

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

CYNTHIA MANTOVANI

**PERFIL DA EXPRESSÃO PROTEICA DE LARVAS DE *Hysterothylacium* sp.  
(NEMATODA) DE PEIXE ESPADA (*Trichiurus lepturus*) DA COSTA DO RIO DE  
JANEIRO, BRASIL**

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2014

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Mantovani, Cynthia, 1989-  
M293p Perfil da expressão protéica de larvas  
2014 de *Hysterothylacium* sp. (Nematoda) de peixe espada (*Trichiurus lepturus*) da costa do Rio de Janeiro, Brasil / Cynthia Mantovani.  
– Viçosa, MG, 2014.  
xi, 84f.: il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Cláudio Lisias Mafra de Siqueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.

Referências bibliográficas: f.43-53.

1. Proteômica. 2. Parasitas - Peixe. 3. Nematoda - Peixe. 4.  
*Hysterothylacium*. 5. *Trichiurus lepturus*. I. Siqueira, Cláudio  
Lisias Mafra de. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de  
Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 572.6

Bibliotecário(a) responsável: Fabio Jaderson Miguel Reis CRB6 3030

CYNTHIA MANTOVANI

**PERFIL DA EXPRESSÃO PROTEICA DE LARVAS DE *Hysterothylacium* sp.  
(NEMATODA) DE PEIXE ESPADA (*Trichiurus lepturus*) DA COSTA DO RIO DE  
JANEIRO, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2014

CYNTHIA MANTOVANI

**PERFIL DA EXPRESSÃO PROTEICA DE LARVAS DE *Hysterothylacium* sp.  
(NEMATODA) DE PEIXE ESPADA (*Trichiurus lepturus*) DA COSTA DO RIO DE  
JANEIRO, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de Dezembro de 2014

---

Cláudia Portes Santos Silva  
(Coorientadora)

---

Humberto Josué de Oliveira Ramos  
(Coorientador)

---

Camilo Elber Vital

---

Claudio Lísias Mafra de Siqueira  
(Orientador)

## DEDICATÓRIA

*Ao meu noivo e fiél companheiro Artur,  
à minha fonte de inspiração: meu pai,  
à minha base Vanessa, Karina e Michelle,  
aos demais familiares e amigos*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu pai herói por todo apoio, amor e dedicação, sem ele, com certeza, esse sonho não seria possível.

Ao meu noivo e companheiro Artur pelo incentivo e por me mostrar que tudo é possível, basta querer e se esforçar.

Às minhas queridas irmãs pelo carinho e por não me abandonarem em momento algum.

Ao professor Dr. Cláudio Mafra por me dar essa oportunidade e acreditar na minha capacidade.

À professora Dra. Cláudia Portes e sua equipe pela parceria e por confiar em nossa equipe.

Ao professor Dr. Humberto Ramos, Pedro Vidigal, Camilo e Edvaldo pela ajuda incondicional.

A todos meus queridos amigos de laboratório, em especial, Edvaldo, Rafael, Carlos, Paulo, Ronaldo e Juliana por toda paciência e companheirismo.

A Joyce, Érick, Dona Rita, Airton, Fábio, Fernandinha, Vitória e Cristina pela torcida.

A toda minha família e amigos.

E a Deus, sem ele nada é possível.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. O GÊNERO <i>Hysterothylacium</i> sp. ....	3
2.2. O HOSPEDEIRO .....	5
2.3. ANISAQUIÁSE .....	6
2.4. PROTEÔMICA COMO FERRAMENTA DE ESTUDOS DE NEMATODA.....	7
3. OBJETIVOS.....	11
3.1. OBJETIVO GERAL.....	11
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1. COLETA DA AMOSTRA .....	12
4.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	12
4.3. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	12
4.4. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	13
4.5. SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS POR ELETROFORESE MONODIMENSIONAL (SDS-PAGE-1DE).....	13
4.6. SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (SDS-PAGE-2DE).....	13

4.7. COLORAÇÃO DOS GÉIS OBTIDOS NAS CORRIDAS DE ELETROFORESE SDS-PAGE 1-DE E SDS-PAGE 2-DE.....	14
4.7.1. COLORAÇÃO COM COOMASSIE BLUE G-250.....	14
4.7.2. COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA .....	15
4.8. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	16
4.8.1. DIGESTÃO ENZIMÁTICA.....	16
4.9. ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	16
4.9.1. MALDI-TOF/TOF.....	16
4.9.2. LC-MS/MS.....	17
4.10. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ABORDAGENS COMPUTACIONAIS.....	18
4.10.1. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS BASEADA NA PESQUISA EM BANCO DE DADOS, COM O AUXÍLIO DO ALGORITMO MASCOT.....	18
4.10.1.1. VALIDAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS PELO MASCOT, COM O AUXÍLIO DO APLICATIVO SCAFFOLD.....	18
4.10.1.2. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS PELO BANCO DE DADOS DE NEMATODA E DAS PROTEÍNAS DEPOSITADAS NO NCBI.....	19
4.10.2. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS BASEADA NA ESTRATÉGIA DO SEQUENCIAMENTO <i>DE NOVO</i> , COM O AUXÍLIO DO APLICATIVO PEPNOVO.....	19
4.10.2.1. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS PREDITAS.....	19
4.10.3. OBTENÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO E DA MASSA MOLECULAR DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS, COM O AUXÍLIO DA PLATAFORMA EXPASY.....	19
4.11. PREDIÇÃO E RECONSTRUÇÃO DOS AGRUPAMENTOS DE PROCESSOS BIOLÓGICOS.....	20
5. RESULTADOS.....	22
5.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	22
5.2. RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA ELETROFORESE SDS-PAGE.....	22

5.3. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS BASEADA NA PESQUISA EM BANCO DE DADOS DEPOSITADO NO NCBI <sub>Inr</sub> , COM O AUXÍLIO DO ALGORITMO MASCOT .....	27
5.4. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS BASEADA NA PESQUISA EM BANCO DE DADOS E NA ESTRATÉGIA DO SEQUENCIAMENTO <i>DE NOVO</i> , ALIMENTADOS COM DADOS GERADOS POR LC-MS/MS .....	28
5.5. RECONSTRUÇÃO DAS REDES DE INTERAÇÃO PROTEICA.....	29
6. DISCUSSÃO.....	32
6.1. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	32
6.2. ELETROFORESE SDS-PAGE 1-DE E 2-DE.....	32
6.3. MÉTODOS DE COLORAÇÃO.....	34
6.4. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MALDI-TOF/TOF E LC-MS/MS UTILIZANDO ALGORITMO MASCOT E BANCO DE DADOS NCBI <sub>Inr</sub> .....	34
6.5. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS.....	35
6.5.1. CLUEGO E PROTEÍNAS IDENTIFICADAS.....	36
6.5.2. OUTRAS PROTEÍNAS COM FUNÇÕES RELEVANTES.....	39
7. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
ANEXOS.....	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida <i>Anisakis simplex</i> (FONTE: FAO, 1997).....	4
Figura 2: Processo de extração, quantificação e separação de proteínas.....	15
Figura 3: Procedimento de digestão enzimática, análises por espectrometria de massa e análises utilizando abordagens computacionais.....	20
Figura 4: A – E: Larvas típicas de <i>Hysterothylacium</i> sp., visualizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	22
Figura 5: Eletroforese SDS-PAGE-1-DE da extração realizada com 50 larvas de <i>Hysterothylacium</i> sp. utilizando tampão CHAPS.....	23
Figura 6: Eletroforese SDS-PAGE-1-DE da extração realizada com o <i>pellet</i> remanescente utilizando tampão SDS-PAGE.....	24
Figura 7: Eletroforese SDS-PAGE-1-DE da extração realizada com o <i>pellet</i> remanescente utilizando tampão SDS-PAGE.....	25
Figura 8: Eletroforese SDS-PAGE-1-DE da extração realizada com 50 larvas de <i>Hysterothylacium</i> sp. utilizando tampão SDS-PAGE.....	26
Figura 9: Eletroforese SDS-PAGE-2-DE da extração realizada com 20 larvas de <i>Hysterothylacium</i> sp. utilizando tampão CHAPS.....	27
Figura 10: Ilustração da cobertura resultante de todos os peptídeos detectados da proteína “ <i>Hypothetical protein CBG02161</i> ”.....	29
Figura 11: Resultado da análise com o auxílio do software ClueGo destacando os grupos e os respectivos processos biológicos.....	30

