

INTRODUÇÃO

A hidatidose cística é uma doença crônica parasitária caracterizada pelo desenvolvimento do cisto hidático, fase larval do *Echinococcus granulosus*, nas vísceras de ungulados domésticos e do homem. O cisto hidático é preenchido pelo líquido hidático (LH) e no seu interior desenvolvem-se os protoescolícos, a forma pré-adulta do organismo, infectivos aos hospedeiros definitivos (canídeos).

Diversas proteínas expressas pelo cisto hidático de *E. granulosus* durante a infecção do hospedeiro intermediário já foram identificadas por estudos proteômicos (Monteiro *et al.*, 2010). Entre estas proteínas estão alguns membros da família de proteínas 14-3-3, as quais se destacam por desempenharem papéis centrais em rotas de sinalização eucariótica, regulando funções biológicas complexas por meio de interações com um amplo repertório de proteínas-alvo que apresentam resíduos de serina/treonina fosforilados. As proteínas 14-3-3 já foram descritas e caracterizadas em diversos parasitos, tendo sido apontadas como moléculas de grande relevância para vários destes organismos. Em *E. granulosus*, 5 isoformas das proteínas 14-3-3 (Eg14-3-3) já foram identificadas, sendo 3 proteínas do isótipo ζ e 2 do isótipo ϵ .

Este estudo tem como objetivo caracterizar funcionalmente as proteínas Eg14-3-3. Inicialmente, isso está sendo feito através da identificação de suas proteínas ligantes e da caracterização de seu padrão de expressão no parasito. Com isso, espera-se evidenciar o papel desempenhado por cada isoforma de 14-3-3 na biologia de *E. granulosus*, em especial, nas suas interações com o hospedeiro intermediário.

MATERIAL E MÉTODOS

Extratos protéicos dos componentes do cisto hidático

Cistos bovinos foram puncionados em condições de esterilidade e o material parasitário (protoescolícos, camada germinativa e líquido hidático) foi processado conforme descrito por Monteiro *et al.* (2010). Os extratos foram preparados em tampão contendo inibidores de proteases e Mg-ATP para a fosforilação das proteínas.

Isoformas recombinantes Eg 14-3-3 ζ 2 e Eg 14-3-3 ζ 3

As seqüências codificadoras das proteínas Eg14-3-3 ζ 2 e Eg14-3-3 ζ 3 foram clonadas no vetor pGEX-TEV e expressadas em *E. coli* em fusão com GST (glutationa-S-transferase). As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade e recuperadas por clivagem com a protease TEV.

Imunoblots e imuno-histoquímica

Análises, por imunoblot, dos diferentes componentes do cisto foram realizadas utilizando anti-soros isoforma-específicos produzidos a partir da imunização de coelhos com as isoformas recombinantes livres de GST.

Experimentos preliminares de imuno-histoquímica em protoescolícos por microscópio confocal foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS. Para detecção da proteína-alvo foi utilizado anticorpo secundário (anti IgG de coelho) conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 488 (verde). A marcação de citoesqueleto e núcleo foi feita com Faloidina Alexa Fluor 594 (vermelho) e DAPI-4',6'-diamidino-2-phenylindole (azul), respectivamente.

Eletroforese bidimensional (2-DE) e gel overlay

Para a identificação das proteínas que interagem com as isoformas Eg 14-3-3 ζ 2 e ζ 3 primeiramente extratos de protoescolícos foram resolvidos por 2-DE seguido por experimentos de *gel-overlay* segundo Tabunoki *et al.*, 2008. As isoformas recombinantes foram marcadas com biotina e a interação foi detectada por incubação com conjugado estreptavidina-peroxidase seguida de revelação com reagentes ECL (GE Healthcare).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detecção das isoformas Eg 14-3-3 ζ 2 e ζ 3 nativas nos componentes do cisto hidático

Por experimentos de *western blot* (Figura 1) foi possível detectar a presença das isoformas Eg14-3-3 ζ 2 e ζ 3 nativas em extratos de protoescolícos e camada germinativa. Também foi possível detectar a presença da isoforma Eg14-3-3 ζ 2 em LH porém a isoforma ζ 3 não foi detectada neste componente do cisto.

