

INTRODUÇÃO

A hidatidose cística é uma zoonose causada pelo parasito *Echinococcus granulosus*. A fase larval, o cisto hidático (Figura 1), se desenvolve no interior de órgãos como pulmão e fígado de ungulados domésticos e acidentalmente o homem (hospedeiros intermediários do parasito). No interior do cisto, protoescólices são gerados a partir da camada germinativa e quando ingeridos por canídeos (hospedeiros definitivos), desenvolvem-se na forma adulta. Quando os ovos de *E. granulosus* são liberados nas fezes do canídeo e ingeridos por ovinos ou bovinos, o ciclo do parasito se completa.

Uma forma de compreender a biologia do parasito e investigar mecanismos de sobrevivência do cisto hidático no hospedeiro é através da análise de proteínas da forma pré-adulta do parasito *E. granulosus*¹. Nesse contexto, as proteínas 14-3-3 são excelente objeto de estudo, pois fazem parte de uma família de proteínas altamente conservada que desempenha um papel central em rotas de sinalização² e na regulação de funções biológicas^{3,4} a partir da interação com proteínas-alvo⁵. Já foram descritas quatro isoformas de proteínas 14-3-3 em *E. granulosus* (Eg 14-3-3), sendo duas do tipo zeta (ζ) e duas do tipo epsilon (ϵ).

Este estudo tem como objetivo identificar e caracterizar as proteínas de interação com as isoformas ζ e ζ das proteínas Eg14-3-3 e determinar o padrão de expressão das proteínas Eg14-3-3. Com isso, espera-se obter dados que possibilitem a compreensão do papel das 14-3-3 no desenvolvimento do cisto no hospedeiro.

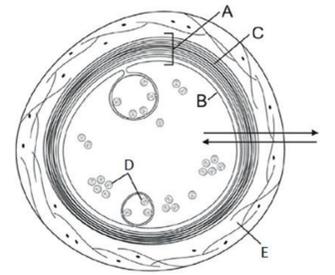


Figura 1: Diagrama esquemático do cisto hidático: A: parede do cisto hidático, B: camada germinativa, C: camada laminar, D: protoescólices, E: camada adventícia, as setas indicam a troca de moléculas entre o parasito e o hospedeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Determinação do padrão de expressão

O padrão de expressão da isoforma Eg14-3-3 ζ foi analisado em protoescólices tanto em corte quanto *in toto*.

• Em corte

Protoescólices imobilizados em parafina foram cortados na espessura de 5 μ m. Os cortes foram desparafinados em xilol e etanol e para detecção da isoforma Eg14-3-3 ζ foram utilizados anticorpos anti Eg14-3-3 ζ purificados de anti-soros produzidos em coelhos. Após, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário, anti IgG de coelho conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen). DAPI e faloidina foram adicionados às lâminas para marcação de núcleo e citoesqueleto respectivamente.

• *In toto*:

Os protoescólices sofreram remoção do tegumento na tentativa de maior penetração dos anticorpos. O material foi então fixado em paraformaldeído 4% por 30 min e tratado com proteinase K para desbloqueio dos antígenos. Para a detecção da isoforma Eg14-3-3 ζ também foi utilizado anticorpos isoforma específicos e anti IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 488 como descrito anteriormente.

Produção de extratos proteicos

Para a produção de extratos proteicos, protoescólices coletados de cistos hidáticos de pulmão e fígado bovinos foram lavados com PBS e homogeneizados em tampão contendo inibidores de fosfatases e Mg-ATP para auxiliar na fosforilação das proteínas.

Identificação das proteínas de interação com Eg14-3-3

Para a identificação das proteínas que interagem com as isoformas Eg14-3-3 ζ e Eg14-3-3 ζ estas isoformas recombinantes foram marcadas com reagente SulfoSBED (Pierce, Thermo Scientific), para a realização de ensaios de *cross-linking*. Por meio de uma ligação covalente amida, o complexo 14-3-3-Sulfo-SBED é formado, e este complexo é então incubado com extrato de protoescólices para que as proteínas que interagem com as Eg14-3-3 sejam capturadas pelo reagente. O complexo 14-3-3-Sulfo-SBED-proteína de interação é então reduzido com DTT, ficando a proteína de interação marcada com biotina (Figura 2).

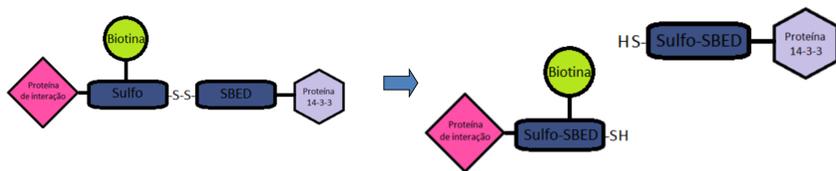


Figura 2: Representação esquemática da reação de redução do complexo 14-3-3-Sulfo-SBED-proteína de interação. O reagente DTT rompe a ligação dissulfeto separando o complexo em duas moléculas: uma com a proteína 14-3-3 e outra com a biotina e a proteína de interação.