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1: Proteínas identificadas classificadas por grupo (em porcentagem).....	28
Gráfico 2: Número de genes relacionados a cada processo biológico e a porcentagem de genes identificados em relação ao total existente por processo biológico (barra).....	31
Gráfico 3: Distribuição das proteínas identificadas por eletroforese monodimensional e LC-MS/MS em relação aos valores de <i>pI</i> .....	33
Gráfico 4: Distribuição das proteínas identificadas por eletroforese monodimensional e LC-MS/MS em relação aos valores de massa molecular.....	34

## RESUMO

MANTOVANI, Cynthia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2014. **Perfil da expressão proteica de larvas de *Hysterothylacium* sp. (NEMATODA) de peixe espada (*Trichiurus lepturus*) da Costa do Rio de Janeiro, Brasil.** Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Coorientadores: Cláudia Portes Santos Silva e Humberto Josué de Oliveira Ramos

O parasitismo é um fenômeno frequente em ambientes aquáticos, sendo os helmintos com potencial zoonótico comumente encontrados em espécimes de peixes destinados ao consumo humano. Devido ao aumento do consumo de peixes crus ou mal cozidos, são de grande relevância os estudos para melhor conhecer e caracterizar estes parasitos. Atualmente, as parasitoses provenientes do pescado são consideradas emergentes, subestimadas e/ou negligenciadas. Nesse contexto, buscamos, com a utilização de técnicas de espectrometria de massa, identificar as proteínas mais expressadas por larvas de *Hysterothylacium* sp. nematoda pertencente a família Anisakidae, causador da parasitose humana denominada anisaquíase a qual apresenta-se potencialmente letal quando ocasiona manifestação alérgica. As larvas de *Hysterothylacium* sp. analisadas possuíam ceco curto e foram coletadas a partir de peixe espada (*Trichiurus lepturus*) da costa do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Buscou-se, também, descrever as funções e agrupamentos de processos biológicos envolvendo as proteínas mais relevantes. Foram testadas diferentes metodologias de extração, separação de proteínas e espectrometria de massa. Observou-se que, para o procedimento de extração de proteínas, o uso do detergente SDS no tampão permitiu melhores resultados em relação ao tampão de extração CHAPS, este não possibilitou a visualização de bandas no gel de eletroforese monodimensional e, em relação a eletroforese bidimensional, os *spots* apresentaram-se com baixa intensidade, em ambos os casos a análise por espectrometria de massa foi inviável, no entanto, sendo o primeiro detergente inadequado para a eletroforese bidimensional, a análise das proteínas limitou-se à eletroforese monodimensional. Com relação à espectrometria de massa, verificou-se que as análises do LC-MS/MS apresentaram melhores resultados em relação ao MALDI-TOF/TOF. No total foram identificadas 87 proteínas de diversas famílias, dentre as quais julgamos importante citar as metabólicas, estruturais, ribossomais, sinalizadoras, reguladoras, transportadoras e, também, proteínas imunogênicas, segundo literatura, com a classe das ribossomais apresentando-se como a mais expressivas, totalizando 48% das proteínas identificadas. Com o auxílio do aplicativo ClueGo foram preditos 54

processos biológicos e seus agrupamentos. Este é o primeiro relato das bases moleculares de larvas de *Hysterothylacium* sp. relacionadas às vias metabólicas deste parasito utilizando-se como estratégia tecnologia de espectrometria de massa.

## ABSTRACT

MANTOVANI, Cynthia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2014. **Profile of the protein expression of *Hysterothylacium* sp. larvae (NEMATODE) from Sword fish (*Trichiurus lepturus*) of the Rio de Janeiro coast, Brazil.** Adviser: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-Advisers: Cláudia Portes Santos Silva and Humberto Josué de Oliveira Ramos.

The parasitism is a common phenomenon in aquatic environments. Helminths with zoonotic potential are commonly found in specimens of fish intended for human consumption. Due to the increase of the consumption of raw or undercooked fish, it is of great importance to better understand and characterize these parasites. Actually the fish borne parasites are being considered as emerging, underestimated and/or neglected parasitosis. In this context, mass spectrometry techniques was performed in order to identify the proteins most expressed by the larvae of *Hysterothylacium* sp. nematode belonging to Anisakid family, that causes of human parasite called Anisakiasis which presents potentially lethal when causes allergic manifestation. Larvae of *Hysterothylacium* sp. analyzed had short caecum and were collected from Sword fish (*Trichiurus lepturus*) from the Rio de Janeiro coast, Brazil. It was also our goal to describe the functions and groups of biological processes involving relevant proteins. Different extraction methods were tested for protein segregation and mass spectrometry. It was observed that, for the protein extraction procedure using SDS extraction buffer showed better results compared to the CHAPS extraction buffer, this has not allowed the visualization of bands on one-dimensional gel electrophoresis and in the two-dimensional electrophoresis the spots presented with low intensity, in both the analyses by mass spectrometry were inviable, however, the first detergent is inappropriate for two-dimensional electrophoresis, the protein analysis was limited to one-dimensional electrophoresis. Using the mass spectrometry, it was found that the analysis of LC-MS/MS showed better results in comparison with MALDI-TOF/TOF. A total of 87 proteins from different families were found, among which it was considered important to mention the metabolic, structural, ribosomal, signaling, regulatory, carriers, and, also, immunogenic proteins, according to the literature, with the class of ribosomal presenting itself as the most significant, totaling 48% of the identified proteins. Using the ClueGo application, 54 biological processes were predicted as well their interaction networks. This is the first report of the molecular basis of *Hysterothylacium* sp larvae related to their metabolic pathways, using as research strategy proteomic technology.

## 1. INTRODUÇÃO

O parasitismo é uma relação entre dois seres vivos onde, para um, haverá consequências positivas (parasito) e, para o outro, consequências negativas (hospedeiro) (Pérez-arellano *et al.*, 2006). É um fenômeno natural em ecossistemas aquáticos, sendo frequente o achado de parasitos em peixes destinados ao consumo humano (Gonzalez *et al.*, 2001). Nesse contexto, considerando o aumento do cultivo e comercialização de organismos aquáticos, é crescente a importância de estudos relacionados aos parasitos e outros patógenos que utilizam tais organismos como hospedeiros (Luque, 2004).

Em constante crescimento, a produção de pescado no Brasil, apresentou, apenas no período entre 2008 e 2011, um incremento da ordem de 9,37%, passando de 1.156.423 (Brasil, 2010) para 1.264.765 toneladas (Brasil, 2011).

Tendo em vista ser comum o achado de parasitos em peixes destinados ao consumo humano e sua relevância sanitária e comercial, enfatiza-se a importância do estabelecimento de medidas de controle desses organismos (Gonzalez *et al.*, 2001). Estudo realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que cerca de 39 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas por parasitos adquiridos pela ingestão de peixes ou crustáceos crus ou mal cozidos, estando a maioria destes casos localizados na Ásia, sendo também de ocorrência na Europa e na América Latina (FAO, 2000).

Com um consumo *per capita* aparente de pescado no Brasil de 9,75Kg/hab/ano em 2010, apresentando um aumento de 8% em relação ao ano anterior (Brasil, 2010), verificou-se um crescente aumento no consumo de peixes crus ou mal cozidos, alertando as autoridades sanitárias e pesquisadores da necessidade de se avaliar riscos relacionados a esse hábito alimentar, considerando-se o potencial zoonótico desses parasitos (Benigno, 2012).

Dentre os parasitos de peixes, larvas de Nematoda da família Anisakidae Skrjabin & Karokhin, 1945 podem causar Anisakiase, uma parasitose humana (Acha e Szyfres, 2003). Nos peixes, estas larvas podem invadir o fígado, gônadas, mesentério e musculatura, podendo ocasionar sérias patologias ao seu hospedeiro, principalmente, quando em grande número (Okumura *et al.*, 1999). Nessa família, podemos destacar alguns gêneros como de maior importância e/ou ocorrência considerando o potencial zoonótico dos mesmos. Dentre estes, o *Hysterothylacium* Ward & Magath, 1917 é de grande importância, com relatos de achados por diversos autores. Em Granada, Espanha, espécimes de *Trachurus trachurus* apresentaram

parasitos de *Hysterothylacium aduncum* Rudolphi, 1802 no estágio larval L3 e *Hysterothylacium* sp. no estágio larval L4 (Adroher *et al.*, 1996). Navone *et al.* (1998) detectaram larvas e adultos de *H. aduncum* em peixes e crustáceos coletados na costa Argentina. Em peixes comercializados no estado do Rio de Janeiro, há diversos relatos de ocorrência desses parasitos. Fontenelle *et al.* (2013) encontraram espécies de Nematoda *Hysterothylacium deardorffoverstreetorum* Knoff *et al.* 2007, o qual possui importância zoonótica, em peixes da espécie *Cynoscion guatucupa*. No entanto, Borges *et al.* (2012) ao estudarem através de métodos morfológicos e moleculares os Nematoda de *Trichiurus lepturus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Trichiuridae) referiram a ocorrência de larvas de *Hysterothylacium* sp. evidenciando que a descrição de *H. deardorffoverstreetorum* incluiu na verdade um pool de espécimes pertencentes a dois clados sob um mesmo nome. Nesse contexto, a compreensão da taxonomia, ecologia e filogenia dos Anisakidae são de extrema importância, tendo técnicas moleculares contribuído para tal nas últimas duas décadas (Mattiucci & Nascetti, 2008).

