.6 que aparentemente mais divergem de todas as proteínas ortólogas se agrupando em ramos separados na base da árvore. Porém os valores dos cálculos de reamostragem por *bootstrap* em que se baseiam esses resultados são baixo. A classificação das proteínas Eg14-3-3 e Em14-3-3 como zetas ou épsilons também não é clara, no entanto, as isoformas Eg14-3-3 ζ 2, Eg14-3-3 ζ 3, Em14-3-3 ζ 2, Em14-3-3 ζ 3 e Eg14-3-3 ϵ 1, Em14-3-3 ϵ 1 já haviam sido anteriormente assim classificadas (Siles-Lucas *et al.*, 2001; Siles-Lucas & Gottstein, 2003; Nunes *et al.*, 2004; Siles-Lucas *et al.*, 2008) e essa classificação foi mantida neste trabalho para fins de nomenclatura.

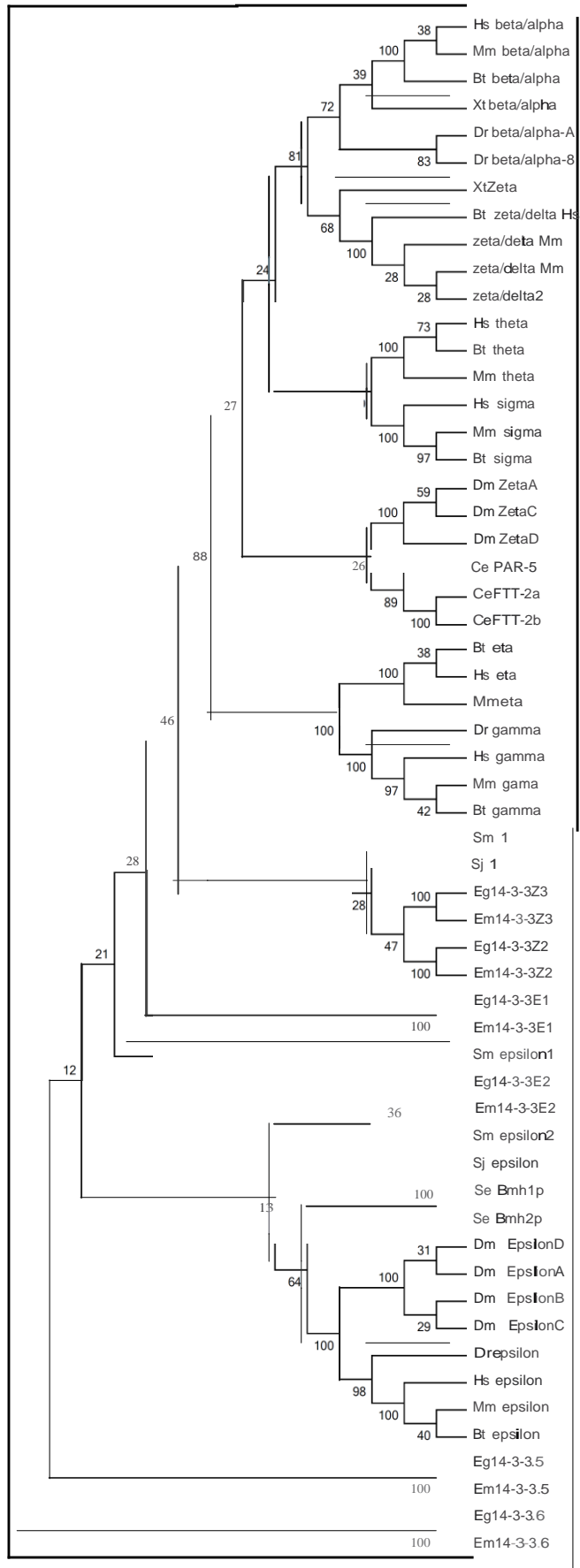


Figura 5: Análise filogenética das proteínas Eg14-3-3 e Em14-3-3. Árvore filogenética gerada por *Neighbor joining* usando as sequências de aminoácidos preditas das proteínas 14-3-3 de *E. granulosus* (Eg14-3-3) e de *E. multilocularis* (Em14-3-3) e proteínas ortólogas de *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Bos taurus* (Bt), *Danio rerio* (Dr), *Xenopus tropicalis* (Xt), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Schistosoma mansoni* (Sm) e *Schistosoma japonicum* (Sj). Cálculos de reamostragem por *bootstrap* foram realizados com 100 réplicas.

4.2. Clonagem dos genes *Eg14-3-3ζ2* e *Eg14-3-3ζ3* e expressão das proteínas recombinantes correspondentes

As sequências codificadoras das proteínas *Eg14-3-3ζ2* e *Eg14-3-3ζ3*, foram amplificadas por PCR, utilizando iniciadores primários específicos, gerando produtos de 797 pb (Figura 6A) e 821 pb (Figura 6B), respectivamente. Os produtos das PCR iniciais foram então utilizados como molde para uma segunda PCR utilizando iniciadores secundários para a adição de mais 25 nucleotídeos de homologia com o vetor em cada extremidade das sequências codificadoras das proteínas de interesse, gerando fragmentos de 847 pb, para *Eg14-3-3ζ2* (Figura 6A), e 871 pb, para *Eg14-3-3ζ3* (Figura 6B), que foram utilizados para clonagem por recombinação *in vivo*.

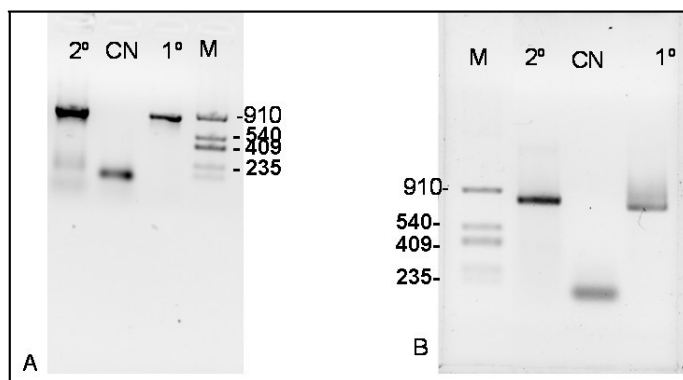


Figura 6: Análise dos produtos das PCR para amplificação das sequências codificadoras das proteínas *Eg14-3-3ζ2* (A) e *Eg14-3-3ζ3* (B). As PCR com iniciadores primários (1°) geraram produtos de 797pb e 821 pb para *Eg14-3-3ζ2* e *Eg14-3-3ζ3*, respectivamente; e com iniciadores secundários (2°) geraram produtos de 847pb e 871 pb para *Eg14-3-3ζ2* e *Eg14-3-3ζ3*, respectivamente; CN- controle negativo das reações (sem adição de DNA); M- marcador de tamanho dos fragmentos de DNA.

A clonagem por recombinação homóloga resultou em duas colônias recombinantes para a sequência Eg14-3-3ζ2 (Figura 7A) e uma colônia recombinante para Eg14-3-3ζ3 (Figura 7B), confirmadas por PCR. As amplificações dos plasmídeos recombinantes geraram produtos de 1143 pb, para Eg14-3-3ζ2, e 1167 pb, para Eg14-3-3ζ3, enquanto as amplificações a partir de plasmídeos parentais (não recombinantes) geraram produtos de 396 pb.

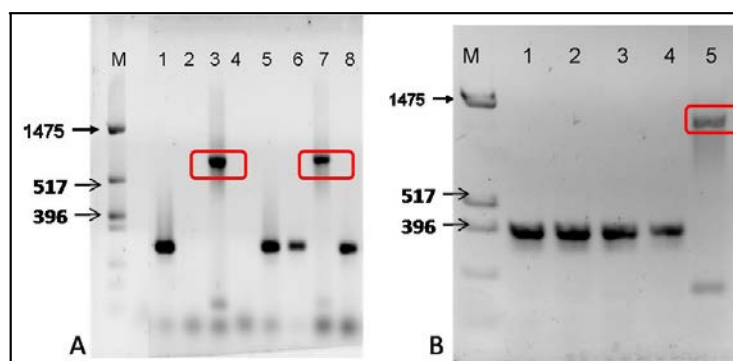


Figura 7: Análise dos produtos das PCR para verificação da clonagem das sequências codificadoras da Eg14-3-3ζ2 (A) e Eg14-3-3ζ3 (B) no vetor de expressão pGEX-TEV. Produtos da amplificação de plasmídeos recombinantes nas canaletas 3 e 7 (A) com 1143 pb e na canaleta 5 (B) com 1167 pb (destacados com um retângulo) indicando a clonagem das sequências codificadoras das proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3, respectivamente, no vetor de expressão pGEX-TEV. Produtos de 396 pb nas demais canaletas foram gerados por plasmídeos parentais (não recombinantes). M- Marcador de tamanho dos fragmentos de DNA em pb.

Para cada isoforma, um clone recombinante foi utilizado para expressão da proteínas-alvo em fusão com a GST em células de *E. coli* BL21 codon Plus RIL. As proteínas de fusão Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 foram observadas principalmente na fração solúvel e apresentaram massas moleculares em torno de 53 kDa e 55 kDa, respectivamente (Figura 8).

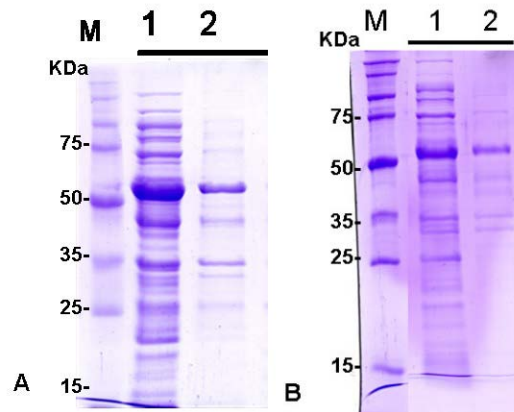


Figura 8: Análise da expressão das proteínas Eg14-3-3ζ2 (53 kDa) (A) e Eg14-3-3ζ3 (55 kDa) (B) em fusão com a GST. Extrato de cultura de células de *E. coli* BL21 Codon Plus RIL, após indução com IPTG, rompimento e centrifugação para separação das frações solúveis e insolúveis. 1- Frações solúveis; 2- Frações insolúveis. M- marcador de massa molecular (kDa).

Alíquotas das eluições, recolhidas das colunas de cromatografia com as proteínas de fusão, foram resolvidas por SDS-PAGE 12%, para análise do rendimento da expressão das proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 em fusão com a GST (Figura 9). O rendimento obtido foi de aproximadamente 15 mg de proteína de fusão por litro de cultura para cada uma das isoformas.

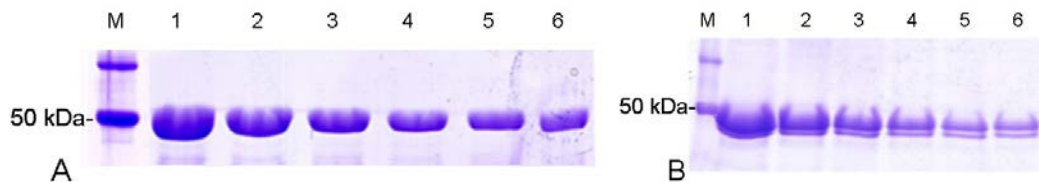


Figura 9: Purificação das proteínas de fusão Eg14-3-3ζ2 (A) e Eg14-3-3ζ3 (B) por cromatografia de afinidade. 1-6 Alíquotas de 5 µl de eluições de 1 ml contendo as proteínas de fusão. M- marcador de massa molecular (kDa).

A eficiência da clivagem das proteínas de fusão com a protease TEV para liberação da proteína recombinante da GST foi avaliada por SDS-PAGE 12% (Figura 10). A clivagem mostrou-se eficiente, sendo estimado que mais de 80% das proteínas de fusão foram clivadas, com rendimento de aproximadamente 7mg de proteína recombinante livre de GST para cada uma das isoformas.

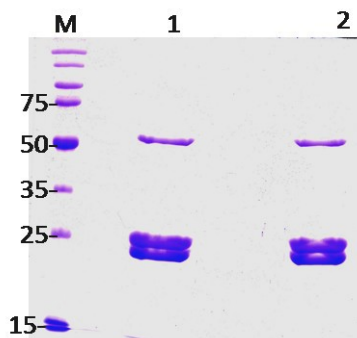


Figura 10: Clivagem das proteínas Eg14-3-3ζ2 (1) e Eg14-3-3ζ3 (2) em fusão com a GST. A proteína recombinante Eg14-3-3ζ2 livre da GST apresenta massa molecular de ~27 kDa (1) e a Eg14-3-3ζ3 massa molecular de ~29 kDa. A GST apresenta massa molecular de ~26 kDa. Em ambas as clivagens é possível observar ainda a presença da proteína de fusão com massa molecular de 53 kDa e 55 kDa para Eg14-3-3ζ2 (1) e Eg14-3-3ζ3 (2), respectivamente. M-marcador de massa molecular (kDa).

4.3. Análise da expressão das proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 em diferentes componentes do cisto hidático de *E. granulosus*

Primeiramente, foi analisado por imunoblot a especificidade dos antissoros anti-Eg14-3-3ζ2 e anti-Eg14-3-3ζ3 contra as proteínas recombinantes Eg14-3-3ζ2, Eg14-3-3ζ3, Eg14-3-3ε1 e Eg14-3-3ε2 e reatividade cruzada não foi observada (Figura 11).