Os baixos níveis da isoforma ζ 2 no líquido hidático podem estar relacionados a morte celular e liberação do conteúdo citoplasmático no interior do cisto, uma vez que essas proteínas não apresentam peptídeo-sinal não sendo liberadas pelas vias clássicas de secreção celular.

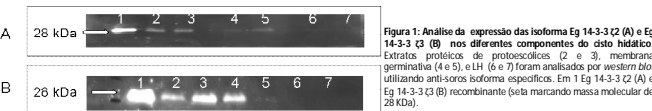


Figura 1: Análise da expressão das isoformas Eg 14-3-3 ζ 2 (A) e Eg 14-3-3 ζ 3 (B) nos diferentes componentes do cisto hidático. Extratos protéicos de protoescolícos (2 e 3), membrana germinativa (4 e 5), e LH (6 e 7) foram analisados por western blot utilizando anti-soros isoforma específicos. Em 1 Eg 14-3-3 ζ 2 (A) e Eg 14-3-3 ζ 3 (B) recombinante (seta marcando massa molecular de 28 kDa).

Análises preliminares do padrão de expressão da isoforma Eg14-3-3 ζ 3 em protoescolícos por imuno-histoquímica revelaram a presença desta isoforma predominantemente no tegumento do parasito (Figura 2A, B e C). Também foi possível detectar a presença da proteína em estruturas distribuídas no corpo do parasito que possivelmente correspondem a células flama, típicas do sistema excretor de platelmintos (Figura 2B e C). Células-flama apresentando núcleo proeminente e feixes de cílios no citoplasma que coram-se com faloidina.

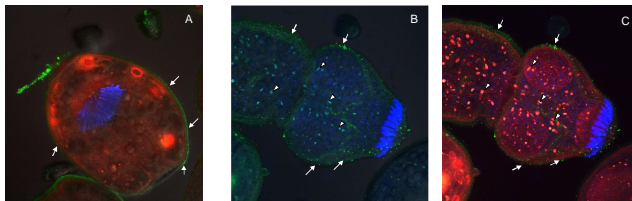


Figura 2: Detecção da isoforma Eg14-3-3 ζ 3 em protoescolícos de *E. granulosus* por imuno-histoquímica associada a microscopia confocal. Proteína nativa detectada por anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (verde), núcleo corado com DAPI (azul) e citoesqueleto corado com faloidina (vermelho). Em A protoescolíco imaginado com a sobreposição das colorações com Faloidina, DAPI e anticorpo. Em B e C protoescolícos evaginados, em B corado com DAPI e anticorpo e em C com a sobreposição de todas as colorações. As setas indicando a presença de Eg14-3-3 ζ 3 no tegumento dos protoescolícos imaginados e evaginados. Em B e C cabeças de seta indicando presença da isoforma Eg 14-3-3 ζ 3 em estruturas distribuídas no corpo do parasito que possivelmente correspondem a células flama. A estrutura em azul que pode ser observada nas figuras corresponde aos ganchos do escolox que apresentam autofluorescência em azul.

Proteínas expostas no tegumento e produtos de excreção e secreção são particularmente importantes na relação parasito-hospedeiro, auxiliando no estabelecimento do parasito, evasão da resposta imune do hospedeiro e estando envolvidas em processos fisiológicos básicos como nutrição do parasito (Thompson, 1995). Assim, a identificação das 14-3-3 no LH, tegumento e em estruturas relacionadas à excreção sugere um possível papel dessas proteínas em mecanismos de interação com o hospedeiro.

Identificação das proteínas de extratos de protoescolícos que interagem com as isoformas Eg14-3-3 ζ 2 e Eg14-3-3 ζ 3

Por meio da combinação de experimentos de *gel-overlay*, 2-DE e espectrometria de massas (MALDI-Tof MS/MS), foi possível constatar que as isoformas Eg14-3-3 ζ 2 e Eg14-3-3 ζ 3 interagem com um amplo repertório de proteínas-alvo presentes nos extratos de protoescolícos. (Figura 3) Até o momento foi possível identificar um total 14 proteínas diferentes que interagem com as isoformas de 14-3-3 estudadas (Tabela1).