Com base no trabalho de Borges *et al.* (2012), foi possível diferenciar os dois tipos de larvas de *Hysterothylacium* sp. que parasitam *T. lepturus* e selecionar o grupo mais abundante como foco deste estudo. Visando aprofundar o conhecimento dos aspectos moleculares destes parasitos com potencial zoonótico, propusemos a identificação e caracterização das proteínas mais expressas destas larvas de *Hysterothylacium* sp. coletadas em peixes *T. lepturus* comercializados na cidade do Rio de Janeiro, com o auxílio de técnicas de espectrometria de massa buscando, dessa maneira, além da implementação do conhecimento, a identificação de proteínas de grande relevância biológica, bem como, proteínas com características imunogênicas. Adicionalmente, propusemos investigar maiores informações em relação aos processos biológicos as quais essas proteínas estão envolvidas agregando conhecimento acerca de vias metabólicas e estratégicas biológicas utilizadas por esses parasitos.

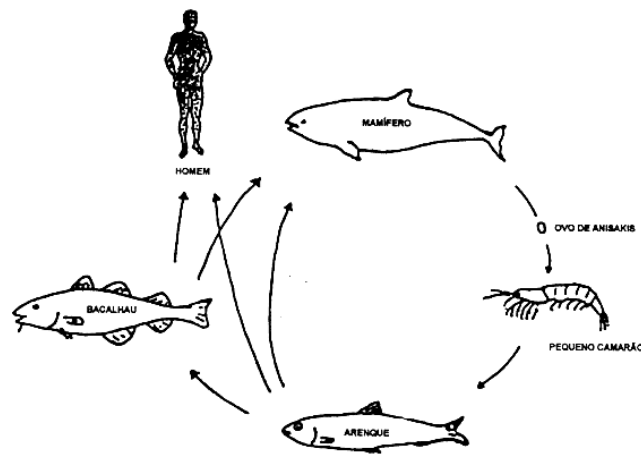
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O GÊNERO *Hysterothylacium*

O gênero *Hysterothylacium* é um grupo grande e diversificado dentro da família Anisakidae (Li *et al.*, 2012), possuindo aproximadamente 66 espécies descritas (Rossin *et al.*, 2011). Quando em estágio de larva, esses parasitos não apresentam especificidade parasitária, estando presentes em diferentes espécies de peixes, com grande distribuição no ecossistema marinho (Shamsi *et al.*, 2013).

Diversos autores têm publicado relatos de *Hysterothylacium* ocorrendo como parasitos de grande prevalência e abundância em variadas espécies de peixes. Em estudo realizado com 80 espécimes de *Prionotus punctatus*, Bicudo *et al.* (2005) coletaram 877 *Hysterothylacium* sp. perfazendo um total de 45,6% dos parasitos coletados, os quais apresentaram, também, maiores índices de prevalência (97,5%) e abundância ( $10,96 \pm 11,16$ ). Sabas & Luque (2003) também observaram elevada prevalência e abundância de *Hysterothylacium* sp. avaliando espécimes de *C. guatucupa* (prevalência 83,8%; abundância  $32,8 \pm 77$ ) e *Macrodon ancylodon* (prevalência 74,3%; abundância  $4,0 \pm 4,5$ ). Felizardo *et al.* (2009) encontraram 1.820 larvas (L3 e L4) de *Hysterothylacium* sp. em 60 espécimes de *Paralichthys isosceles*.

Em geral, parasitos da família Anisakidae apresentam crustáceos como primeiro hospedeiro intermediário, sendo peixes, aves ou mamíferos aquáticos seus hospedeiros definitivos (Pérez, 1999), com diversas destas situações ainda não completamente esclarecidas com relação aos hospedeiros definitivos envolvidos (Neves, 2009). Possuindo quatro estádios de desenvolvimento larval antes de atingir o estágio adulto, com troca da cutícula externa ao longo de seu crescimento, estes parasitos iniciam seu ciclo de desenvolvimento com a liberação de ovos nas fezes do hospedeiro vertebrado, seguida da formação de larvas de segundo estágio (L2) na água, as quais são ingeridas por pequenos crustáceos, que atuam como hospedeiros intermediários. Nestes, formam-se larvas de terceiro estágio (L3) que, quando ingeridos por um peixe, acumulam-se e encistam-se em seu interior (Acha & Szyfres, 2003) (Figura 1).



**Figura 1:** Ciclo de vida *Anisakis simplex* (FONTE: FAO, 1997)

Koie (1993) investigou o desenvolvimento de *H. aduncum*, observando que as duas primeiras mudas deste helminto ocorrem dentro do ovo, o qual normalmente não eclode espontaneamente. A seguir, suas larvas se desenvolvem em larvas de terceiro estágio em copépodes harpaticoida, amphipodas, isópodes e misidáceos, sendo este desenvolvimento, de acordo com este autor, dependente do tamanho das larvas, não sobrevivendo quando menores que 2mm. As larvas apresentando entre 2 a 3 mm permaneceram no terceiro estágio, com as maiores que 3mm sofrendo muda, e atingindo o 4º estágio no lúmen intestinal do peixe.

Assim, esse parasito poderá apresentar um ciclo com dois hospedeiros, quando o peixe se alimenta de um crustáceo infectado com larvas de 3º estágio maiores que 3mm; e um ciclo com três, ou mais, hospedeiros, quando o peixe se alimentar de um crustáceo infectado com larvas de 3º estágio menores que 3mm. No entanto, alguns autores questionam este ciclo. Balbuena, *et al.*, 1998 publicaram nota contra a evidência de que ovos desta espécie não eclodem espontaneamente e, também, de que larvas provindas dessa eclosão apresentam menor habilidade em infectar o primeiro hospedeiro intermediário. São considerados relativamente difíceis a execução de estudos quanto a biologia e ciclos de vida de metazoários parasitos marinhos (Klimpel & Rückert, 2005).

Além destas limitações, temos ainda a identificação ao nível de espécie de larvas desse grupo utilizando apenas características taxonômicas, como um grande problema, devido, por exemplo, à similaridade entre os órgãos (Li *et al.*, 2012). A correta identificação da espécie é de extrema importância para o estudo da epidemiologia parasitária, tendo sido

aprimorada nos últimos anos com a utilização de técnicas proteômicas e moleculares (Kijewska *et al.*, 2002).

Borges *et al.* (2012) realizaram a técnica de PCR em 361 espécimens de *Hysterothylacium* sp. obtidos da necropsia de 64 peixes *T. lepturus* capturados na costa do Rio de Janeiro, amplificando as regiões mtDNA *cox-2*, LSU e ITS, confrontando as sequências obtidas contra sequências de *H. deardorffoverstreetorum*. Pelas análises filogenéticas realizadas, relataram a presença de dois clados sob um mesmo nome, indicando a possibilidade de que sob este mesmo táxon possa haver mais de uma espécie.

Shamsi *et al.* (2013) caracterizaram morfologicamente e utilizaram a PCR em amostras de larvas de *Hysterothylacium* provindas de 20 diferentes espécies de peixes na Austrália, relatando o achado de sete novos tipos morfológicos, acabando por descobrir que, dentre os tipos morfológicos, um único tipo apresentou dois genótipos, ilustrando a dificuldade da identificação desse parasito apenas pelas características morfológicas.

Adicionalmente às diversas descobertas em relação a esses parasitos, em 2009, Raffel & Anderson descreveram uma nova espécie de *Hysterothylacium* em estômago do anfíbio *Notophthalmus viridescens* (Rafinesque, 1820), proveniente da Pensilvânia, EUA.