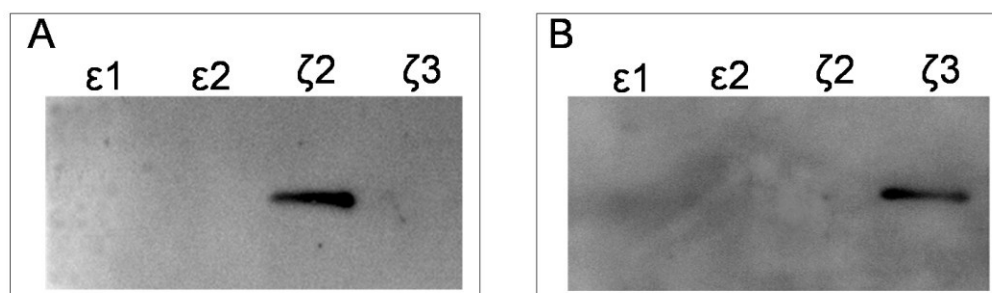


Figura 11: Análise da especificidade dos antissoros anti-Eg14-3-3ζ2 (A) e anti-14-3-3ζ3 (B). Em análises por imunoblot não foi observada reatividade cruzada entre o antissoro anti-Eg14-3-3ζ2 (A) contra as proteínas recombinantes Eg14-3-3ε1, Eg14-3-3ε2, e Eg14-3-3ζ3 (primeira, segunda e quarta canaleta, respectivamente) e nem entre o antissoro anti-14-3-3ζ3 (B) contra as proteínas recombinantes Eg14-3-3ε1, Eg14-3-3ε2, e Eg14-3-3ζ2 (primeira, segunda e terceira canaleta, respectivamente).

Utilizando estratégias metodológicas distintas e complementares de imunoblot e imuno-histoquímica foi possível confirmar a presença das isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 nativas em diferentes componentes do cisto. Por imunoblot foi detectada a presença das isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 em extratos de protoescólices e camada germinativa. Também foi identificada a presença da isoforma Eg14-3-3ζ2 em líquido hidático, porém a isoforma Eg14-3-3ζ3 não foi detectada neste componente do cisto (Figura 12).

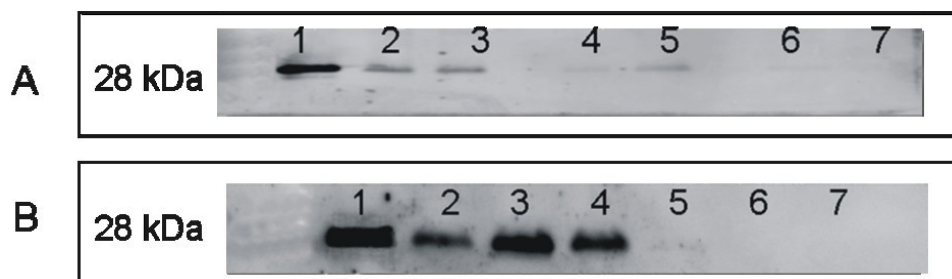


Figura 12: Análise da expressão das isoformas Eg14-3-3ζ2 (A) e Eg14-3-3ζ3 (B) nos diferentes componentes do cisto hidático. Extratos proteicos de protoescólices (2 e 3), camada germinativa (4 e 5) e líquido hidático (6 e 7) foram analisados por imunoblot utilizando anticorpos isoforma específicos. Em 1 Eg14-3-3ζ2 (A) e Eg14-3-3ζ3 (B) recombinante.

Os resultados obtidos por imuno-histoquímica revelaram a presença das isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 amplamente distribuídas em protoescólices, tanto nas análises *in toto* (Figura 13 B-2 e B-3) quanto em cortes (Figura 14 B-2 e B-3). Ambas as isoformas também foram detectadas na parede do cisto, contudo a isoforma Eg14-3-3ζ3 parece estar mais associada à camada laminar do cisto hidático (Figura 15 B-3), enquanto a isoforma Eg14-3-3ζ2 parece estar mais associada à camada germinativa (Figura 15 B-2). As isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 apresentaram uma localização citoplasmática tanto em protoescólices quanto na parede do cisto. Foram analisados protoescólices e parede de quatro e dois cistos diferentes, respectivamente.

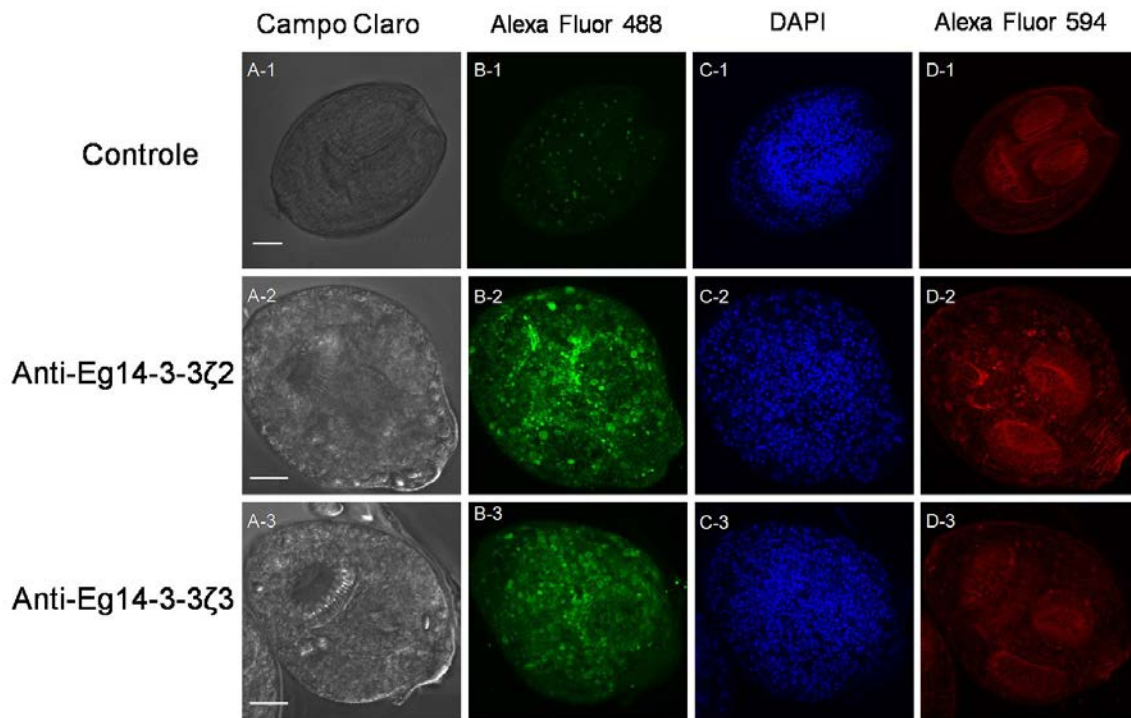


Figura 13: Análise do padrão de expressão das proteínas Eg14-3-3ζ2 (linha 2) e Eg14-3-3ζ3 (linha 3) em protoescolícos de *E. granulosus in toto*. Coluna A: contraste de fase; coluna B: detecção das proteínas Eg14-3-3ζ2 ou Eg14-3-3ζ3 com anticorpos isoforma específicos e anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 488; coluna C: núcleos marcados com DAPI; coluna D: citoesqueleto marcado com faloidina conjugada com fluoróforo Alexa Fluor 594. Controle (linha 1) para avaliação de autofluorescência sem anticorpos. Barra de escala 30 μm.

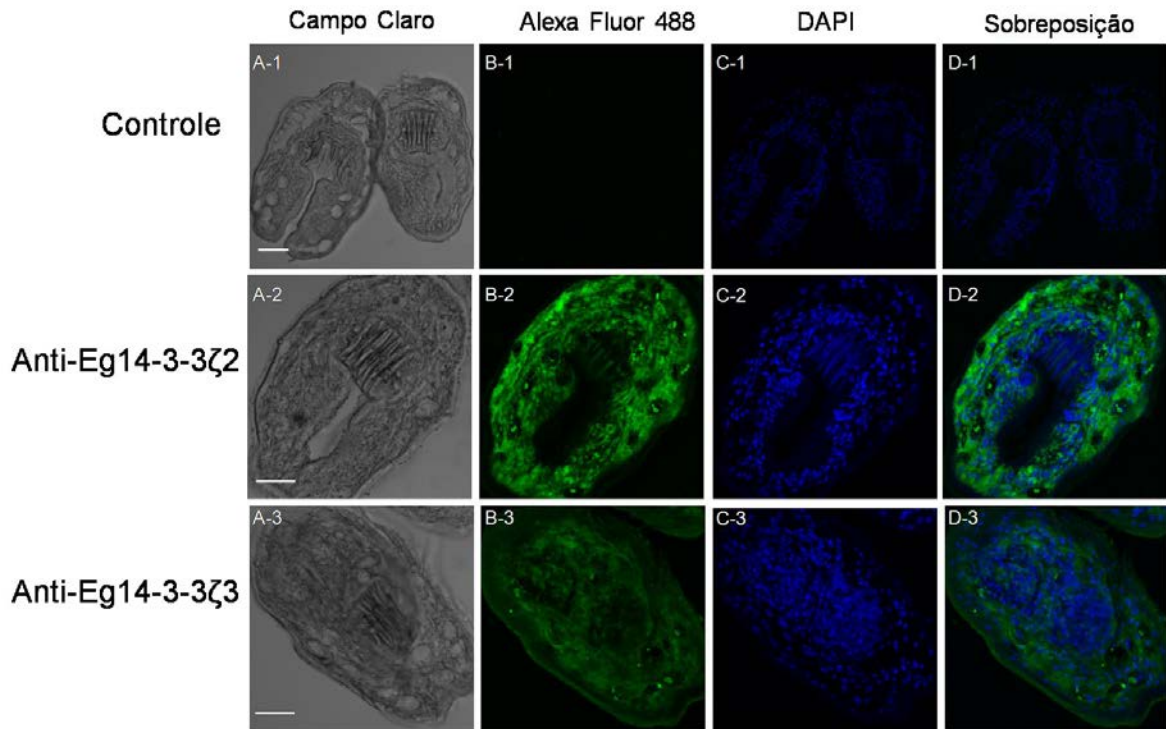


Figura 14: Análise do padrão de expressão das proteínas Eg14-3-3ζ2 (linha 2) e Eg14-3-3ζ3 (linha 3) em secções longitudinais de protoescolices de *E. granulosus*. Coluna A: contraste de fase; coluna B: detecção das proteínas Eg14-3-3ζ2 ou Eg14-3-3ζ3 com anticorpos isoforma específicos e anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 488; coluna C: núcleos marcados com DAPI; coluna D: sobreposição das marcações de núcleos e proteínas Eg14-3-3ζ2 ou Eg14-3-3ζ3. Controle (linha 1): secções de protoescolices incubadas com soro pré-imune. Barra de escala 30 μm.

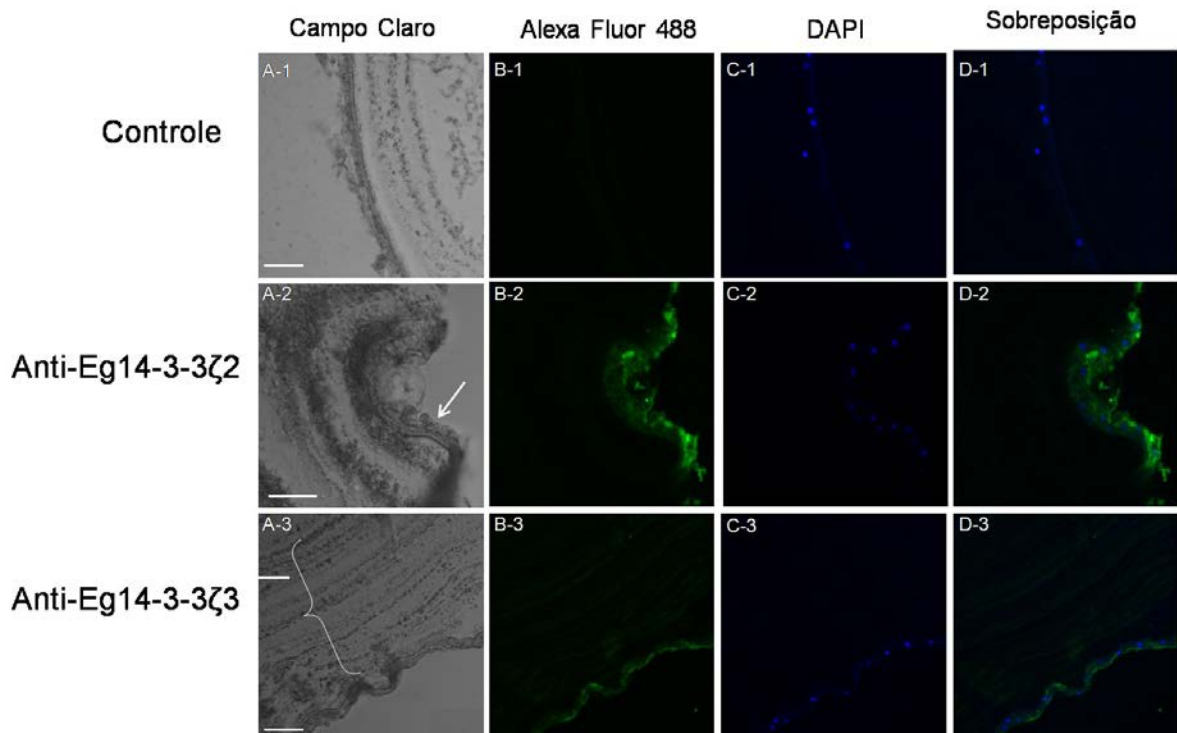


Figura 15: Análise do padrão de expressão das proteínas Eg14-3-3ζ2 (linha 2) e Eg14-3-3ζ3 (linha 3) em seções de parede do cisto hidático de *E. granulosus*. Coluna A: contraste de fase; coluna B: detecção das proteínas Eg14-3-3ζ2 ou Eg14-3-3ζ3 com anticorpos isoforma específicos e anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 488; coluna C: núcleos marcados com DAPI; coluna D: sobreposição das marcações de núcleos e proteínas Eg14-3-3ζ2 ou Eg14-3-3ζ3. Controle (linha 1): seções de protoescólices incubadas com soro pré-imune. Seta (A-2) indicando a camada germinativa; chave (A-3) indicando a camada laminar. Barra de escala 30 μm.