Para recuperar as proteínas de interação marcadas com biotina, o extrato passa por uma coluna de avidina agarose. Como efeito da afinidade da biotina pela avidina, as proteínas não biotiniladas saem da coluna, restando somente as proteínas de interação com as proteínas Eg14-3-3. Estas proteínas são então analisadas em espectrometria de massas e o arquivo gerado é analisado nos programas Mascot e Blast, onde as proteínas são identificadas.

RESULTADOS

A análise das imagens geradas pela marcação dos protoescólices em corte (Figura 3) e *in toto* (Figura 4) com anti-Eg14-3-3 ζ , DAPI e faloidina revelam que a proteína Eg14-3-3 ζ é homogêneamente distribuída pelo parasito. Nota-se também o aparecimento de estruturas semelhantes a cordões na região periférica dos protoescólices.

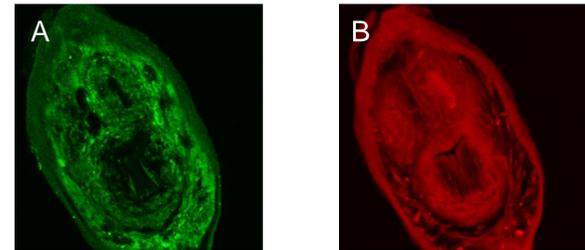


Figura 3: Análise do padrão de expressão da isoforma Eg14-3-3 ζ em protoescólices de *E. granulosus* em corte. Protoescólex de *E. granulosus* em corte, A- proteína Eg14-3-3 ζ nativa detectada por anti-Eg14-3-3 ζ ; B- citoesqueleto marcado com Faloidina conjugada com fluoróforo Alexa594 (vermelho);

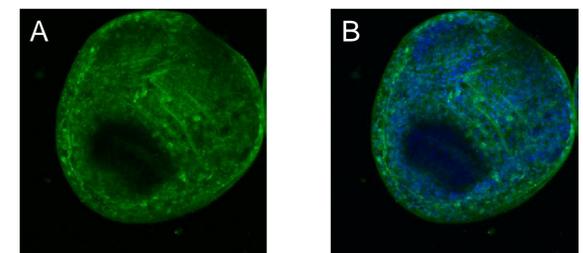


Figura 4: Análise *in toto* do padrão de expressão da isoforma Eg14-3-3 ζ em protoescólices de *E. granulosus*. A- proteína Eg14-3-3 ζ nativa detectada por marcação com anti-Eg14-3-3 ζ reconhecido por anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa488 (verde), B- sobreposição das marcações da proteína Eg14-3-3 ζ e núcleos marcados com DAPI (Azul);

A análise das proteínas de interação com Eg14-3-3 revela um amplo repertório de proteínas-alvo que atuam em diversas funções celulares.

Categoria funcional/ Proteínas de interação com Eg14-3-3 ζ
Transporte e metabolismo de carboidratos
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Enolase
Transcetolase
Produção e conversão de energia
Citrato-sintase
Fosfoenolpiruvato-carboxiquinase
Malato-desidrogenase
Citoesqueleto
Actina
Modificações pós-traducionais, dobramento de proteínas, chaperonas
Proteínas de choque térmico (HSP)
Tiorredoxina-peroxidase
Proteína 14-3-3 ζ
Proteína 14-3-3 ϵ

Tabela 1: Proteínas de interação com a isoforma Eg14-3-3 ζ presentes em extrato de protoescólices.

DISCUSSÃO

As proteínas de interação com as proteínas Eg14-3-3 ζ são proteínas de citoesqueleto, as próprias proteínas Eg14-3-3, proteínas de produção e conversão de energia, entre outros, o que reafirma a importante participação das proteínas Eg14-3-3 em diversas funções celulares.

Além disso, os experimentos de imunistoquímica demonstram que são proteínas citoplasmáticas, apresentando-se em todo o parasito.

PERSPECTIVAS

Os experimentos de identificação das proteínas de interação com Eg14-3-3 serão repetidos com as isoformas Eg14-3-3 ζ , bem como a análise do padrão de expressão.

Outros experimentos também serão empregados para a identificação das proteínas ligantes, tais como gel-overlay, na pretensão de certificação dos resultados do experimento com o reagente sulfo-SBED.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, A. Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function. *Semin Cell Dev Biol*, Aug 2011. ISSN 1096-3634.
- DARLING, D. L.; YINGLING, J.; WYNshaw-BORIS, A. Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development. *Curr Top Dev Biol*, v. 68, p. 281-315, 2005. ISSN 0070-2153.
- ICHIMURA, T. et al. The 14-3-3 protein binds its target proteins with a common site located towards the C-terminus. *FEBS Lett*, v. 413, n. 2, p. 273-6, Aug 1997. ISSN 0014-5793.
- VAN HEMERT, M. J.; STEENSMA, H. Y.; VAN HEUSDEN, G. P. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays*, v. 23, n. 10, p. 936-46, Oct 2001. ISSN 0265-9247.
- MONTEIRO, K. M. et al. Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacystode during infection of its intermediate host. *Proteomics*, v. 10, n. 10, p. 1985-99, May 2010. ISSN 1615-9861.