## 2.2. O HOSPEDEIRO

O peixe-espada *T. lepturus* é pertencente à família Trichiuridae. De hábito demerso-pelágico (Haiovici *et al.*, 1994), esta espécie possui característica cosmopolita, estando distribuída em águas quentes e temperadas (Bittar *et al.*, 2008), com maior abundância em temperaturas acima de 16°C, ocorrendo principalmente na faixa de profundidade entre 40-120m (Martins & Haimovici, 1996), com salinidades entre 33 e 36ppm (Bittar *et al.*, 2008). Quanto à ocorrência, do final da primavera ao outono, peixes juvenis (5-30cm) são encontrados em águas costeiras, com subadultos (30-70cm) principalmente em águas de plataformas internas e adultos (> 70 cm) em águas costeiras e em águas de plataformas internas e externas (Martins & Haimovici, 1996). Durante o inverno, fêmeas adultas permanecem na região da plataforma continental para se alimentarem, com os machos, movimentando-se para o norte em busca de águas mais quentes (Martins e Haimovici, 2000).

Em relação aos hábitos alimentares dessa espécie de peixe, os jovens ou imaturos alimentam-se, principalmente, de pequenos crustáceos planctônicos pelágicos e pequenos peixes, tornando-se mais piscívoros quando adultos (FAO, 2014). Em estudo realizado na

costa norte do estado do Rio de Janeiro, Bittar *et al.* (2008) concluíram que os itens mais representativos na dieta de adultos são outros peixes e crustáceos, sendo também registrado o canibalismo.

De grande importância comercial, sua pesca atingiu 1.418,944t em 1999, com China e Coréia do Sul apresentando os maiores índices de pesca desse peixe nesse mesmo ano. Em 2012 o volume total de captura de *T. lepturus* foi 1.235.373t (FAO, 2014).

### 2.3. ANISAQUIÁSE

Esta enfermidade é causada pela infecção por estádios larvais de Nematoda da família Anisakidae (Acha & Szyfres, 2003), sendo a ocorrência em humanos considerada como acidental no desenvolvimento destes parasitos (Chai *et al.*, 2005). De acordo com Matiucci *et al.* (2011), a identificação e detecção desta enfermidade é difícil devido à falta de conhecimento sobre suas características, podendo ser ressaltada a ausência de especificidade de seus sintomas e sinais clínicos. Esta situação é agravada pela baixa disponibilidade de casos para diagnóstico de lesões ocasionadas pela invasão das larvas destes parasitos, e a falta de características morfológicas para a diferenciação das larvas.

Até o momento, os sintomas e sinais clínicos conhecidos da anisiquiase humana indicam variação de acordo com a área do trato digestório onde se prendem as larvas, sendo os sintomas frequentemente confundidos com os relacionados à obstrução intestinal, apendicite, peritonite e enfermidade de Crohn (Zuloaga *et al.*, 2004), podendo ainda vir a ocasionar manifestações alérgicas mediadas por IgE (Geller & Geller, 1999), as quais podem apresentar-se de forma potencialmente letal (Audicana *et al.*, 2002).

No passado, esses achados limitavam-se a países de baixa renda média. No entanto, com o crescimento dos mercados internacionais, a melhoria de sistemas de transporte e incremento na movimentação das populações, verificou-se marcada alteração do perfil dos pacientes acometidos, com aumento das populações em risco e avanço de seus limites geográficos (Chai *et al.*, 2005).

No Japão e nos EUA, novos casos de anisiquiase são anualmente diagnosticados, *c.*2000 e *c.*50, respectivamente, com *c.*500 casos anualmente relatados na Europa (Audicana, *et al.*, 2002). Quanto ao desenvolvimento em humanos, em 1996 ocorreu o relato de caso de uma fêmea adulta jovem de *H. aduncum* excretada nas fezes de um homem que apresentava clinicamente um quadro caracterizado por diarreia e dores abdominais, ilustrando a

capacidade deste parasito infectar humanos (Yagi *et al.*, 1996). Em experimento realizado com inoculação de *Hysterothylacium* sp. em *Macaca mulatta*, verificou-se que poucas horas após a inoculação, as larvas penetraram na parede estomacal, causando hemorragia e atraindo eosinófilos (Overstreet & Meyer, 1981).

#### 2.4. PROTEÔMICA COMO FERRAMENTA DE ESTUDOS DE NEMATODA

O proteoma é o conjunto de proteínas expressadas, num dado momento, em um compartimento biológico, sob um conjunto específico de condições, sendo sua caracterização molecular necessária para o entendimento completo dos sistemas biológicos (Beranova-Giorgianni, 2003). Assim, a análise abrangente e em larga escala de proteínas é o objetivo da proteômica, sendo um procedimento que possibilita diferentes abordagens, tais como: (a) identificação de proteínas em células, tecidos e fluídos biológicos; (b) análise das alterações na expressão proteica e células/órgãos normais ou doentes; (c) caracterização de modificações pós-traducionais e estudos das interações proteína-proteína; (d) compreensão dos mecanismos moleculares que governam os processos celulares; (e) caracterização de interações complexas entre proteínas e suas perturbações; (f) descoberta de proteínas biomarcadoras para detecção e diagnóstico de doenças; e (g) identificação de proteínas alvos para o desenvolvimento de fármacos para usos terapêuticos (Beranova-Giorgianni, 2003).

Dentre as etapas para as análises proteômicas por eletroforese bidimensional, destacam-se como principais: a extração de proteínas a partir das amostras, separação de proteínas por eletroforese, com a digitalização dos géis obtidos a partir da eletroforese, determinação de atributos específicos de proteínas de interesse pela espectrometria de massa e pesquisa em banco de dados biológicos. Dentre as técnicas comumente utilizadas nos estudos proteômicos, a eletroforese bidimensional (SDS-PAGE 2DE) apresenta-se como uma poderosa ferramenta para a separação de proteínas, permitindo a separação em duas dimensões, diferentemente da eletroforese monodimensional a qual separa as proteínas somente por massa molecular. A primeira dimensão denominada focalização isoelétrica, baseia-se na separação das proteínas segundo suas cargas elétricas; seguida pela segunda dimensão, denominada eletroforese, a qual promove a separação das mesmas proteínas, ortogonalmente, conforme suas massas moleculares (Beranova-Giorgianni, 2003).

O espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF possui uma fonte de ionização do tipo MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*) e analisadores tipo TOF-TOF (*Time-of-flight/Time-of-flight*). A ionização de peptídeos é baseada em pulso de laser, a qual decorre da

colisão do feixe de laser com o cristal sólido, formado pela adsorção entre o analito com uma matriz ácida apropriada, levando a transferência de um ou mais prótons da matriz para o analito, deixando-o carregado positivamente (Abdelnur, 2011). A seguir, sob a condição de alto vácuo, as moléculas ionizadas são conduzidas ao detector, com tempos diferentes para cada molécula sair da fonte de ionização e chegar ao detector, significando na prática que moléculas de menores massas chegarão primeiro em relação as de maiores massas. Portanto, após a análise das moléculas, o tempo que cada uma gastou para chegar ao detector é traduzido para a razão massa/carga ( $m/z$ ), ou seja, a massa molecular do analito, dividida pelo número de cargas que o mesmo foi capaz de captar. Após o procedimento de aquisição de dados, os mesmos são demonstrados em um gráfico, que representa em seu eixo “y” a intensidade relativa de cada íon, expressa em unidade arbitrária, e no eixo “x” a razão  $m/z$  de cada íon, expressa em Daltons. Cada gráfico é denominado espectro de massas, tendo os íons representados por picos (Pasternak, 2012). Esse instrumento combina a vantagem de alta sensibilidade para análises de peptídeos associadas com a forma de ionização por MALDI (Medzihradzky, 2000).

Em Nematoda, a eletroforese bidimensional apresentou bons resultados em trabalhos relacionados à investigação de proteínas. Abebe *et al.* (2002) obtiveram os perfis proteicos de *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum*, o que possibilitou a identificação de seis proteínas específicas em *A. lumbricoides*, provando ser essa ferramenta útil para distinção de espécies próximas. O perfil proteico gerado por eletroforese bidimensional, em material obtido a partir de adultos de *A. suum*, submetidos a condições aeróbicas e anaeróbicas, permitiu a identificação de duas proteínas específicas no perfil aeróbico e três específicas no perfil anaeróbico (Islam *et al.*, 2004).

Segundo Yew *et al.* (2003), a utilização de MALDI-TOF/TOF para a rápida caracterização de baixíssimas quantidades de peptídeos diretamente do tecido de *A. suum* mostrou-se uma técnica eficaz para o sequenciamento *de-novo* de neuropeptídeos desse parasito.