4.4. Identificação dos ligantes proteicos das proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3

Dois ensaios de interação distintos foram realizados para a identificação de ligantes proteicos que interagem com as proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3. Em ambos os experimentos foi possível constatar que estas isoformas interagem com um amplo repertório de proteínas-alvo presentes nos extratos de protoescólices.

A partir dos experimentos de 2DE *gel-overlay* diversos *spots* reativos foram visualizados, dos quais foi possível a identificação de 49, baseado no mapa proteômico de protoescólices produzido por Monteiro *et al.* (2010) (Figura 16 A e B). Os 49 *spots* identificados correspondentes a 20 proteínas diferentes, sendo que destas 12 interagem com ambas as isoformas, 3 interagem apenas com a

isoforma Eg14-3-3ζ2 e 5 interagem apenas com a isoforma Eg14-3-3ζ3 (Tabela 4).

No experimento controle utilizando a proteína GST marcada com biotina foi identificado um *spot* reativo que segundo o mapa proteômico de protoescólices corresponde à proteína GST de *E. granulosus* (Figura 16 D).

No experimento controle realizado com as proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 pré-incubadas com o peptídeo R18 foi possível observar uma redução de sinal, que representa menos interações entre as proteínas de interesse e proteínas presentes em extratos de protoescólices (Figura 17).

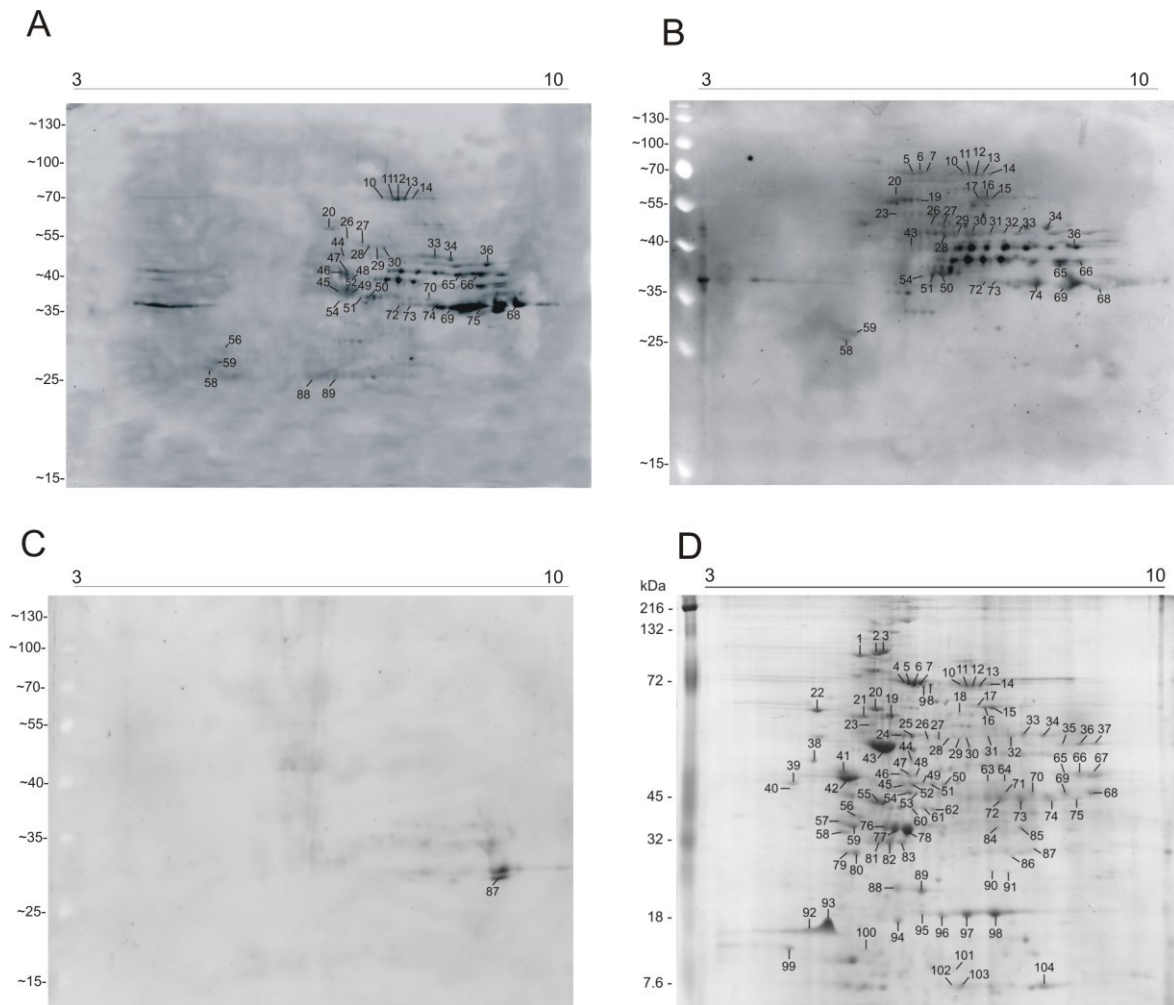


Figura 16: Identificação dos ligantes proteicos presentes em de extrato de protoescólices que interagem com as isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3. Ensaio de 2DE *gel-overlay* da proteína Eg14-3-3ζ2 (A), Eg14-3-3ζ3 (B) e GST (C); Mapa proteômico de protoescólices de *E. granulosus* (Monteiro et al., 2010) (D). Todos os *spots* identificados nos ensaios de 2DE *gel-overlay* estão numerados de acordo com o mapa proteômico. 2DE de extratos de protoescólices resolvidos em

pH de 3-10 na primeira dimensão seguido por segunda dimensão em SDS-PAGE 12%. Marcadores de massa molecular (kDa) indicados à esquerda.

Tabela 4: Proteínas de protoescólicas que interagem com as proteínas Eg14-3-3 ζ 2 e/ou Eg14-3-3 ζ 3 identificadas a partir de 2DE *gel-overlay*.

Spot ^a	Proteína	ID Lopho DB ^a ou nº acesso	Interação com Eg14-3-3 ζ 2	Interação com Eg14-3-3 ζ 3	Categoria Funcional ^b
5	HSP70	EGC00004 (contig 1)		x	O
6	HSP70	EGC00004 (contig 1)		x	O
7	HSP70	EGC00004 (contig 1)		x	O
10	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	EGC03250 (contig 1)	x	x	C
11	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	EGC03250 (contig 1)	x	x	C
12	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	EGC03250 (contig 1)	x	x	C
13	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	EGC03250 (contig 1)	x	x	C
14	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	EGC03250 (contig 1)	x	x	C
15	Glicose-fosfato-isomerase putativa	Q56JA3	x	x	G
16	Glicose-fosfato-isomerase putativa	Q56JA3	x	x	G
17	Glicose-fosfato-isomerase putativa	Q56JA3	x		G
19	Proteína MVP putativa	Q56J97	x	x	sem KOG
20	Proteína MVP putativa	Q56J97	x	x	sem KOG
23	Subunidade beta da ATP-sintase	EGC05083		x	C
26	Enolase	EGC04828 (CN653186)	x	x	G
27	Enolase	EGC04828 (CN653186)	x	x	G
28	Enolase	EGC04828 (CN653186)	x	x	G
29	Enolase	EGC04828 (CN653186)	x	x	G
30	Enolase	EGC04828 (CN653186)	x	x	G
31	Isocitrato-desidrogenase-NADP-dependente	DR748835		x	C
32	Isocitrato-desidrogenase-NADP-dependente	DR748835	x	x	C
33	Citrato-sintase	EGC04146 (contig 1)	x		C
34	Citrato-sintase	EGC04146 (contig 1)	x	x	C
36	Aspartato-aminotransferase	EL742110, EL753611, EL759324, ou EL759714	x	x	E
43	Actina	EGC00006 (contig 2)	x	x	Z

44	Proteína ligante de cálcio sarcoplasmática	EGC04217 (contig 1)	x		T
45	Proteína relacionada a HSP20	EGC00939 (contig 1)	x		O
46	Proteína relacionada a HSP20	EGC00939 (contig 1)	x		O
47	Proteína relacionada a HSP20	EGC00939 (contig 1)	x		O
48	Proteína relacionada a HSP20	EGC00939 (contig 1)	x		O
49	Proteína relacionada a HSP20	EGC00939 (contig 1)	x		O
50	Proteína relacionada a HSP20	EGC00939 (contig 1)	x	x	O
51	Proteína relacionada a HSP20	EGC00939 (contig 1)	x	x	O
52	Proteína relacionada a HSP20	EGC00939 (contig 1)	x		O
54	Pirifosfatase inorgânica	EGC0895 (BQ173221)	x	x	C
56	14-3-3 epsilon	EGC02229 (contig 1)		x	O
58	14-3-3 zeta	EGC02757 (contig 1)	x	x	O
59	14-3-3 epsilon	EGC00123 (BF643012)		x	O
65	Frutose-bifosfato-aldolase	EGC0369 (contig 1)	x		G
66	Frutose-bifosfato-aldolase	EGC0369 (contig 1)	x		G
68	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	EGC00305 (contig 1)		x	G
69	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	EGC00305 (contig 1)	x	x	G
70	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	EGC00305 (contig 1)	x		G
72	Malato-desidrogenase-citoplasmática	EGC00028 (contig 1)	x		C
73	Malato-desidrogenase-citoplasmática	EGC00028 (contig 1)	x		C
74	Malato-desidrogenase-citoplasmática	EGC00028 (contig 1)	x	x	C
75	Malato-desidrogenase-citoplasmática	EGC00028 (contig 1)	x		C
88	Tiorredoxina-peroxidase	EGC00084 (contig 1) ou EGC 02722 (contig 1)	x		O
89	Tiorredoxina-peroxidase	EGC00084 (contig 1) ou EGC 02722 (contig 1)	x		O

^a- Número dos spots e ID no banco de dados LophoDB ou número de acesso estão de acordo com o mapa proteômico publicado por Monteiro *et al.*, 2010;

^b- Categorias funcionais: (Z) citoesqueleto; (O) modificações pós-traducionais, turnover de proteínas e chaperonas; (C) conversão e produção de energia; (G) transporte e metabolismo de

carboidratos; (T) mecanismos de transdução de sinal; (E) metabolismo e transporte e aminoácidos; (sem KOG) proteína não relacionada a nenhuma categoria funcional.

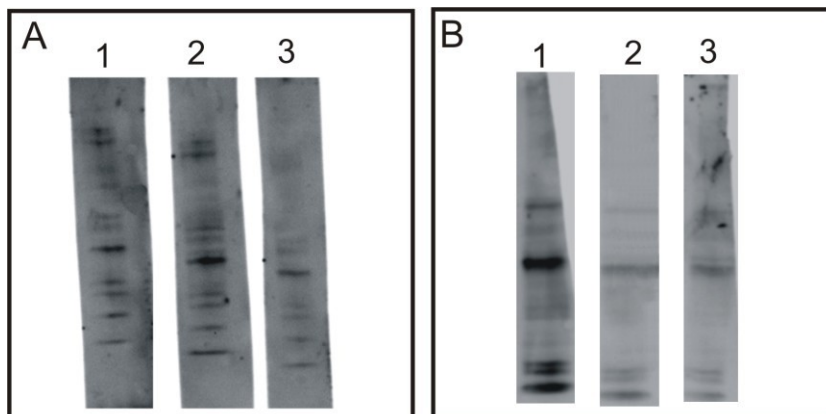


Figura 17: Análise do efeito do peptídeo inibidor R18 nas interações detectadas por *gel-overlay*. Ensaio de *gel-overlay* unidimensional com as isoformas Eg14-3-3ζ2 (A) e Eg14-3-3ζ3 (B) sem pré-incubação com o peptídeo R18 (1) ou pré-incubadas com 0,016 mM(2) ou 0,1 mM (3) do peptídeo.

Nos ensaios de interação utilizando o *crosslinker* Sulfo-SBED foram identificadas 36 proteínas de interação, sendo que, 9 interagindo apenas com a isoforma Eg14-3-3ζ2, 15 interagindo apenas com a isoforma Eg14-3-3ζ3 e 12 interagindo com ambas as isoformas, (Tabela 5).

No experimento controle com a proteína GST ligada ao Sulfo-SBED foram identificadas 51 proteínas, sendo 15 exclusivamente encontradas no controle, 35 encontradas também interagindo com Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3, 1 também interagindo com Eg14-3-3ζ2. Entre as proteínas identificadas no experimento controle e também interagindo com Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 estão as proteínas actina, fosfoenolpiruvato carboxiquinase, enolase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, entre outras. Todas as proteínas identificadas no experimento controle, inclusive as proteínas também identificadas interagindo com Eg14-3-3ζ2 e/ou Eg14-3-3ζ3 foram excluídas da lista de proteínas de interação identificadas neste experimento a fim de aumentar a confiança nos dados obtidos a partir da estratégia de *crosslinking*.