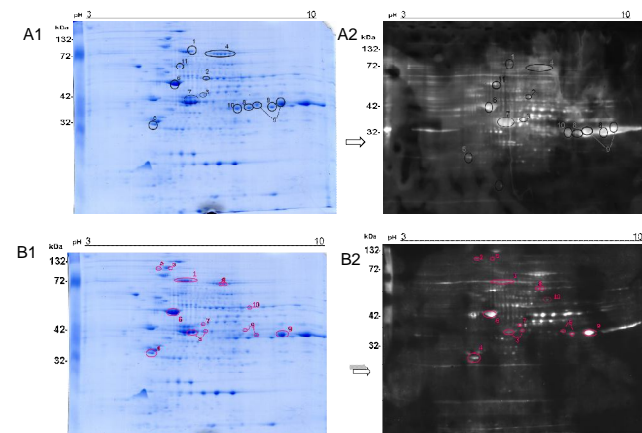


Figura 3: Identificação das proteínas de extrato de protoescolícos que interagem com as isoformas Eg14-3-3 ζ 2 e Eg14-3-3 ζ 3. (A1 e B1) Eletroforese bidimensional de extratos de protoescolícos resolvidos em pH de 3-10 na primeira dimensão seguido por segunda dimensão em SDS-PAGE 12%. Marcador de massa molecular à esquerda. Os spots numerados correspondem as proteínas que interagem com a isoforma ζ 2 (A1) e ζ 3 (B1) em *gel overlay* e identificadas por espectrometria de massas. (A2 e B2) *Gel-overlay* identificando as proteínas que interagem com as isoformas ζ 2 (A2) and ζ 3 (B2) em extratos de protoescolícos.

Tabela1: Proteínas presentes em extratos de protoescolícos que interagem com as isoformas Eg14-3-3 ζ 2 e ζ 3

Spot nº	Proteínas que interagem com a isoforma ζ 2	Spot nº	Proteínas que interagem com a isoforma ζ 3
1	Proteína de choque térmico -70 kDa (HSP70)	1	Proteína de choque térmico -70 kDa (HSP70)
2	Enolase	2	Proteína de choque térmico -90 kDa (HSP90)
3	Aldo-ceto-reductase	3	Proteína de choque térmico -20 kDa (HSP20)
4	Fosfoenolpiruvato-carboxinase (PEPCK)	4	Proteína14-3-3 zeta
5	Proteína 14-3-3 zeta	5	Paramiosina
6	Actina	6	Actina
7	Proteína de choque térmico -20 kDa (HSP20)	7	Aldo-ceto-reductase
8	Malato-desidrogenase	8	Fosfoenolpiruvato-carboxinase (PEPCK)
9	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH)	9	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH)
10	Malato-desidrogenase citoplasmática (MDH)	10	Citrato-sintase
11	Seril-tRNA-sintetase		

Entre as proteínas de protoescolícos identificadas que interagem com as isoformas Eg14-3-3 ζ 2 e Eg14-3-3 ζ 3 estão enzimas da via glicolítica, proteínas de citoesqueleto e proteínas de resistência a estresse. Os resultado obtidos sugerem que essas isoformas estão atuando no parasito regulando funções fisiológicas básicas, uma vez que diversos estudos já demonstraram que essa família de proteínas atua na regulação de ciclo celular, organização de citoesqueleto, resistência a estresse, proliferação e diferenciação celular (Darling *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007).

PERSPECTIVAS

A fim de confirmar os resultados já obtidos, experimentos de imuno-afinidade com as proteínas 14-3-3 recombinantes imobilizadas serão realizados para recuperação dos seus ligantes a partir de extratos dos componentes do cisto hidático de *E. granulosus*. As proteínas de interação recuperadas serão então identificadas por espectrometria de massas.