Técnicas proteômicas também podem ser associadas a testes de imunização (técnicas imunoproteômicas), apresentando uma importância adicional. Yan *et al.* (2010) utilizaram a eletroforese bidimensional para a obtenção de perfis proteicos de *Haemonchus contortus*, aplicando, subsequentemente, a metodologia de *western blot* para detecção de proteínas imunogênicas, das quais 23 *spots* foram identificando por MALDI-TOF e MALDI-TOF/TOF.

Outra técnica, o LC-MS/MS é o resultado do acoplamento da cromatografia líquida à análise por espectrometria de massa em *tandem*, permitindo a análise de uma mistura proteica altamente complexa (Peng *et al.*, 2002). Nesta técnica, a ionização ocorre por eletro-*spray* onde, sob condições ácidas, os peptídeos são protonados nas porções N-terminais primárias, juntamente com os grupos laterais básicos de lisina, arginina e histidina, resultando em espécies de cargas múltiplas (Garbis *et al.*, 2005).

Kiel *et al* (2007) associaram MALDI-TOF/TOF e LC-MS/MS para a análise dos *spots* obtidos por eletroforese bidimensional e *western blot* de proteínas provenientes de larvas L3 de *Trichostrongylus colubriformis*, caracterizando um total de 28 proteínas. Com o auxílio do LC-MS/MS e eletroforese bidimensional, Hewitson *et al.* (2008) detectaram 82 proteínas no secretoma-excretoma proveniente da infecção causada pelo parasito *Brugia*, destas 80 pertencentes a *B. malayi* e duas pertencentes ao hospedeiro. Moreno & Geary (2008) avaliando este parasito, conseguiram identificar 228 proteínas utilizando LC-MS/MS e eletroforese monodimensional.

Além dos trabalhos envolvendo as técnicas individualmente, diferentes combinações de abordagens proteômicas podem ser utilizadas, considerando as várias metodologias de separação proteica e os vários modelos de espectrômetros de massa disponíveis, os quais variam, quanto à eficiência de análise, de acordo com o objetivo e o material biológico a ser estudado. Nesse contexto, tem-se a proteômica como uma ferramenta auxiliadora em estudos com material biológico de Nematoda. Dentre exemplos de estudos realizados, podem ser citados a obtenção de perfis proteicos de *Caenorhabditis elegans* (Kaji *et al.*, 2000); a descoberta de variabilidade proteica em *Meloidogyne* spp. (Narvas *et al.*, 2002); as análises das proteínas excretadas e secretadas por larvas L1 de *Trichinella spiralis* (Robinson & Connolly, 2005); o isolamento e a análise estrutural de três glicoesfingolipídios à partir de populações de *C.elegans* (Gerdt *et al.*, 1997); a detecção de proteínas imunogênicas; e a obtenção de perfis proteicos para proteômica comparativa, dentre muitos outros.

A importância e o poder de técnicas proteômicas é evidente na ampla investigação das proteínas e seus sistemas biológicos, seja organismo, célula, tecido ou a relação de um parasito com seu hospedeiro, com a aplicação em estudos envolvendo Nematoda apresentando bons resultados, o que estimulou esta abordagem, inédita, em larvas de *Hysterothylacium* sp. Buscou-se a ampliação do conhecimento acerca das bases moleculares desse parasito investigando suas proteínas mais expressas baseando-se, também, no possível

achado de proteínas com importância imunogênica em vista a ser este um parasito com potencial zoonótico.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Obter informações acerca das bases moleculares de parasitos do gênero *Hysterothylacium* por meio de ferramentas da proteômica.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- \* Avaliar, quanto a eficácia em relação às larvas de *Hysterothylacium* sp., diferentes abordagens proteômicas para a extração, separação e análise de proteínas totais;
- \* Identificar as proteínas mais abundantes das larvas de *Hysterothylacium* sp.;
- \* Discorrer sobre a função e a importância das proteínas mais relevantes expressadas por larvas de *Hysterothylacium* sp.;
- \* Predizer e identificar agrupamentos de processos biológicos dos quais as proteínas expressadas por larvas de *Hysterothylacium* sp. participam.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. COLETA DA AMOSTRA

Espécimes de peixes espada *Trichiurus lepturus* comercializados no Rio de Janeiro, foram necropsiados utilizando microscópio estereoscópico modelo SZ61 (Olympus, EUA), analisando-se a cavidade abdominal, o estômago, o intestino, o fígado e a musculatura. Um total de 170 larvas de *Hysterothylacium* sp. encistadas no mesentário foram retiradas, sendo armazenadas em álcool 70% e posteriormente identificadas com o auxílio de um microscópio modelo CX31 (Olympus, EUA) onde buscou-se observar a presença de esôfago claviforme, de ventrículo pequeno e arredondado, do ceco intestinal curto e cauda longa, digitiforme com um único espinho (*mucron*).

### 4.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Três larvas de *Hystertothylacium* sp. foram aleatoriamente selecionadas para o procedimento de microscopia eletrônica de varredura. Inicialmente, as larvas foram desidratadas em séries graduais de solução de etanol (80% por uma hora, 90% *overnight* e duas vezes 100% por uma hora) à temperatura ambiente. À seguir, as larvas foram levadas ao ponto crítico utilizando equipamento modelo CPD 030 (Bal-tec, Alemanha), usando dióxido de carbono líquido como solvente para a remoção dos resquícios de etanol e água da amostra. Posteriormente as amostras foram montadas em suporte e revestidas com ouro (aproximadamente 15nm de espessura) com auxílio de um metalizador FDU 010 (Balzers, Alemanha). O exame das amostras foi realizado em microscópio eletrônico de varredura, modelo 1430 VP (Leo Electron Microscopy Ltd, Inglaterra).

### 4.3. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Para a extração de proteínas totais foram utilizados dois diferentes tampões de extração: tampão SDS-PAGE (0,125M Tris-HCl, 4% SDS, 20% v/v Glicerol, 0,2M DTT, 0,02% Azul de bromofenol) e tampão CHAPS (7M uréia, 2M tiouréia e 2% CHAPS). Todas as amostras foram sonicadas cinco vezes utilizando amplitude de 60Hz, seguido de centrifugação a 14.000 g por 15min, sendo o sobrenadante passado para um novo tubo.

Com tampão CHAPS foram realizadas extrações com 20 e com 50 larvas de *Hysterothylacium* sp., com o tampão SDS-PAGE foram realizadas extração com o material remanescente (*pellets*) das extrações com tampão CHAPS e com 50 larvas de *Hysterothylacium* sp.

#### 4.4. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A quantificação de proteínas foi aferida por meio do método de Bradford (1976), utilizando placa de 96 poços e espectrofotômetro modelo Multiskan GO (Thermo Scientific, EUA) com a leitura em 595nm. Como proteína padrão para a obtenção da curva de calibração utilizou-se soro-albumina bovina (BSA), sendo a quantificação realizada apenas em amostras com tampão CHAPS.

#### 4.5. SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS POR ELETROFORESE MONODIMENSIONAL (SDS-PAGE-1DE)

Realizou-se eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970) monodimensional utilizando-se gel de poliacrilamida, na concentração de 12,5% para o gel de resolução e 4% para o gel de empilhamento. Como massa molecular de referência, utilizou-se padrão de massa molecular como a seguir: fosforilase b (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 kDa) (GE Healthcare, Reino Unido).

Para a verificação da integridade das proteínas existentes nos extratos proteicos, procedimentos de eletroforese monodimensional foram realizados. Todas as corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema de eletroforese Mini Protean, Tetra Cell (Bio-Rad, EUA), o qual foi preenchido com um tampão de corrida Tris-Glicina-SDS (Tris 0,025M, Glicina 0,192M, SDS 0,1%, pH 8.3). As corridas eletroforéticas foram submetidas à tensão constante de 80V por aproximadamente 2h.