Entre as proteínas de interação identificadas a partir de 2DE *gel-overlay* e a partir de experimentos de *crosslinking* com o reagente Sulfo-SBED estão

principalmente proteínas associadas a modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas, seguidas de proteínas envolvidas em produção e conversão de energia, além de proteínas que compõem o citoesqueleto e proteínas relacionadas ao transporte e metabolismo de carboidratos, categorias funcionais O, C, Z e G, respectivamente.

Tabela 5: Proteínas de protoescólicas que interagem com as proteínas Eg14-3-3ζ2 e/ou Eg14-3-3ζ3 identificadas a partir de experimentos de *crosslinking* com o reagente Sulfo-SBED.

Proteína	ID GeneDB	Interação Eg14-3-3ζ2	Interação Eg14-3-3ζ3	Categoria funcional ^a
14-3-3 zeta/delta	EgrG_001060100	x	x	O
14-3-3 beta/alpha	EgrG_000364000	x	x	O
Anexina	EgrG_000244000	x	x	U
Anexina	EgrG_000041300	x	x	U
HSP90 alfa	EgrG_000008700	x	x	O
Beta-tubulina cadeia 2C	EgrG_000672200	x	x	Z
Ornitina-aminotransferase	EgrG_001032200	x	x	E
Membro da família HSP (HSP3)	EgrG_000249600	x	x	O
Enzima málica-NADP-dependente	EgrG_001145700	x	x	C
Dineína - cadeia leve	EgrG_000941100	x	x	Z
Proteína ligante de cálcio	EgrG_000084500	x	x	T
Ndr - N-MYC downstream regulated	EgrG_001065500	x	x	S
dnaJ subfamília A	EgrG_000101800	x		O
HSP60	EgrG_001190900	x		O
DM9	EgrG_000127000	x		sem KOG
Isocitrato-desidrogenase-NADP-dependente	EgrG_001068500	x		C
Histona H2B	EgrG_000322800	x		B
Nucleosídeo-difosfato-quinase	EgrG_001117000	x		F
Dineína - cadeia leve	EgrG_000684700	x		Z
Titina	EgrG_000610500	x		sem KOG
Histona H4	EgrG_000128000	x		B
Succinato-desidrogenase ubiquinona	EgrG_000422600		x	C
Calpaína	EgrG_000719700		x	O
Miosina - cadeia leve reguladora	EgrG_000110000		x	Z

ATPase-Na:K subunidade alfa	EgrG_000342600		x	P
ATP-sintase subunidade mitocondrial alfa	EgrG_000720500		x	C
Miosina - cadeia pesada	EgrG_000920900		x	Z
Proteína ligante de cálcio sarcoplasmática	EgrG_000184100		x	T
Tubulina – cadeia 1 C alfa	EgrG_000413200		x	Z
ATPase transportadora de Cálcio	EgrG_001008200		x	P
Paramiosina	EgrG_000763300		x	Z
Isomerase D da prostaglandina H2	EgrG_000459050		x	O
Succinato-desidrogenase-Fe-S ubiquinona	EgrG_000416100		x	C
Epimerase NAD-dependente	EgrG_000511900		x	R
Fosfoglicomutase	EgrG_000943900		x	G
Purina-nucleosídeo-fosforilase	EgrG_000635700		x	F

^a- Categorias funcionais: (Z) citoesqueleto; (O) modificações pós-traducionais, turnover de proteínas e chaperonas; (C) conversão e produção de energia; (G) transporte e metabolismo de carboidratos; (T) mecanismos de transdução de sinal; (E) metabolismo e transporte e aminoácidos; (R) predição somente de função geral; (U) tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; (P) metabolismo e transporte de íons inorgânicos; (F) metabolismo e transporte de nucleotídeos; (B) estrutura e dinâmica da cromatina; (S) função desconhecida; (sem KOG) proteína não relacionada a nenhuma categoria funcional.

5. Discussão

O estudo da família de genes codificadores de proteínas 14-3-3 em *E. granulosus* e *E. multilocularis* ainda não havia sido realizado, não estando estabelecido, até o momento, o número total de isoformas de 14-3-3 presentes nestes organismos. Baseado em análises de sequências de mRNA disponíveis no GenBank, foi descrito no artigo de revisão Silas-Lucas *et al.* (2008) que no gênero *Echinococcus* havia quatro genes codificadores de proteínas 14-3-3, três codificadores de diferentes isoformas do tipo zeta e um codificador de uma isoforma do tipo épsilon. Recentemente as sequências completas dos genomas dessas espécies foram publicadas (Tsai *et al.*, 2013), além disso, dados de EST e dados de anotação automática das sequências genômicas estão disponíveis nos bancos de dados LophoDB e GeneDB, respectivamente. Neste trabalho, a análise e comparação de ambos os bancos de dados e a busca por sequências genômicas homólogas a genes de 14-3-3 em *E. granulosus* e *E. multilocularis* revelou 6 potenciais genes codificadores de proteínas 14-3-3, sendo o gene *Em14-3-3.6* descrito aqui pela primeira vez.

As primeiras sequências de 14-3-3 para *E. granulosus* e *E. multilocularis* depositadas no GenBank (AF207904 e MU63643, respectivamente) foram classificadas como zeta e correspondem a isoforma 14-3-3 ζ 1 (Siles-Lucas *et al.*, 1998; Nunes *et al.*, 2004; Siles-Lucas *et al.*, 2008). Essas sequências foram geradas a partir de uma PCR utilizando iniciadores degenerados projetados com base nas sequências de 14-3-3 de outros organismos. No entanto, nenhum dado genômico correspondente a essa isoforma foi identificado para *E. granulosus* ou *E. multilocularis*. Assim, possivelmente a isoforma 14-3-3 ζ 1 corresponde a uma das duas outras isoformas zeta descritas posteriormente, mas com uma região 5' diferente devido a problemas no sequenciamento. Os genes *Eg14-3-3 ζ 2* e *Em14-3-3 ζ 2* foram assim nomeados pois correspondem às sequências de mRNA depositadas no GenBank (AF529418 e AF529419, respectivamente), descritas como codificadoras de uma segunda isoforma de 14-3-3 de *E. granulosus* e *E. multilocularis* classificadas como zeta (Nunes *et al.*, 2004). Os genes *Eg14-3-3 ζ 3* e *Em14-3-3 ζ 3* correspondem a sequências descritas como parciais (CV681060 e BU493235, respectivamente), codificadoras de uma isoforma adicional de 14-3-3,

presente em ambos os organismos e também classificadas como zeta (Siles-Lucas *et al.*, 2008). Para os genes *Eg14-3-3ε1* e *Em14-3-3ε1* há, depositadas no GenBank, as sequências de mRNA BF643012 e BU493070, respectivamente, e para o gene *Eg14-3-3ε2* está depositada a sequência CN652875, ambas classificadas como épsilon (Nunes *et al.*, 2004; Siles-Lucas *et al.*, 2008)

Os 6 genes de 14-3-3 identificados para *E. granulosus* e *E. multilocularis* são estruturalmente íntegros em relação à estrutura éxon-intron, inclusive o gene *Em14-3-3.6*, e provavelmente funcionais. Os produtos dos genes *Eg14-3-3ζ2*, *Eg14-3-3ζ3*, *Eg14-3-3ε1* e *Eg14-3-3ε2* já foram identificados em análises transcriptômicas (Fernández *et al.*, 2002; Parkinson *et al.*, 2012), sendo representados no banco de dados LophoDB por 6, 4, 1 e 4 EST, respectivamente, geradas principalmente a partir do sequenciamento de bibliotecas de cDNA de protoescólices de *E. granulosus*. As proteínas codificadas por esses genes também já foram identificadas em protoescólices e produtos de excreção e secreção de protoescólices em cultura (Monteiro *et al.*, 2010; Virginio *et al.*, 2012).

Os produtos dos genes *Em14-3-3ζ2*, *Em14-3-3ζ3* e *Em14-3-3ε1* também foram identificados (Brehm *et al.*, 2003), sendo representados cada um, por apenas 1 EST no banco de dados LophoDB, e um produto proteico do gene *Em14-3-3ε1* ou *Em14-3-3ε1* foi identificado em protoescólices de *E. multilocularis* (Wang *et al.*, 2009). No entanto o produto dos genes *Eg14-3-3.5*, *Eg14-3-3.6*, *Em14-3-3.5* e *Em14-3-3.6* nunca foram detectados em qualquer estudo. Níveis de expressão relativamente mais baixos ou preferencialmente em outros estágios, que não o larval, poderiam explicar o fato de mRNAs ou produtos proteicos desses genes ainda não terem sido detectados. Para *E. multilocularis*, dados de análises transcriptômicas (RNA-seq) corroboram com essa hipótese, demonstrando que o gene *Em14-3-3.5* apresenta níveis de expressão, estatisticamente significativos, mais elevados no verme adulto que no metacestódeo (Magdalena Zarowiecki *et al.*, comunicação pessoal). O gene *Em14-3-3.6* identificado nas buscas realizadas nos dados genômicos de *E. multilocularis* não apresentou qualquer sequência correspondente nem mesmo no banco de dados GeneDB, porém os dados disponíveis neste banco estão agora sendo curados manualmente e assim sujeitos a constantes alterações.

As estruturas éxon-íntron dos genes *Eg14-3-3* e *Em14-3-3* são mais semelhantes entre ortólogos que entre parálogos, e assim como descrito na literatura para outros organismos (Wang & Shakes, 1996), proteínas ortólogas das duas espécies também apresentam maior identidade/similaridade entre si do que entre as proteínas parálogas. Esse resultado sugere que a origem de todos os genes de 14-3-3 em *E. granulosus* e *E. multilocularis* é anterior a especiação desses parasitos.

Estudos filogenéticos apontam que proteínas 14-3-3 tipicamente se agrupam em duas categorias distintas, uma categoria composta pelas isoformas não-épsilon e outra categoria composta pelas isoformas épsilon (Wang & Shakes, 1996; Ferl *et al.*, 2002). Também já foi demonstrado que as isoformas épsilon são as mais conservadas entre os distintos organismos. Por exemplo, a isoforma épsilon de mamíferos é mais similar à isoforma épsilon de leveduras e de plantas que a outras isoformas de mamíferos, apresentando aproximadamente 70% de similaridade entre proteínas ortólogas. Essas observações sugerem que os genes codificadores de isoformas 14-3-3 épsilon são mais primitivos do que os genes codificadores de outras isoformas de 14-3-3. Sendo que as proteínas 14-3-3 épsilon são provavelmente as isoformas que mais retiveram as características do gene ancestral de 14-3-3.

Análises filogenéticas das sequências preditas de aminoácidos codificadas pelos genes *Eg14-3-3* e *Em14-3-3* demonstram que a família de proteínas 14-3-3 presente em *E. granulosus* e *E. multilocularis* apresenta características ancestrais, sendo observado que elas não se agrupam claramente com proteínas ortólogas de outros organismos quanto ao tipo de isoforma (zeta ou épsilon) como ocorre, por exemplo, em mamíferos. As proteínas *Eg14-3-3* e *Em14-3-3*, a exceção das isoformas 14-3-3.5 e 14-3-3.6, na verdade se encontram em uma posição intermediária entre as duas categorias épsilon e não-épsilon de outros organismos. Relações filogenéticas semelhantes entre proteínas 14-3-3 de *S. mansoni* e *S. japonicum* e proteínas ortólogas épsilon e não-épsilon de outros organismos também já foi descrita na literatura (McGonigle *et al.*, 2002).

No entanto, dentro das famílias *Eg14-3-3* e *Em14-3-3* é possível supor uma origem mais recente para as isoformas *Eg14-3-3ζ2*, *Em14-3-3ζ2*, *Eg14-3-3ζ3*, e

Em14-3-3ζ3, uma vez que elas se agrupam preferencialmente com isoformas não-épsilon de outros organismos. Por sua vez, uma condição mais ancestral é sugerida para as isoformas Eg14-3-3ε2 e Em14-3-3ε2, pois essas isoformas se agrupam com as isoformas épsilon de outros organismos por um ramo distante. Já as isoformas Eg14-3-3ε1 e Em14-3-3ε1 formam um braço distinto, em uma posição intermediária entre os grupos épsilon e não-épsilon, indicando uma divergência posterior em relação às isoformas Eg14-3-3ε2 e Em14-3-3ε2. As isoformas Eg14-3-3.5, Em14-3-3.5, Eg14-3-3.6 e Em14-3-3.6 se agrupam em ramos mais distantes na base da árvore filogenética e provavelmente correspondem às isoformas de *Echinococcus* que mais retêm características ancestrais dentro da família.

Segundo a teoria de Wang & Shakes (1996), as proteínas 14-3-3 épsilon retêm as características do gene ancestral e servem como uma cópia funcionalmente conservada. Assim as demais isoformas não-épsilon que se originaram de eventos de duplicação posteriores, provavelmente adquiriram funções secundárias. Para *E. granulosus* e *E. multilocularis*, as diferentes isoformas de 14-3-3, com exceção das isoformas 14-3-3.5 e 14-3-3.6, apresentam uma relação filogenética relativamente próxima. A comparação das proteínas Eg14-3-3 e Em14-3-3 com proteínas ortólogas de outros organismos eucariotos demonstrou que Eg14-3-3 e Em14-3-3 apresentam identidade entre 30-50% com todas as ortólogas analisadas, independentemente da isoforma. Assim, sugerindo que a especialização e variabilidade funcional entre as diferentes isoformas de Eg14-3-3 e Em14-3-3 deve ser discreta. Especializações funcionais das proteínas 14-3-3 associadas ao parasitismo já foram sugeridas (Siles-Lucas & Gottstein, 2003), porém, nenhuma função adicional dessas proteínas em organismos parasitos foi ainda descrita.

Para a caracterização das proteínas 14-3-3 de *E. granulosus*, os genes *Eg14-3-3ζ2* e *Eg14-3-3ζ3* tiveram suas sequências codificadoras clonadas e as versões recombinantes destas proteínas foram produzidas. Após a produção e purificação, as proteínas recombinantes Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 foram utilizadas na imunização de coelhos. Assim como descrito na literatura (Siles-Lucas *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2012), as proteínas 14-3-3 recombinantes se

mostraram imunogênicas induzindo resposta humoral, resultando na produção de antissoros policlonais isoforma-específicos. O potencial antigênico dessas proteínas também já foi demonstrado anteriormente, uma vez que soros de pacientes humanos com hidatidose cística reconhecem proteínas 14-3-3 presentes em extratos de protoescólices de *E. granulosus* (Monteiro *et al.*, 2010).

As análises do padrão de expressão das isoformas Eg14-3-3 ζ 2 e Eg14-3-3 ζ 3 na fase larval patogênica de *E. granulosus* foram realizadas utilizando os antissoros produzidos e os anticorpos purificados anti-Eg14-3-3 ζ 2 e anti-Eg14-3-3 ζ 3. Foi possível detectar a presença de ambas as isoformas em protoescólices e camada germinativa, compatível com a ampla distribuição de proteínas 14-3-3 em células eucarióticas. No entanto, a presença da isoforma Eg14-3-3 ζ 2 no líquido hidático e da isoforma Eg14-3-3 ζ 3 na camada laminar, componentes do metacestódeo que representam interfaces parasito-hospedeiro, chama a atenção, sugerindo a atuação dessas proteínas em mecanismos de interação com o hospedeiro. Uma vez que entre as estratégias de sobrevivência desenvolvidas pelo parasito está a apresentação de diferentes moléculas ao hospedeiro, inclusive por meio dessas interfaces. Essas moléculas podem estar envolvidas na evasão da resposta imune, incorporação de metabólitos e resistência a estresse entre outras funções (Siracusano *et al.*, 2008; Siracusano *et al.*, 2012a; Siracusano *et al.*, 2012b). As proteínas 14-3-3 inclusive já foram relacionadas com evasão à resposta imune celular, inibindo a produção de óxido nítrico por macrófagos (Andrade *et al.*, 2004). Adicionalmente, as proteínas 14-3-3 são expressas pelas oncosferas de *E. multilocularis* demonstrando que o hospedeiro entra em contato com essa proteína já nas primeiras fases da infecção (Siles-Lucas *et al.*, 2003). As proteínas 14-3-3 também já foram identificadas em produtos de excreção/secreção de protoescólices de *E. granulosus* em cultura, sugerindo a apresentação ativa destas proteínas ao hospedeiro (Virginio *et al.*, 2012).

A elucidação do desempenho de funções conservadas ou especializadas das isoformas Eg14-3-3 ζ 2 e Eg14-3-3 ζ 3, comparada a proteínas 14-3-3 de outros organismos, requer a identificação dos alvos dessas isoformas. O advento da proteômica facilitou o grande aumento no número de proteínas alvo das 14-3-3

identificadas em diversos organismos nos últimos anos (Jin *et al.*, 2004; Meek *et al.*, 2004; Pozuelo Rubio *et al.*, 2004; Pauly *et al.*, 2007; Heverin *et al.*, 2012). Entre as principais proteínas de interação descritas estão quinases, fosfatases, moléculas sinalizadoras, chaperonas, fatores de transcrição, receptores e proteínas de citoesqueleto. Entretanto, o grau de sobreposição dos resultados obtidos pelos diversos estudos que buscam caracterizar as proteínas alvo das 14-3-3 é bastante baixo, em virtude da variedade de técnicas empregadas e material biológico utilizado (Bridges & Moorhead, 2005). Neste trabalho, para a identificação das proteínas de protoescólices que interagem com as isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 foram empregadas duas técnicas distintas: 2DE *gel-overlay* e ensaios de interação utilizando o *crosslinker* Sulfo-SBED.

A técnica de 2DE *gel-overlay* mostrou-se eficiente em uma primeira etapa, para a análise do potencial de interação das proteínas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 recombinantes com outras proteínas do parasito, graças à disponibilidade do mapa proteômico de protoescólices (Monteiro *et al.*, 2010). A especificidade desta abordagem é evidenciada pelo fato de que nem todas as proteínas presentes no extrato de protoescólices e resolvidas por 2DE se apresentaram como *spots* reativos no 2DE *gel-overlay*. Além disso, no experimento controle com a proteína GST biotinizada apenas uma banda inespecífica, correspondente à proteína GST de *E. granulosus* foi identificada, essa interação era esperada devido a característica de dimerização desta proteína (Fabrini *et al.*, 2009). A diminuição do sinal após a incubação das proteínas recombinantes com o peptídeo R18, no experimento de *gel-overlay* em eletroforese unidimensional, também evidencia a especificidade do experimento. O peptídeo R18 se liga no sítio de interação das proteínas 14-3-3, bloqueando a sua interação com os demais ligantes protéicos (Petosa *et al.*, 1998).

A utilização do *crosslinker* Sulfo-SBED associada à espectrometria de massas já foi apresentada como uma abordagem interessante para a identificação de interações proteicas em amostras complexas (Ishmael *et al.*, 2002; Sinz *et al.*, 2005; Kovacic *et al.*, 2007). Apesar das vantagens da utilização do 2DE *gel-overlay* em uma primeira etapa da identificação dos ligantes proteicos das isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3, a utilização desse *crosslinker* se

mostrou uma estratégia mais simples e eficiente na recuperação de ligantes protéicos. No entanto, a especificidade da técnica ficou comprometida devido à identificação de diversas proteínas no experimento controle com a proteína GST ligada ao Sulfo-SBED. É importante salientar que entre as diversas proteínas identificadas no experimento controle, muitas correspondem a ligantes de 14-3-3 já descritos na literatura e também identificadas como ligantes neste experimento. Possivelmente essas proteínas são abundantes nos extratos de protoescólices e não foram totalmente removidas da coluna durante a etapa de lavagem. No entanto, para aumentar a confiança nos resultados obtidos no experimento de *crosslinking*, nenhuma das proteínas identificadas no controle, nem mesmo aquelas identificadas também interagindo com Eg14-3-3ζ2 e/ou Eg14-3-3ζ3, foram incluídas na lista de proteínas de interação identificadas neste experimento.

Apesar de a comparação entre as proteínas de interação identificadas pelas duas técnicas empregadas ter ficado prejudicada em virtude das interações inespecíficas identificadas no experimento de *crosslinking*, foi possível observar que as isoformas Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3 interagem com um amplo repertório de proteínas alvo. Essas interações identificadas possivelmente representam o conjunto das interações que ocorre em *E. granulosus sensu stricto* (G1) e *E. ortleppi* (G5) uma vez que os extratos protéicos de protoescólices foram produzidos com material de ambos os genótipos/espécies. A maioria das proteínas de interação identificadas está associada às categorias funcionais: modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas; produção e conversão de energia; citoesqueleto e transporte e metabolismo de carboidratos, sendo a maioria dessas interações já descritas na literatura o que reforça a confiança dos dados obtidos.

A interação entre as famílias de proteínas 14-3-3 e HSPs é um exemplo de interação amplamente descrito na literatura. Diversas evidências apontam a cooperação entre essas duas famílias de proteínas para sobrevivência de células eucarióticas a situações de estresse. Em seres humanos já foi descrito que proteínas 14-3-3 ao interagirem com proteínas HSP promovem um aumento da atividade de chaperona das HSP (Chernik *et al.*, 2007). Em *Drosophila*, a isoforma 14-3-3ζ tem níveis de transcrição aumentados via regulação por fatores de

transcrição do tipo *heat shock*, após estresse térmico, restaurando a atividade da enzima citrato-sintase com o auxílio das proteínas HSP70 e HSP40 (Yano *et al.*, 2006). Em *E. granulosus* já foi descrito que proteínas HSP70, HSP60 e proteínas 14-3-3 tiveram seus níveis de transcrição aumentados após o tratamento de protoescólices com anti-helmíntico (Pan *et al.*, 2010). Em parasitos helmintos como *E. granulosus*, que sobrevivem em ambientes hostis sujeitos a diversas situações de estresse promovidas pelo sistema de defesa do hospedeiro, o desenvolvimento de estratégias de defesa robustas é fundamental. Sejam essas estratégias ativas por meio da secreção de moléculas imuno-modulatórias ou passivas a partir do desenvolvimento de mecanismos de resistência e recuperação das injúrias promovidas (Siracusano *et al.*, 2008). Assim a interação entre as famílias de proteínas HSP e 14-3-3 possivelmente é de grande relevância para sobrevivência de *E. granulosus* após situações de estresse.

A interação entre proteínas 14-3-3 e diversas proteínas relacionadas ao metabolismo também já foi evidenciada em outros trabalhos (Kleppe *et al.*, 2011). Em estudos de larga escala para a identificação de proteínas de interação com as 14-3-3, enzimas como gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, enolase, ATP-sintase, frutose-bifosfato-aldolase e fosfoenolpiruvato-carboxiquinase foram identificadas (Jin *et al.*, 2004; Meek *et al.*, 2004; Pozuelo Rubio *et al.*, 2004; Pauly *et al.*, 2007). Essas enzimas também foram identificadas neste trabalho como proteínas de interação com 14-3-3 em *E. granulosus*. Em organismos unicelulares, bem como multicelulares, o metabolismo necessita ser finamente regulado de acordo com a demanda dos processos celulares, e evidências do envolvimento das proteínas 14-3-3 nessa regulação tem se acumulado nas últimas décadas. No entanto o efeito biológico das proteínas 14-3-3 na regulação da atividade de enzimas metabólicas é pouco conhecido, sendo que muitas das interações identificadas ainda não foram estudadas em detalhes (Kleppe *et al.*, 2011). Por exemplo, ainda não se conhece o efeito biológico da interação entre proteínas 14-3-3 e a enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase. Essa enzima é também uma proteína multifuncional, que além de participar do metabolismo de carboidratos, também está envolvida em mecanismos de fusão de membranas, agregação de microtúbulos, exportação nuclear de RNA, replicação de DNA,

regulação da tradução e apoptose (Sirover, 1996). A interação entre proteínas 14-3-3 com as proteínas frutose-bifosfato-aldolase e fosfo-enolpiruvato-carboxiquinase foi descrita pela primeira vez por Pauly *et al.* (2007) em *Hydra vulgaris*. Em células de *Arabidopsis* foi mostrado que proteínas 14-3-3 estabilizam enzimas metabólicas quando elas são necessárias, e na ausência de açúcar a ligação com as proteínas 14-3-3 é perdida levando a uma rápida degradação das proteínas-alvo (Cotelle *et al.*, 2000). A interação das proteínas 14-3-3 com enzimas glicolíticas pode ainda apresentar função adicional ao controle do metabolismo, uma vez que 7 entre 10 enzimas glicolíticas apresentam funções adicionais não glicolíticas, ditas *moonlighting* (Huberts & van der Klei, 2010). Em parasitos, frutose-bifosfato-aldolase e enolase, duas proteínas ligantes de 14-3-3 identificadas neste estudo, foram descritas como proteínas *moonlighting*, estando envolvidas em processos importantes tais como adesão, invasão, diferenciação e desenvolvimento (Jewett & Sibley, 2003; Labbé *et al.*, 2006; Pal-Bhowmick *et al.*, 2007; Pomel *et al.*, 2008). Em *E. granulosus* essas enzimas foram classificadas como potencialmente *moonlighting*, sendo a enolase identificada na fração tegumentar de protoescolíces e frutose-bifosfato-aldolase identificada interagindo com actina (Lorenzatto *et al.*, 2012).

Outro grupo de proteínas interagindo com as isoformas Eg14-3-3 ζ identificado neste estudo é representado pelas proteínas associadas ao citoesqueleto. O papel das proteínas 14-3-3 na manutenção da forma celular já foi descrito por Jin *et al.* (2004), em que uma morfologia anormal foi observada em células de mamíferos após o bloqueio das interações entre proteínas 14-3-3 e seus alvos, exibindo longas extensões ramificadas e frequentemente empilhando-se sobre as células vizinhas. A interação entre proteínas 14-3-3 e actina foi demonstrada em *Physarum polycephalum* por Luo *et al.* (2011). Essa interação também foi demonstrada em culturas primárias de astrócitos, sendo perdida sob condições de reorganização da actina durante a mitose e em células apoptóticas (Chen & Yu, 2002). Segundo Zhou *et al.* (2010), a associação de proteínas 14-3-3 com miosina II promove o remodelamento dos filamentos grossos de miosina com organização bipolar, atuando ainda na regulação das mudanças na forma celular durante a citocinese.

Assim, os resultados deste estudo sugerem o envolvimento da família de proteínas 14-3-3 em mecanismos complexos que promovem o estabelecimento e sobrevivência de *E. granulosus*. As interações identificadas neste trabalho abrem uma gama de novas possibilidades de estudo, uma vez que a caracterização dessas interações pode auxiliar na elucidação desde aspectos biológicos básicos do parasito, até mecanismos moleculares utilizados para o desenvolvimento e manutenção do cisto hidático nas vísceras do hospedeiro intermediário por longo período de tempo.

6. Perspectivas

Como perspectiva deste trabalho está a padronização dos experimentos de *crosslinking* utilizando o Sulfo-SBED, a fim de eliminar os contaminantes identificados do experimento controle. Outra perspectiva é o emprego de uma abordagem adicional, que envolve a montagem de uma coluna com as proteínas Eg14-3-3 recombinantes imobilizadas para purificação de proteínas interagentes a partir de extratos parasitários por cromatografia de afinidade. Para eluição será utilizado o peptídeo R18 a fim de avaliar a especificidade das interações com sítio de ligação das proteínas 14-3-3. Adicionalmente, considerando a presença das proteínas 14-3-3 no líquido hidático e camada germinativa, outra perspectiva é a realização de experimentos para identificar os ligantes das proteínas Eg14-3-3 presentes no líquido hidático e em tecidos do hospedeiro.