#### 4.6. SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (SDS-PAGE-2DE)

No processo de eletroforese bidimensional, a primeira dimensão, denominada focalização isoelétrica (IEF), foi realizado no equipamento modelo Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, Suécia), em fita de 7cm de comprimento, na faixa de pH entre 3 e 10. Para a reidratação foram utilizados solução Destreak<sup>®</sup> (GE Healthcare, Reino Unido) e IPGBuffer (2%) na mesma faixa de pH. A reidratação foi realizada em bandeja própria do aparato IPGbox (GE Healthcare, Suécia), durante 20 horas, à temperatura ambiente. A IEF foi realizada em amperagem máxima de 50 $\mu$ A por tira, com a seguinte programação: 300V em *step* por 12 horas; 1000V em gradiente por 30 minutos; 5000V em gradiente acumulando 4000Vhr; 5000V em *step* acumulando 2000Vhr; e, 200V em *step* por 10 horas. Após esta

etapa a tira foi armazenada sob a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até uso. Antes da segunda dimensão, denominada eletroforese, a tira foi reduzida, usando DTT 1% (m/v), solubilizado em 5mL de solução de equilíbrio (Ureia 6M; Tris 75mM; Glicerol 29,3% (v/v); SDS 2%; azul de bromofenol 0,002% (m/v); e, água ultra pura), sob agitação, durante 30 minutos. A seguir, a tira foi alquilada, usando iodoacetamida 2,5% (m/v) solubilizada em 5mL de solução de equilíbrio, durante 30 minutos. Então, a tira foi colocada no topo do gel de SDS-PAGE 12,5%, juntamente com um pedaço de papel de filtro, embebido com 5 $\mu\text{L}$  de padrão de massa molecular, ambos selados com solução de agarose (Tris 2,5mM; Glicina 19,2mM; SDS 0,01% (m/v); agarose 0,5% (m/v); azul de bromofenol 0,002% (m/v) e água ultra-pura). O processo de eletroforese foi realizado em sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio Rad, EUA), sendo o gel submetido a 80 volts de forma constante, por aproximadamente três horas (Handbooks GE Healthcare, 2004).

#### 4.7. COLORAÇÃO DOS GÉIS OBTIDOS NAS CORRIDAS DE ELETROFORESE SDS-PAGE 1-DE E SDS-PAGE 2-DE

Nessa etapa, os géis foram submetidos ao método de coloração com o azul de Coomassie Brilhante G-250 (item 4.7.1), sendo apenas um gel submetido à metodologia de coloração por nitrato de prata (item 4.7.2). A utilização de dois métodos de coloração foi escolhida com o intuito de observar o perfil da distribuição das bandas detectadas por dois métodos diferentes, de maneira a permitir traçar uma estratégia de excisão das bandas e posterior submissão ao processo de digestão enzimática.

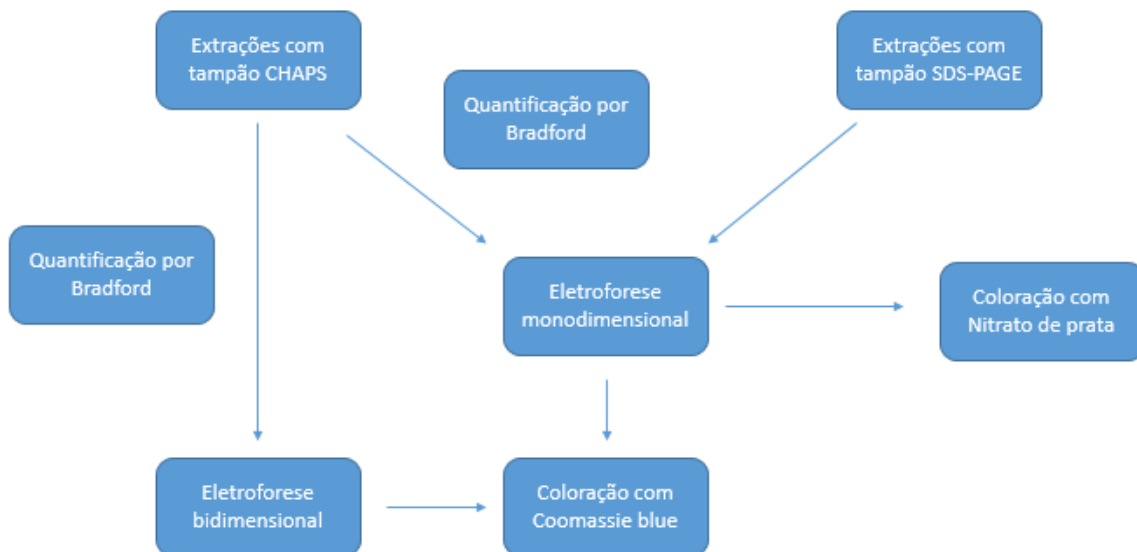
##### 4.7.1. COLORAÇÃO COM COOMASSIE BLUE G-250

Logo após a corrida, os géis foram lavados três vezes com água ultrapura, sendo mantido sob agitação, em solução de fixação (Etanol P.A 40% (v/v); Ácido acético P.A 10%(v/v)), *overnight*. Após a fixação, os géis foram lavados três vezes em água ultrapura, seguido de coloração durante três dias, sob agitação, em solução de Coomassie Blue G-250 (sulfato de amônio 8% (m/v); ácido fosfórico 0,8% (m/v); azul de Coomassie coloidal g-250 0,08% (m/v); e metanol 20% (v/v)). O excesso de Coomassie Blue G-250 foi retirado com água ultrapura, sob agitação, por 30', sendo os géis mantidos em solução de ácido acético 5% até a excisão dos *spots* e das bandas, conforme orientação do fabricante (Handbooks – GE Healthcare, 2004).

#### 4.7.2. COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA

A coloração com nitrato de prata foi realizada conforme protocolo descrito por Schägger (2006). Brevemente, o gel foi lavado três vezes com água ultrapura. Em seguida, o mesmo foi incubado em solução de fixação (Metanol 50%, ácido acético 10% e acetato de amônio 100mM) por 60 minutos e lavado duas vezes com água ultra-pura pelo período de 60 minutos cada lavagem. A seguir, procedeu-se a sensibilização do gel fixado com tiosulfato de sódio a 0,005% ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) por 60 minutos, incubando-o com nitrato de prata a 0,1% por 60 minutos e lavando-o com água ultrapura por alguns segundos. Após essa etapa, o gel foi incubado em solução de revelação (Formaldeído 0,036% e carbonato de sódio 2%) por um período de 1 a 2 minutos, sob agitação, sendo a reação de revelação paralisada pela adição de solução de EDTA 50mM por 2 a 5 minutos. Finalmente, o gel foi lavado duas vezes com água ultrapura por um período de 60 minutos cada lavagem.

As extrações, quantificações de proteínas totais, corridas eletroforéticas e colocação, estão resumidamente esquematizados na Figura 2.



**Figura 2:** Esquema do processo de extração, quantificação de proteínas totais, corridas eletroforéticas e coloração.

## 4.8. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

### 4.8.1. DIGESTÃO ENZIMÁTICA

Em seguida, todos os fragmentos excisados foram descorados com solução acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25mM, reduzidos com ditioneitol 65mM e alquilados com iodoacetamida 200mM, sendo tripsinizados, utilizando-se a tripsina comercial proveniente do pâncreas suíno, com pureza para análises proteômicas e tratada com TPCK (SIGMA, EUA), incubados à 37°C por um período de 20h. O sobrenadante foi recuperado em um tubo novo, no qual a solução foi totalmente seca com auxílio de centrífuga a vácuo (Eppendorf, Alemanha), sendo os tubos armazenados a -20°C até análise posterior por espectrometria de massa (Shevchenko *et al.* 2006).

## 4.9. ESPECTROMETRIA DE MASSA

### 4.9.1. MALDI-TOF/TOF

Os peptídeos trípticos de todas as amostras foram ressuspensos em 20µL de acetonitrila 50%, acidificada com ácido trifluoroacético 0,1%. A matriz utilizada foi o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA (Bruker Daltonics, Alemanha), solubilizada na mesma solução da qual os peptídeos trípticos foram ressuspensos, para uma concentração final de 10mg/mL. Para calibração do método de análise MS1 foram utilizados peptídeos padrões (*Peptide Calibration Standard II*) (Bruker Daltonics, Alemanha). A seguir, as amostras foram aplicadas em placa própria para MALDI-TOF/TOF, Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo a etapa realizada de forma manual e em duplicata com adição de 1µL de amostra e 1µL de matriz para cada *spot*.

Para obtenção dos dados de MS1 utilizou-se o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500-5000 Da. Para a realização de MS2, usando o método LIFT no modo positivo, foram selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga (m/z).

Todos os dados obtidos foram gerenciados pelo *software* Flexcontrol, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros resultantes das análises MS1 e MS2 processados com o auxílio do aplicativo flexAnalysis, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As listas de picos de MS1 foram geradas no formato *extensible markup language* (XML) pelo *software* flexAnalysis. As listas de picos de MS2 foram geradas no formato

*mascot generic format* (mgf) pelo *software* BioTools, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).