7. Referências bibliográficas

- ANDRADE, M. A., SILES-LUCAS, M., ESPINOZA, E., PÉREZ ARELLANO, J. L., GOTTSTEIN, B. & MURO, A. (2004). Echinococcus multilocularis laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages in vitro. *Nitric Oxide* 10(3): 150-155.
- AZIZ, A., ZHANG, W., LI, J., LOUKAS, A., MCMANUS, D. P. & MULVENNA, J. (2011). Proteomic characterisation of Echinococcus granulosus hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J Proteomics* 74(9): 1560-1572.
- BALBINOTTI, H., SANTOS, G. B., BADARACO, J., AREND, A. C., GRAICHEN, D., HAAG, K. L. & ZAHA, A. (2012). Echinococcus ortleppi (G5) and Echinococcus granulosus sensu stricto (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Vet Parasitol* 188(3-4): 255-260.
- BESSEMER, J. & BORODOVSKY, M. (2005). GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. *Nucleic Acids Res* 33(Web Server issue): W451-454.
- BREHM, K., WOLF, M., BELAND, H., KRONER, A. & FROSCH, M. (2003). Analysis of differential gene expression in Echinococcus multilocularis larval stages by means of spliced leader differential display. *Int J Parasitol* 33(11): 1145-1159.
- BRIDGES, D. & MOORHEAD, G. (2005). 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE* 2005(296): re10.
- BUDKE, C. M., DEPLAZES, P. & TORGERSON, P. R. (2006). Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis* 12(2): 296-303.
- BURGE, C. B. & KARLIN, S. (1998). Finding the genes in genomic DNA. *Curr Opin Struct Biol* 8(3): 346-354.
- BUSTOS, D. M. (2012). The role of protein disorder in the 14-3-3 interaction network. *Mol Biosyst* 8(1): 178-184.
- CARDONA, G. A. & CARMENA, D. (2013). A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Vet Parasitol* 192(1-3): 10-32.
- CHEMALE, G., VAN ROSSUM, A. J., JEFFERIES, J. R., BARRETT, J., BROPHY, P. M., FERREIRA, H. B. & ZAHA, A. (2003). Proteomic analysis of the larval stage of the parasite Echinococcus granulosus: causative agent of cystic hydatid disease. *Proteomics* 3(8): 1633-1636.
- CHEN, X. Q. & YU, A. C. (2002). The association of 14-3-3 gamma and actin plays a role in cell division and apoptosis in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 296(3): 657-663.

- CHERNIK, I. S., SEIT-NEBI, A. S., MARSTON, S. B. & GUSEV, N. B. (2007). Small heat shock protein Hsp20 (HspB6) as a partner of 14-3-3gamma. *Mol Cell Biochem* 295(1-2): 9-17.
- COTELLE, V., MEEK, S. E., PROVAN, F., MILNE, F. C., MORRICE, N. & MACKINTOSH, C. (2000). 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved Arabidopsis cells. *EMBO J* 19(12): 2869-2876.
- CRAIG, P. S., MCMANUS, D. P., LIGHTOWLERS, M. W., CHABALGOITY, J. A., GARCIA, H. H., GAVIDIA, C. M., GILMAN, R. H., GONZALEZ, A. E., LORCA, M., NAQUIRA, C., NIETO, A. & SCHANTZ, P. M. (2007). Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis* 7(6): 385-394.
- DAVIDSON, R. K., ROMIG, T., JENKINS, E., TRYLAND, M. & ROBERTSON, L. J. (2012). The impact of globalisation on the distribution of Echinococcus multilocularis. *Trends Parasitol* 28(6): 239-247.
- DE LA RUE, M. L. (2008). Cystic echinococcosis in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50(1): 53-56.
- DE LA RUE, M. L., TAKANO, K., BROCHADO, J. F., COSTA, C. V., SOARES, A. G., YAMANO, K., YAGI, K., KATOH, Y. & TAKAHASHI, K. (2011). Infection of humans and animals with Echinococcus granulosus (G1 and G3 strains) and E. ortleppi in Southern Brazil. *Vet Parasitol* 177(1-2): 97-103.
- DÍAZ, A., CASARAVILLA, C., IRIGOÍN, F., LIN, G., PREVIATO, J. O. & FERREIRA, F. (2011). Understanding the laminated layer of larval Echinococcus I: structure. *Trends Parasitol* 27(5): 204-213.
- FABRINI, R., DE LUCA, A., ETELLA, L., MEI, G., ORIONI, B., CICCONE, S., FEDERICI, G., LO BELLO, M. & RICCI, G. (2009). Monomer-Dimer Equilibrium in Glutathione Transferases: A Critical Re-Examination. *Biochemistry* 48: 10473-10482.
- FERL, R. J., MANAK, M. S. & REYES, M. F. (2002). The 14-3-3s. *Genome Biol* 3(7): REVIEWS3010.
- FERNÁNDEZ, C., GREGORY, W., LOKE, P. & MAIZELS, R. (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. *Mol Biochem Parasitol* 122(2): 171-180.
- FU, H., SUBRAMANIAN, R. & MASTERS, S. (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 617-647.
- GARDINO, A. K. & YAFFE, M. B. (2011). 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* 22(7): 688-695.
- GELPERIN, D., WEIGLE, J., NELSON, K., ROSEBOOM, P., IRIE, K., MATSUMOTO, K. & LEMMON, S. (1995). 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras

signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25): 11539-11543.

HENRIKSSON, M. L., FRANCIS, M. S., PEDEN, A., AILI, M., STEFANSSON, K., PALMER, R., AITKEN, A. & HALLBERG, B. (2002). A nonphosphorylated 14-3-3 binding motif on exoenzyme S that is functional in vivo. *Eur J Biochem* 269(20): 4921-4929.

HEVERIN, M., BRENNAN, G. P., KOEHLER, C. J., TREUMANN, A. & HENSHALL, D. C. (2012). Proteomic analysis of 14-3-3 zeta binding proteins in the mouse hippocampus. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 4(2): 74-83.

HUBERTS, D. H. & VAN DER KLEI, I. J. (2010). Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta* 1803(4): 520-525.

ISHMAEL, F. T., ALLEY, S. C. & BENKOVIC, S. J. (2002). Assembly of the bacteriophage T4 helicase: architecture and stoichiometry of the gp41-gp59 complex. *J Biol Chem* 277(23): 20555-20562.

JEWETT, T. J. & SIBLEY, L. D. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol Cell* 11(4): 885-894.

JIN, J., SMITH, F. D., STARK, C., WELLS, C. D., FAWCETT, J. P., KULKARNI, S., METALNIKOV, P., O'DONNELL, P., TAYLOR, P., TAYLOR, L., ZOUGMAN, A., WOODGETT, J. R., LANGEORG, L. K., SCOTT, J. D. & PAWSON, T. (2004). Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol* 14(16): 1436-1450.

KELLER, A., NESVIZHSKII, A. I., KOLKER, E. & AEBERSOLD, R. (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74(20): 5383-5392.

KLEPPE, R., MARTINEZ, A., DØSKELAND, S. O. & HAAVIK, J. (2011). The 14-3-3 proteins in regulation of cellular metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 22(7): 713-719.

KOVACIC, L., SRIBAR, J. & KRIZAJ, I. (2007). A new photoprobe for studying biological activities of secreted phospholipases A2. *Bioorg Chem* 35(4): 295-305.

KOZIOL, U., DOMÍNGUEZ, M. F., MARÍN, M., KUN, A. & CASTILLO, E. (2010). Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm. *Front Zool* 7: 22.

KOZIOL, U., IRIARTE, A., CASTILLO, E., SOTO, J., BELLO, G., CAJARVILLE, A., ROCHE, L. & MARÍN, M. (2009). Characterization of a putative hsp70 pseudogene transcribed in protoscolecids and adult worms of *Echinococcus granulosus*. *Gene* 443(1-2): 1-11.

LABBÉ, M., PÉROVAL, M., BOURDIEU, C., GIRARD-MISGUICH, F. & PÉRY, P. (2006). *Eimeria tenella* enolase and pyruvate kinase: a likely role in glycolysis and in others functions. *Int J Parasitol* 36(14): 1443-1452.

- LI, Z. J., WANG, Y. N., WANG, Q. & ZHAO, W. (2012). Echinococcus granulosus 14-3-3 protein: a potential vaccine candidate against challenge with Echinococcus granulosus in mice. *Biomed Environ Sci* 25(3): 352-358.
- LORENZATTO, K. R., MONTEIRO, K. M., PAREDES, R., PALUDO, G. P., DA FONSÊCA, M. M., GALANTI, N., ZAHA, A. & FERREIRA, H. B. (2012). Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from Echinococcus granulosus: genes, expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins. *Gene* 506(1): 76-84.
- LUO, D., YANG, Y., GUO, J., ZHANG, J., GUO, Z., LIU, S. & TIAN, S. (2011). Interacting domains of P14-3-3 and actin involved in protein-protein interactions of living cells. *Arch Microbiol* 193(9): 651-663.
- MARTÍNEZ, C., PAREDES, R., STOCK, R. P., SARALEGUI, A., ANDREU, M., CABEZÓN, C., EHRLICH, R. & GALANTI, N. (2005). Cellular organization and appearance of differentiated structures in developing stages of the parasitic platyhelminth Echinococcus granulosus. *J Cell Biochem* 94(2): 327-335.
- MASTERS, S. C., PEDERSON, K. J., ZHANG, L., BARBIERI, J. T. & FU, H. (1999). Interaction of 14-3-3 with a nonphosphorylated protein ligand, exoenzyme S of Pseudomonas aeruginosa. *Biochemistry* 38(16): 5216-5221.
- MCCONNELL, J. E., ARMSTRONG, J. F., HODGES, P. E. & BARD, J. B. (1995). The mouse 14-3-3 epsilon isoform, a kinase regulator whose expression pattern is modulated in mesenchyme and neuronal differentiation. *Dev Biol* 169(1): 218-228.
- MCGONIGLE, S., LOSCHIAVO, M. & PEARCE, E. J. (2002). 14-3-3 proteins in Schistosoma mansoni; identification of a second epsilon isoform. *Int J Parasitol* 32(6): 685-693.
- MCMANUS, D. P., ZHANG, W., LI, J. & BARTLEY, P. B. (2003). Echinococcosis. *Lancet* 362(9392): 1295-1304.
- MEEK, S. E., LANE, W. S. & PIWNICA-WORMS, H. (2004). Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *J Biol Chem* 279(31): 32046-32054.
- MONTEIRO, K., DE CARVALHO, M., ZAHA, A. & FERREIRA, H. (2010). Proteomic analysis of the Echinococcus granulosus metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics* 10(10): 1985-1999.
- MORO, P. & SCHANTZ, P. M. (2009). Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis* 13(2): 125-133.
- MUSLIN, A. J., TANNER, J. W., ALLEN, P. M. & SHAW, A. S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84(6): 889-897.

- NESVIZHSHKII, A. I., KELLER, A., KOLKER, E. & AEBERSOLD, R. (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 75(17): 4646-4658.
- NICHOLAS, K. B., NICHOLAS, H. B. (1997). GeneDoc: A Tool for Editing and Annotating Multiple Sequence Alignments. Distributed by the Author.
- NUNES, C. P., ZAHA, A., GOTTSTEIN, B., MÜLLER, N. & SILES-LUCAS, M. E. M. (2004). 14-3-3 gene characterization and description of a second 14-3-3 isoform in both *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*. *Parasitol Res* 93(5): 403-409.
- OBSIL, T. & OBSILOVA, V. (2011). Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol* 22(7): 663-672.
- OLSON, P. D., ZAROWIECKI, M., KISS, F. & BREHM, K. (2012). Cestode genomics - progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology. *Parasite Immunol* 34(2-3): 130-150.
- PAL-BHOWMICK, I., VORA, H. K. & JARORI, G. K. (2007). Sub-cellular localization and post-translational modifications of the *Plasmodium yoelii* enolase suggest moonlighting functions. *Malar J* 6: 45.
- PAN, D., DAS, S., BERA, A. K., BANDYOPADHYAY, S., DE, S., RANA, T., DAS, S. K., SURYANARYANA, V. V., DEB, J. & BHATTACHARYA, D. (2010). Molecular and biochemical mining of heat-shock and 14-3-3 proteins in drug-induced protoscolices of *Echinococcus granulosus* and the detection of a candidate gene for anthelmintic resistance. *J Helminthol*: 1-8.
- PAREDES, R., JIMÉNEZ, V., CABRERA, G., IRAGÜEN, D. & GALANTI, N. (2007). Apoptosis as a possible mechanism of infertility in *Echinococcus granulosus* hydatid cysts. *J Cell Biochem* 100(5): 1200-1209.
- PARKINSON, J., WASMUTH, J. D., SALINAS, G., BIZARRO, C. V., SANFORD, C., BERRIMAN, M., FERREIRA, H. B., ZAHA, A., BLAXTER, M. L., MAIZELS, R. M. & FERNÁNDEZ, C. (2012). A transcriptomic analysis of *Echinococcus granulosus* larval stages: implications for parasite biology and host adaptation. *PLoS Negl Trop Dis* 6(11): e1897.
- PARRISH, J., LIMJINDAPORN, T., HINES, J., LIU, J., LIU, G. & FINLEY, R. J. (2004). High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *J Proteome Res* 3(3): 582-586.
- PAULY, B., LASI, M., MACKINTOSH, C., MORRICE, N., IMHOF, A., REGULA, J., RUDD, S., DAVID, C. N. & BÖTTGER, A. (2007). Proteomic screen in the simple metazoan *Hydra* identifies 14-3-3 binding proteins implicated in cellular metabolism, cytoskeletal organisation and Ca²⁺ signalling. *BMC Cell Biol* 8: 31.
- PETOSA, C., MASTERS, S. C., BANKSTON, L. A., POHL, J., WANG, B., FU, H. & LIDDINGTON, R. C. (1998). 14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an

unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J Biol Chem* 273(26): 16305-16310.

POMEL, S., LUK, F. C. & BECKERS, C. J. (2008). Host cell egress and invasion induce marked relocations of glycolytic enzymes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *PLoS Pathog* 4(10): e1000188.

POZUELO RUBIO, M., GERAGHTY, K. M., WONG, B. H., WOOD, N. T., CAMPBELL, D. G., MORRICE, N. & MACKINTOSH, C. (2004). 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J* 379(Pt 2): 395-408.

RITTINGER, K., BUDMAN, J., XU, J., VOLINIA, S., CANTLEY, L. C., SMERDON, S. J., GAMBLIN, S. J. & YAFFE, M. B. (1999). Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell* 4(2): 153-166.

ROBINSON, D. N. (2010). 14-3-3, an integrator of cell mechanics and cytokinesis. *Small Gtpases* 1(3): 165-169.

SALAMOV, A. A. & SOLOVYEV, V. V. (2000). Ab initio gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Res* 10(4): 516-522.

SAMBROOK, J. E., RUSSEL, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor. 3.

SCHOONHEIM, P., VEIGA, H., PEREIRA, D. C., FRISO, G., VAN WIJK, K. & DE BOER, A. (2007). A comprehensive analysis of the 14-3-3 interactome in barley leaves using a complementary proteomics and two-hybrid approach. *Plant Physiol* 143(2): 670-683.

SILES-LUCAS, M., FELLEISEN, R. S., HEMPHILL, A., WILSON, W. & GOTTSTEIN, B. (1998). Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in *Echinococcus multilocularis*. *Mol Biochem Parasitol* 91(2): 281-293.

SILES-LUCAS, M., MERLI, M. & GOTTSTEIN, B. (2008). 14-3-3 proteins in *Echinococcus*: their role and potential as protective antigens. *Exp Parasitol* 119(4): 516-523.

SILES-LUCAS, M., MERLI, M., MACKENSTEDT, U. & GOTTSTEIN, B. (2003). The *Echinococcus multilocularis* 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. *Vaccine* 21(5-6): 431-439.

SILES-LUCAS, M., NUNES, C. & ZAHA, A. (2001). Comparative analysis of the 14-3-3 gene and its expression in *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitology* 122(Pt 3): 281-287.

SILES-LUCAS, M., NUNES, C., ZAHA, A. & BREIJO, M. (2000). The 14-3-3 protein is secreted by the adult worm of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunol* 22(10): 521-528.

SILES-LUCAS, M. E. M. & GOTTSTEIN, B. (2003). The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. *Trends Parasitol* 19(12): 575-581.

SINZ, A., KALKHOF, S. & IHLING, C. (2005). Mapping protein interfaces by a trifunctional cross-linker combined with MALDI-TOF and ESI-FTICR mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 16(12): 1921-1931.

SIRACUSANO, A., DELUNARDO, F., TEGGI, A. & ORTONA, E. (2012a). Cystic echinococcosis: aspects of immune response, immunopathogenesis and immune evasion from the human host. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 12(1): 16-23.

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

SIRACUSANO, A., RIGANÒ, R., ORTONA, E., PROFUMO, E., MARGUTTI, P., BUTTARI, B., DELUNARDO, F. & TEGGI, A. (2008). Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. *Exp Parasitol* 119(4): 483-489.

SIROVER, M. A. (1996). Minireview. Emerging new functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *Life Sci* 58(25): 2271-2277.

TABUNOKI, H., SHIMADA, T., BANNO, Y., SATO, R., KAJIWARA, H., MITA, K. & SATOH, J. (2008). Identification of *Bombyx mori* 14-3-3 orthologs and the interactor Hsp60. *Neurosci Res* 61(3): 271-280.

TAPPE, D., KERN, P. & FROSCH, M. (2010). A hundred years of controversy about the taxonomic status of *Echinococcus* species. *Acta Trop* 115(3): 167-174.

TORGERSON, P. R. (2003). Economic effects of echinococcosis. *Acta Trop* 85(2): 113-118.

TORGERSON, P. R. & MACPHERSON, C. N. (2011). The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. *Vet Parasitol* 182(1): 79-95.

TSAI, I. J., ZAROWIECKI, M., HOLROYD, N., GARCARRUBIO, A., SANCHEZ-FLORES, A., BROOKS, K. L., TRACEY, A., BOBES, R. J., FRAGOSO, G., SCIUTTO, E., ASLETT, M., BEASLEY, H., BENNETT, H. M., CAI, J., CAMICIA, F., CLARK, R., CUCHER, M., DE SILVA, N., DAY, T. A., DEPLAZES, P., ESTRADA, K., FERNÁNDEZ, C., HOLLAND, P. W., HOU, J., HU, S., HUCKVALE, T., HUNG, S. S., KAMENETZKY, L., KEANE, J. A., KISS, F., KOZIOL, U., LAMBERT, O., LIU, K., LUO, X., LUO, Y., MACCHIAROLI, N., NICHOL, S., PAPS, J., PARKINSON, J., POUCHKINA-STANTCHEVA, N., RIDDIFORD, N., ROSENZVIT, M., SALINAS, G., WASMUTH, J. D., ZAMANIAN, M., ZHENG, Y., CAI, X., SOBERÓN, X., OLSON, P. D., LACLETTE, J. P., BREHM, K., BERRIMAN, M. & CONSORTIUM, T. s. G. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496(7443): 57-63.

- TZIVION, G., DOBSON, M. & RAMAKRISHNAN, G. (2011). FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta* 1813(11): 1938-1945.
- VIRGINIO, V. G., MONTEIRO, K. M., DRUMOND, F., DE CARVALHO, M. O., VARGAS, D. M., ZAHA, A. & FERREIRA, H. B. (2012). Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Mol Biochem Parasitol* 183(1): 15-22.
- WANG, W. & SHAKES, D. C. (1996). Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J Mol Evol* 43(4): 384-398.
- WANG, Y., CHENG, Z., LU, X. & TANG, C. (2009). *Echinococcus multilocularis*: Proteomic analysis of the protoscoleces by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Exp Parasitol* 123(2): 162-167.
- WATANABE, M., ISOBE, T., ICHIMURA, T., KUWANO, R., TAKAHASHI, Y. & KONDO, H. (1993). Molecular cloning of rat cDNAs for beta and gamma subtypes of 14-3-3 protein and developmental changes in expression of their mRNAs in the nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 17(1-2): 135-146.
- YAFFE, M. B., RITTINGER, K., VOLINIA, S., CARON, P. R., AITKEN, A., LEFFERS, H., GAMBLIN, S. J., SMERDON, S. J. & CANTLEY, L. C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91(7): 961-971.
- YANO, M., NAKAMUTA, S., WU, X., OKUMURA, Y. & KIDO, H. (2006). A novel function of 14-3-3 protein: 14-3-3zeta is a heat-shock-related molecular chaperone that dissolves thermal-aggregated proteins. *Mol Biol Cell* 17(11): 4769-4779.
- ZHANG, W. & MCMANUS, D. P. (2008). Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus*: a means to control hydatid disease? *Trends Parasitol* 24(9): 419-424.
- ZHOU, Q., KEE, Y. S., POIRIER, C. C., JELINEK, C., OSBORNE, J., DIVI, S., SURCEL, A., WILL, M. E., EGGERT, U. S., MÜLLER-TAUBENBERGER, A., IGLESIAS, P. A., COTTER, R. J. & ROBINSON, D. N. (2010). 14-3-3 coordinates microtubules, Rac, and myosin II to control cell mechanics and cytokinesis. *Curr Biol* 20(21): 1881-1889.

Anexos

Anexo I.

Tabela A1: Identidade e similaridade entre as proteínas Eg14-3-3 e Em14-3-3 e proteínas ortólogas de outros organismos

	proteína /proteína	Em14-3-3Z3	Eg14-3-3Z2	Em14-3-3Z2	Eg14-3-3E1	Em14-3-3E1	Eg14-3-3E2	Em14-3-3E2	Eg14-3-3.5	Em14-3-3.5
Identidade	Eg14-3-3Z3	98%	53%	51%	46%	47%	45%	39%	27%	27%
Similaridade		100%	68%	67%	64%	65%	64%	55%	47%	47%
Identidade	Em14-3-3Z3	-	53%	51%	47%	48%	45%	38%	27%	27%
Similaridade		-	68%	67%	64%	65%	63%	54%	46%	47%
Identidade	Eg14-3-3Z2	-	-	96%	47%	47%	49%	42%	28%	29%
Similaridade		-	-	96%	63%	63%	64%	55%	45%	45%
Identidade	Em14-3-3Z2	-	-	-	46%	46%	47%	41%	28%	28%
Similaridade		-	-	-	62%	62%	63%	54%	44%	44%
Identidade	Eg14-3-3E1	-	-	-	-	98%	54%	47%	33%	33%
Similaridade		-	-	-	-	98%	72%	61%	52%	53%
Identidade	Em14-3-3E1	-	-	-	-	-	54%	47%	33%	33%
Similaridade		-	-	-	-	-	72%	61%	52%	53%
Identidade	Eg14-3-3E2	-	-	-	-	-	-	82%	33%	34%
Similaridade		-	-	-	-	-	-	83%	50%	51%
Identidade	Em14-3-3E2	-	-	-	-	-	-	-	28%	29%
Similaridade		-	-	-	-	-	-	-	43%	43%
Identidade	Eg14-3-3.5	-	-	-	-	-	-	-	-	97%
Similaridade		-	-	-	-	-	-	-	-	98%
Identidade	Em14-3-3.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Similaridade		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Identidade	Eg14-3-3.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Similaridade		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Identidade	Em14-3-3.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Similaridade		-	-	-	-	-	-	-	-	-

proteína /proteína	Eg14-3-3.6	Em14-3-3.6	Sm_1	Sj_1	Dm_ZetaA	Dm_ZetaD	Dm_ZetaC	Ce_FTT-2a	Ce_FTT-2b	Ce_PAR-5
Eg14-3-3Z3	29%	29%	50%	51%	54%	53%	55%	53%	43%	54%
	50%	50%	63%	67%	68%	68%	68%	69%	56%	68%
Em14-3-3Z3	29%	29%	50%	51%	54%	53%	54%	54%	43%	54%
	50%	50%	64%	67%	68%	68%	68%	69%	56%	68%
Eg14-3-3Z2	31%	31%	52%	53%	53%	53%	53%	54%	45%	54%
	50%	50%	64%	68%	67%	66%	67%	67%	56%	64%
Em14-3-3Z2	30%	30%	50%	52%	52%	51%	52%	52%	45%	52%
	48%	48%	63%	67%	66%	65%	66%	65%	56%	63%
Eg14-3-3E1	33%	33%	53%	51%	61%	61%	61%	61%	47%	59%
	54%	54%	65%	67%	73%	74%	73%	75%	60%	74%
Em14-3-3E1	33%	33%	54%	52%	61%	61%	61%	61%	46%	59%
	54%	54%	65%	67%	74%	74%	73%	75%	59%	74%
Eg14-3-3E2	32%	32%	51%	50%	60%	60%	60%	57%	43%	56%
	53%	53%	62%	65%	71%	71%	71%	73%	58%	72%
Em14-3-3E2	27%	27%	44%	43%	51%	51%	51%	50%	38%	48%
	45%	45%	53%	55%	62%	61%	62%	63%	50%	62%
Eg14-3-3.5	21%	21%	30%	29%	35%	35%	34%	34%	26%	33%
	38%	38%	45%	46%	52%	52%	51%	52%	39%	50%
Em14-3-3.5	21%	21%	31%	29%	35%	35%	35%	34%	27%	33%
	39%	38%	45%	46%	52%	52%	51%	52%	39%	50%
Eg14-3-3.6	-	98%	31%	31%	34%	33%	34%	33%	28%	33%
	-	99%	50%	51%	52%	52%	52%	54%	43%	53%
Em14-3-3.6	-	-	32%	31%	34%	33%	34%	33%	28%	33%
	-	-	51%	51%	52%	52%	52%	54%	43%	53%