#### 4.9.2. LC-MS/MS

Os peptídeos trípticos provenientes das excisões foram secos e solubilizados em 50 $\mu$ L de uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1%. Em seguida, 10 $\mu$ L foram usados para a análise por nano LC-MS, utilizando o sistema UPLC nanoAcquity (Waters, EUA), contendo uma coluna *trap* e uma coluna capilar C18 BEH130 1,7 $\mu$ m - 100 $\mu$ m  $\times$  100mm, operando com uma taxa de fluxo de 0,5 $\mu$ L/min. Os peptídeos eluídos foram automaticamente injetados em espectrômetro de massas do tipo ION TRAP Amazon<sup>®</sup> (Bruker Daltonics, Alemanha), atuando no modo online, com o auxílio de uma agulha de ionização nanoESI. Nesta etapa, as soluções de fase móvel utilizados para o programa de gradiente foram: (A) água e ácido fórmico 0,1% (v/v) e (B) acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v), com o programa de gradiente consistindo de 5% de (B) durante 5min, rampa de subida linear até 50% de (B) em 35min, rampa de subida linear até 90% de (B) ao longo de 10min, manutenção de 95% de (B) por 10min, rampa de descida linear para 5% de (B) durante 5min, seguido pela manutenção a 5% de (B) durante 5min.

O escaneamento em modo positivo dos íons para os espectros de MS1 foi efetuado para a faixa de massas entre 300 e 1500m/z, sendo para os espectros de MS2 entre 70 e 3000 m/z, com um corte de massas padrão de 27%. Os dados foram adquiridos durante 70min em cada análise LC-MS/MS, com a aquisição dos dados por instrumentos LC-MS gerida pelo aplicativo Hystar, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros processados com o auxílio do aplicativo Data Analysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando-se as configurações padrões para proteômica. O espectrômetro de massas operou no modo *auto-MSn*, o qual coletou espectros MS2 para os íons mais intensos em cada espectro de varredura completo, excluindo os íons de cargas simples. As listas de picos foram geradas no formato *mascot generic format* (mgf) pelo aplicativo Data Analysis.

#### 4.10. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ABORDAGENS COMPUTACIONAIS

##### 4.10.1. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS BASEADA NA PESQUISA EM BANCO DE DADOS, COM O AUXÍLIO DO ALGORITMO MASCOT

Todas as listas de picos obtidas pela análise dos peptídeos trípticos trabalhadas por MALDI-TOF/TOF e trabalhadas por LC-MS/MS foram analisados pelo algoritmo MASCOT (Matrix Science, Inglaterra). Estas análises foram realizadas localmente contra os bancos de dados NCBIInr ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e banco de nematoda Blaxter Lab database (NEMBASE4), usando o MASCOT DAEMON CLIENT. Nos dados originários por MALDI-TOF/TOF, para as análises de *peptide mass fingerprinting* (PMF), foi adotada uma tolerância para a massa dos peptídeos de 0,5 Da. Para as análises de *peptide fragment fingerprinting* (PFF), foi adotado uma tolerância de 0,5 Da para a massa dos peptídeos e dos fragmentos. Em ambas as análises, a tripsina foi escolhida como enzima de clivagem, com uma clivagem perdida para a digestão tríptica, carbamidometilação como modificação fixa, oxidação da metionina como modificação variável e estado de carga 1+. Para as análises do MASCOT das listas de picos geradas pelo LC-MS, foi adotada tolerância de 0,2 Da, tanto para a massa do peptídeo quanto para as massas dos fragmentos, sendo a tripsina a enzima de clivagem, alterando-se nos demais parâmetro o estado de carga para 2+, 3+ e 4+, além da escolha do equipamento ESI TRAP como o responsável pela aquisição dos dados.

##### 4.10.1.1. VALIDAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS PELO MASCOT, COM O AUXÍLIO DO APLICATIVO SCAFFOLD

Os resultados obtidos da análise por MASCOT dos peptídeos trípticos analisados por LC-MS/MS, foram estatisticamente avaliadas e validadas pelos algoritmos *Peptide Prophet* e *Protein Prophet* e executados pelo aplicativo SCAFFOLD, versão 3.0 (Proteome Software, EUA). Foram considerados os níveis de probabilidade de identificação positiva para proteínas, maior ou igual a 90%, buscando o número mínimo de um peptídeo identificado e validado, mantendo a probabilidade de identificação maior ou igual a 90% para o mesmo.

#### 4.10.1.2. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS PELO BANCO DE DADOS DE NEMATÓIDES E DAS PROTEÍNAS DEPOSITADAS NO NCBI

As proteínas identificadas pela busca no banco de dados de Nematoda Blaxter Lab database (NEMBASE4) e validadas pelo SCAFFOLD, foram processadas por meio do algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Através desse algoritmo foi possível identificar quais as proteínas constantes do banco de dados depositado no NCBI que apresentaram similaridade com a sequência dos números de acesso do banco de Nematoda.

#### 4.10.2. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS BASEADA NA ESTRATÉGIA DO SEQUENCIAMENTO *DE NOVO*, COM O AUXÍLIO DO APLICATIVO PEPNOVO

Os espectros de fragmentos MS2 obtidos por LC-MS/MS foram interpretados, para a realização do sequenciamento *de novo*, pela ferramenta Pepnovo (*De Novo Peptide Sequencing via Probabilistic Network Modeling*) (Frank & Pevzner, 2005). Essa estratégia foi escolhida visando prever um maior número de sequências de peptídeos trípticos.

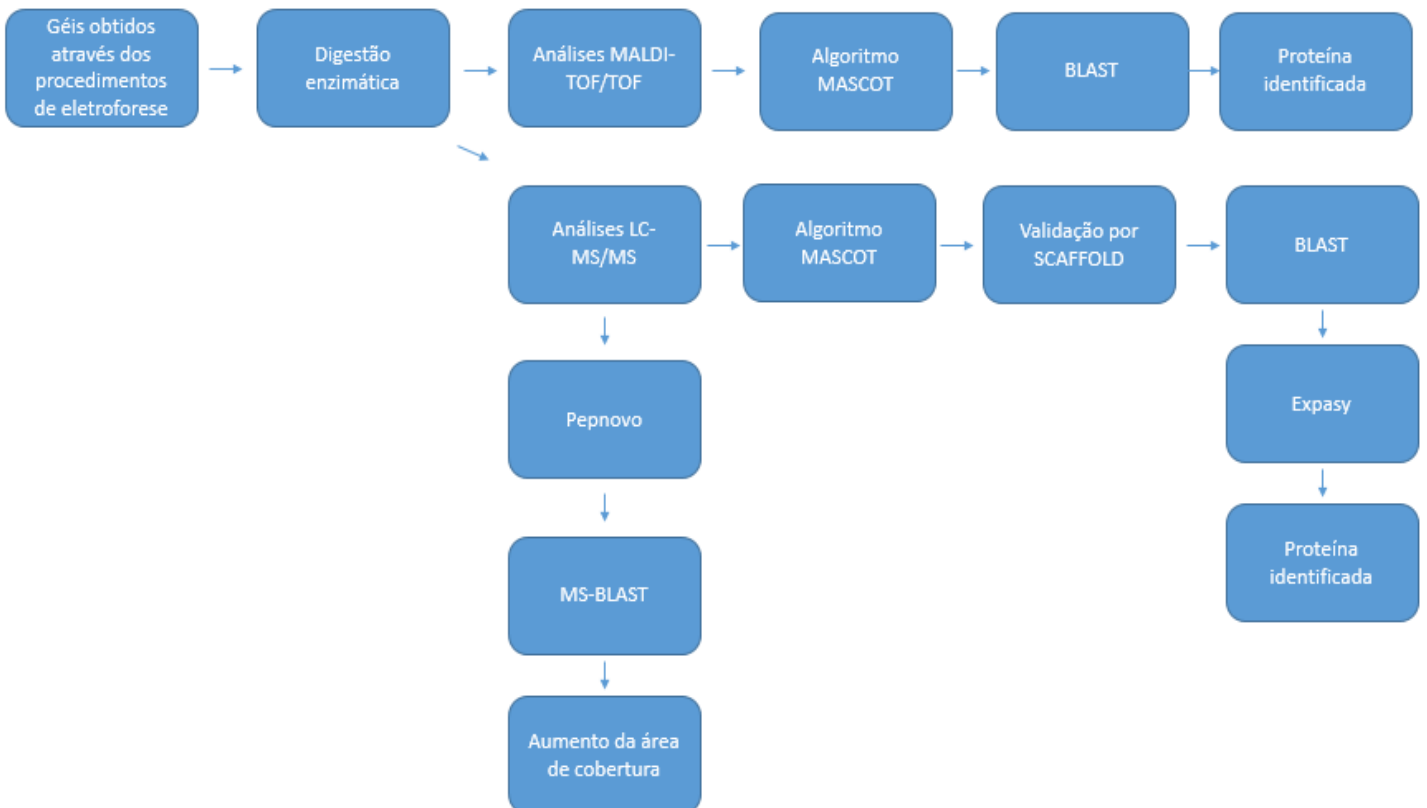
##### 4.10.2.1. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS BASEADA NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS PREDITAS

Visando aumentar a cobertura das proteínas, as sequências previstas dos peptídeos trípticos obtidos pela ferramenta Pepnovo foram confrontadas utilizando-se a ferramenta MS-BLAST (<http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>). Nessa análise um conjunto de tags com score de 40 a 50 foram agrupadas e alinhadas para identificação de proteínas homólogas.