proteína /proteína	Hs_zeta/delta	Bt_zeta/delta	Mm_zeta/delta	Mm_zeta/delta2	Xt_Zeta	Hs_beta/alpha	Bt_beta/alpha	Mm_beta/alpha	Dr_beta/alpha-A
Eg14-3-3Z3	54%	54%	54%	49%	51%	51%	51%	51%	53%
	70%	70%	70%	64%	68%	69%	69%	69%	69%
Em14-3-3Z3	54%	54%	53%	49%	51%	51%	51%	51%	53%
	70%	70%	70%	64%	68%	69%	69%	69%	69%
Eg14-3-3Z2	55%	55%	55%	50%	55%	55%	55%	56%	55%
	67%	67%	66%	61%	66%	67%	67%	67%	67%
Em14-3-3Z2	54%	54%	54%	48%	54%	54%	54%	55%	54%
	66%	66%	65%	59%	65%	66%	66%	66%	66%
Eg14-3-3E1	60%	60%	60%	55%	57%	59%	59%	58%	58%
	73%	73%	73%	67%	71%	73%	73%	73%	73%
Em14-3-3E1	60%	60%	60%	55%	57%	59%	59%	58%	59%
	73%	73%	73%	67%	71%	72%	72%	72%	73%
Eg14-3-3E2	57%	57%	57%	52%	56%	55%	55%	55%	56%
	71%	71%	70%	64%	71%	59%	59%	59%	70%
Em14-3-3E2	48%	48%	48%	43%	47%	47%	47%	47%	48%
	60%	60%	60%	55%	61%	59%	59%	59%	60%
Eg14-3-3.5	35%	35%	35%	38%	35%	33%	33%	33%	34%
	52%	52%	52%	57%	53%	51%	51%	51%	52%
Em14-3-3.5	36%	36%	36%	39%	35%	33%	33%	33%	34%
	53%	53%	53%	57%	53%	51%	51%	51%	53%
Eg14-3-3.6	34%	34%	34%	32%	33%	33%	33%	33%	33%
	51%	51%	51%	48%	50%	52%	52%	52%	52%
Em14-3-3.6	34%	34%	34%	32%	33%	33%	33%	33%	33%
	51%	51%	51%	47%	50%	52%	52%	52%	52%

proteína /proteína	Dr_beta/alpha-B	Xt_beta/alpha	Hs_theta	Bt_theta	Mm_theta	Mm_sigma	Bt_sigma	Hs_sigma	Hs_gamma	Mm_gama	
Eg14-3-3Z3		53%		51%		50%		50%		50%	46%
		68%		68%		67%		67%		67%	63%
Em14-3-3Z3	53%	50%	50%	50%	50%	46%	46%	46%	54%	54%	
	68%	68%	67%	67%	67%	63%	63%	63%	69%	69%	
Eg14-3-3Z2	55%	54%	51%	51%	52%	48%	49%	49%	52%	52%	
	67%	68%	64%	64%	64%	64%	64%	64%	66%	66%	
Em14-3-3Z2	53%	53%	50%	50%	50%	47%	48%	48%	50%	50%	
	66%	67%	63%	63%	63%	63%	63%	63%	65%	65%	
Eg14-3-3E1		58%		59%		60%		60%		59%	50%
		72%		73%		74%		74%		74%	68%
Em14-3-3E1	58%	59%	60%	60%	59%	51%	50%	50%	57%	57%	
	73%	73%	73%	73%	73%	69%	68%	68%	71%	71%	
Eg14-3-3E2	55%	56%	55%	55%	55%	50%	50%	50%	56%	56%	
	69%	70%	69%	69%	69%	67%	67%	67%	70%	70%	
Em14-3-3E2	47%	47%	47%	47%	47%	43%	43%	44%	49%	49%	
	59%	59%	58%	58%	59%	59%	59%	59%	60%	60%	
Eg14-3-3.5	34%	34%	34%	34%	34%	31%	31%	31%	34%	34%	
	53%	52%	51%	51%	51%	51%	51%	51%	50%	50%	
Em14-3-3.5	34%	34%	34%	34%	34%	31%	31%	31%	34%	34%	
	53%	53%	51%	51%	51%	52%	51%	52%	50%	50%	
Eg14-3-3.6		34%		35%		34%		34%		34%	32%
		52%		53%		53%		53%		53%	49%
Em14-3-3.6	34%	35%	34%	34%	34%	32%	32%	33%	33%	33%	
	52%	53%	53%	53%	53%	49%	49%	49%	53%	53%	

proteína /proteína	Bt_gamma	Dr_gamma	Mm_eta	Bt_eta	Hs_eta	Sm_epsilon2	Sj_epsilon	Dm_EpsilonD	Dm_EpsilonB	Dm_EpsilonC
Eg14-3-3Z3	54%	54%	52%	52%	52%	43%	42%	38%	47%	48%
	70%	69%	70%	70%	70%	63%	60%	50%	62%	64%
Em14-3-3Z3	54%	53%	53%	52%	53%	43%	42%	38%	47%	48%
	69%	68%	70%	70%	70%	63%	60%	50%	62%	64%
Eg14-3-3Z2	52%	52%	53%	53%	53%	47%	45%	39%	48%	49%
	66%	66%	68%	68%	68%	60%	69%	51%	61%	63%
Em14-3-3Z2	50%	50%	52%	51%	51%	46%	44%	40%	47%	48%
	65%	65%	67%	67%	67%	59%	58%	52%	61%	62%
Eg14-3-3E1	57%	56%	56%	56%	56%	60%	55%	46%	57%	58%
	70%	70%	69%	69%	69%	75%	73%	60%	72%	73%
Em14-3-3E1	57%	56%	56%	56%	56%	59%	55%	45%	57%	58%
	71%	70%	70%	69%	70%	75%	72%	59%	72%	73%
Eg14-3-3E2	56%	56%	56%	56%	57%	53%	51%	45%	57%	59%
	70%	70%	73%	73%	73%	69%	66%	57%	71%	73%
Em14-3-3E2	49%	48%	48%	48%	48%	46%	44%	39%	50%	51%
	60%	60%	62%	62%	62%	59%	56%	50%	62%	63%
Eg14-3-3.5	34%	34%	34%	34%	34%	34%	30%	30%	38%	39%
	50%	50%	50%	50%	50%	48%	48%	40%	54%	55%
Em14-3-3.5	34%	34%	35%	35%	35%	34%	30%	30%	39%	39%
	50%	50%	51%	51%	50%	48%	48%	40%	53%	54%
Eg14-3-3.6	33%	34%	34%	34%	34%	32%	32%	25%	30%	31%
	54%	54%	53%	53%	53%	50%	48%	39%	47%	48%
Em14-3-3.6	33%	34%	34%	34%	34%	31%	31%	25%	30%	31%
	53%	54%	53%	53%	53%	49%	49%	39%	47%	48%

proteína /proteína	Dm_EpsilonA	Hs_epsilon	Mm_epsilon	Bt_epsilon	Dr_epsilon	Sc_Bmh1p	Sc_Bmh2p	Sm_epsilon1
Eg14-3-3Z3	47%	48%	48%	48%	48%	44%	43%	49%
	62%	64%	64%	64%	64%	60%	60%	66%
Em14-3-3Z3	47%	47%	47%	47%	47%	44%	43%	49%
	62%	64%	64%	64%	64%	60%	60%	66%
Eg14-3-3Z2	48%	50%	50%	50%	50%	49%	47%	46%
	61%	62%	62%	62%	62%	61%	60%	63%
Em14-3-3Z2	47%	49%	49%	49%	49%	48%	46%	44%
	60%	61%	61%	61%	62%	61%	60%	61%
Eg14-3-3E1	57%	58%	58%	58%	59%	54%	52%	56%
	72%	75%	75%	75%	75%	71%	69%	71%
Em14-3-3E1	57%	57%	57%	57%	59%	54%	53%	56%
	71%	74%	74%	74%	75%	71%	69%	71%
Eg14-3-3E2	57%	60%	60%	60%	60%	52%	52%	53%
	71%	72%	72%	72%	73%	68%	66%	71%
Em14-3-3E2	50%	52%	52%	52%	52%	47%	48%	46%
	62%	62%	62%	62%	63%	61%	62%	61%
Eg14-3-3.5	38%	38%	38%	38%	38%	33%	32%	34%
	53%	55%	55%	55%	56%	47%	47%	52%
Em14-3-3.5	38%	39%	39%	39%	39%	34%	32%	34%
	53%	55%	55%	55%	55%	47%	46%	52%
Eg14-3-3.6	30%	31%	31%	31%	31%	30%	30%	32%
	47%	48%	48%	48%	49%	48%	47%	53%
Em14-3-3.6	30%	31%	31%	31%	31%	30%	30%	32%
	47%	48%	48%	48%	49%	47%	46%	52%

(Hs) *Homo sapiens*; (Mm) *Mus musculus*; (Bt) *Bos taurus*; (Dr) *Danio rerio*; (Xt) *Xenopus tropicalis*; (Sc) *Saccharomyces cerevisiae*; (Ce) *Caenorhabditis elegans*; (Dm) *Drosophila melanogaster*; (Sm) *Schistosoma mansoni* e (Sj) *Schistosoma japonicum*.

Anexo II Curriculum Vitae

resumido

VARGAS, D. M.

1. Dados Pessoais

Nome: Daiani Machado de Vargas
Nascimento: 15/04/1986 – Porto Alegre/RS Brasil
Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia.
Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421 Sala 210
Agronomia - Porto Alegre/RS
91501-970, RS – Brasil
Telefone: (51) 33087769
E-mail: daianivargas@cbiot.ufrgs.br

2. Formação Acadêmica/Titulação

2011-2013 Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brasil
Título: Caracterização das proteínas 14-3-3ζ expressas na fase larval patogênica de *Echinococcus granulosus*
Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2006-2010 Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brasil

Título: Caracterização de proteínas 14-3-3 do parasito cestódeo *Echinococcus granulosus*

Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira.

3. Formação complementar

2012 Análise de dados proteômicos (Carga horária: 40 h)
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Carlos Chagas,
Curitiba/PR, Brasil

2011 Curso teórico de microscopia confocal em células vivas
(Carga horária: 15 h)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto
Alegre/RS, Brasil

4. Estágios:

2006-2007 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20h
Projeto: Estudo proteômico do estágio larval patogênico (cisto hidático) de *Echinococcus granulosus*
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos.

2008 - 2010 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20h
Projeto: Estudo de proteínas expressas em estágios larvais patogênicos de parasitos da classe Cestoda.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos.

5. Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

VIRGINIO, V. G., MONTEIRO, K. M., DRUMOND, F., DE CARVALHO, M. O., VARGAS, D. M., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. (2012). Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Mol Biochem Parasitol* 183(1): 15-22.

MONTEIRO, K. M., CARDOSO, M. B., FOLLMER, C., DA SILVEIRA N. P., VARGAS, D. M., KITAJIMA, E. W., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. (2012). *Echinococcus granulosus* antigen B structure: subunit composition and oligomeric states. *PLoS Negl Trop Dis* 6(3): e1551.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

MENEGHETTI, B. V., TEICHMANN, A., MONTEIRO, K. M., VARGAS, D. M., FERREIRA, H. B., ZAHA, A. Analysis of the expression pattern of 14-3-3 ϵ 1 and 14-3-3 ϵ 2 proteins from *Echinococcus granulosus*. In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria e XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro. http://ictmm2012.ioc.fiocruz.br/call_abstracts.html, 2012.

TEICHMANN, A., MONTEIRO, K. M., VARGAS, D. M., MENEGHETTI, B. V., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Characterization of 14-3-3 epsilon isoforms from the parasite *Echinococcus granulosus*. In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria e XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro. http://ictmm2012.ioc.fiocruz.br/call_abstracts.html, 2012.

VARGAS, D. M., MONTEIRO, K. M., TEICHMANN, A., MENEGHETTI, B. V., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Characterization of two *Echinococcus granulosus* 14-3-3 protein isoforms (Eg14-3-3 ζ 2 and Eg14-3-3 ζ 3) expressed in the parasites pathogenic larval stage. In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria e XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro. http://ictmm2012.ioc.fiocruz.br/call_abstracts.html, 2012.

TEICHMANN, A., MONTEIRO, K. M., VARGAS, D. M., MENEGHETTI, B. V., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Identificação de ligantes proteicos da proteína 14-3-3 ϵ 1 de *Echinococcus granulosus*. In: XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2011, São Paulo. XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 2011. v. CD.

VARGAS, D. M., MONTEIRO, K. M., TEICHMANN, A., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Caracterização funcional das proteínas 14-3-3 ζ 2 e 14-3-3 ζ 3 de *Echinococcus granulosus*. In: XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2011, São Paulo. XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 2011. v. CD.

VARGAS, D. M., MONTEIRO, K. M., TEICHMANN, A., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Identification of 14-3-3 binding proteins from the *Echinococcus granulosus* larval pathogenic stage. In: XXXIX Reunião Anual da SBBq, 2010. XXXIX Reunião Anual da SBBq.

TEICHMANN, A., MONTEIRO, K. M., VARGAS, D. M., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Characterization of an *Echinococcus granulosus* 14-3-3 epsilon isoform and identification of its interaction partners. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia. Resumos da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009.

VARGAS, D. M., MONTEIRO, K. M., TEICHMANN, A., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Characterization of 14-3-3 zeta 2 isoform from *Echinococcus granulosus* larval stage. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia. Resumos da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009.

VARGAS, D. M., MONTEIRO, K. M., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Identificação de ligantes de proteínas da família 14-3-3 de *Echinococcus granulosus*. In XXI Salão de Iniciação Científica e XVIII Feira de Iniciação Científica da UFRGS, 2009, Porto Alegre. Livro de resumos do XXI Salão de Iniciação científica e XVIII Feira de Iniciação Científica da UFRGS, p. 180 – 180, 2009.

VARGAS, D. M., MONTEIRO, K. M., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Identificação das proteínas que interagem com uma isoforma de 14-3-3 de *Echinococcus granulosus*. In XX Salão de Iniciação Científica e XVII Feira de Iniciação Científica da UFRGS, 2008, Porto Alegre. Livro de resumos do XX Salão de Iniciação científica e XVII Feira de Iniciação Científica da UFRGS, p. 390 – 390, 2008.

VARGAS, D. M., MONTEIRO, K. M., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Análise proteômica de diferentes componentes do cisto hidático de *Echinococcus granulosus*. In XIX Salão de Iniciação Científica e XVI Feira de Iniciação Científica e II Salão UFRGS Jovem, 2007, Porto Alegre. Livro de resumos do XIX Salão de Iniciação científica, XVI Feira de Iniciação Científica e II Salão UFRGS Jovem, 2007.