#### 4.10.3. OBTENÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO E DA MASSA MOLECULAR DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS, COM O AUXÍLIO DA PLATAFORMA EXPASY

Após identificação de cada proteína, o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular foram previstos utilizando a ferramenta *compute pI/MW* na plataforma Expasy ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)).

O resumo da estratégia de identificação por abordagens computacionais estão esquematizados na Figura 3.



**Figura 3:** Procedimento de digestão enzimática, análises por espectrometria de massa e análises utilizando abordagens computacionais.

#### 4.11. PREDIÇÃO E RECONSTRUÇÃO DOS AGRUPAMENTOS DE PROCESSOS BIOLÓGICOS

Os processos biológicos e seus agrupamentos foram preditos e reconstruídos utilizando o aplicativo ClueGo (Bindea *et al.*, 2009) implementado do software Cytoscape v3.1.1. (Cytoscape Consortium, EUA).

Para a construção dos agrupamentos, o banco de dados de *Caenorhabditis elegans* foi utilizado como referência por se tratar da espécie evolutivamente mais próxima ao *Hysterothylacium* sp. contido no software. Nessa análise, as proteínas de *C. elegans* ortólogas às proteínas de *Hysterothylacium* sp. foram identificadas, usando o algoritmo BLAST, e selecionadas.

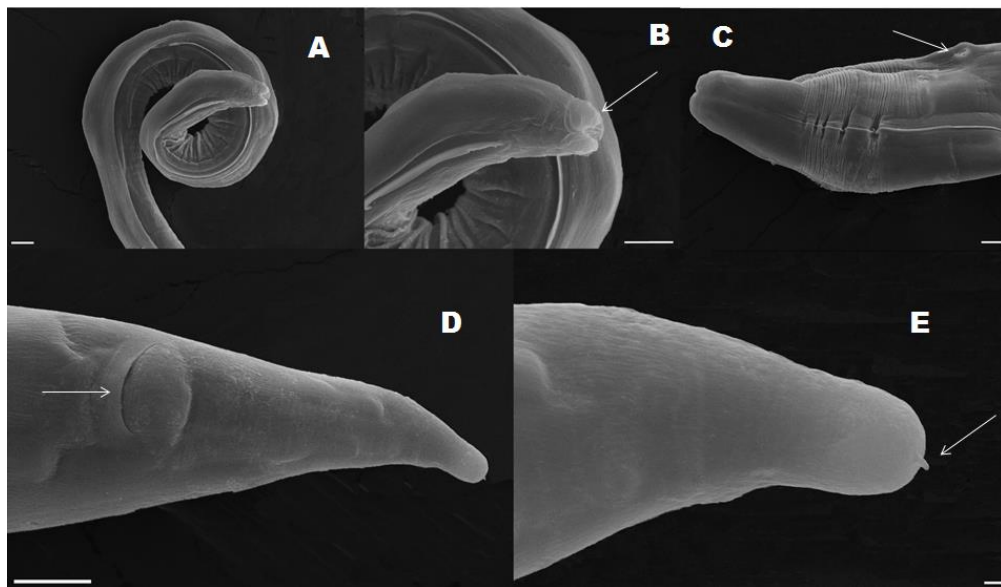
Os parâmetros para predição dos processos biológicos e seus agrupamentos foram ajustados da seguinte maneira: 4 como número mínimo de genes por processo biológico, 1% a porcentagem mínima de genes identificados em relação aos genes totais relacionados por processo, nível de ontologia dos genes (GO) mínimo 3 e máximo 8, além da avaliação da

legitimidade da informação, ter sido realizada usando a estatística Kappa ajustada para um score mínimo de 0,4.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

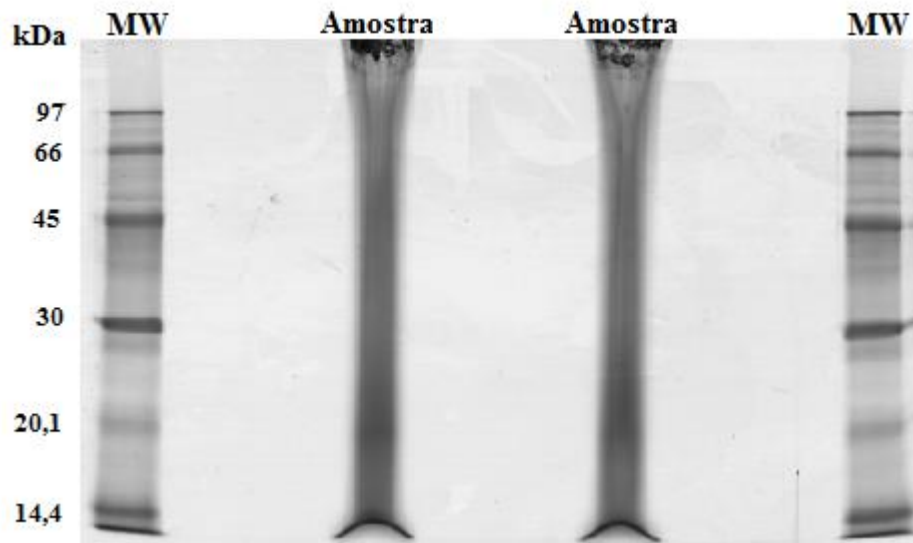
Através das imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura, foram identificadas estruturas básicas utilizadas para a identificação de larvas de *Hysterothylacium* a nível de gênero, sendo possível observar detalhes dos lábios discretos (Figura 4B), presença do poro excretor, indicado pela seta (Figura 4C) e a cauda com ponta digitiforme (Figura 4D), além da presença de um único espinho (*mucron*) terminal, indicado pela seta (Figura 4E).



**Figura 4:** A – E: Larvas típicas de *Hysterothylacium* sp., visualizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV. A – Visão geral, com ênfase na região anterior do parasito (Barra = 20µm); B – Detalhe dos lábios (seta) (Barra = 20µm); C – Poro excretor (seta) (Barra = 20µm); D – Cauda em visão ventral mostrando orifício anal e terminação digitiforme (Barra = 20µm); E – Detalhe da cauda com projeção terminal (Barra = 2µm)

### 5.2. RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA ELETROFORESE SDS-PAGE

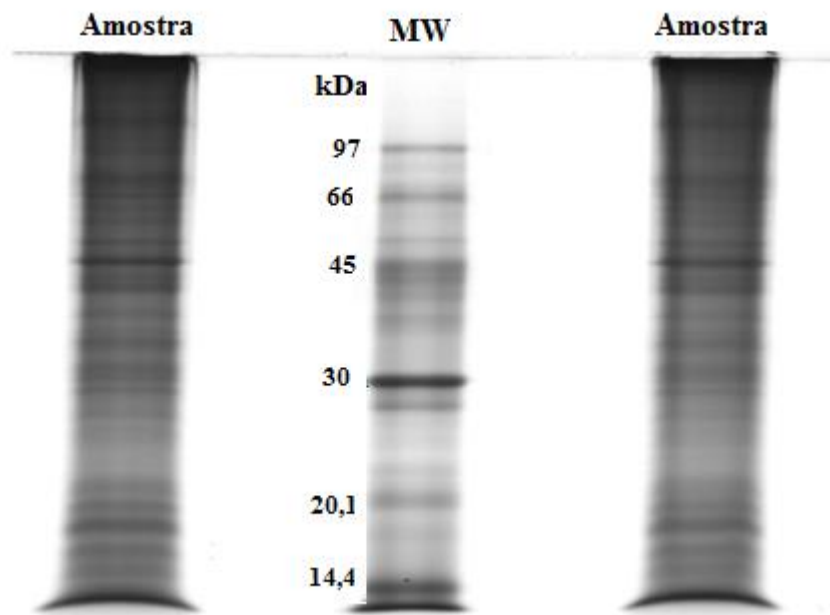
Procedimentos de eletroforese monodimensional foram realizados visando à verificação da integridade das proteínas extraídas pelos dois diferentes métodos com os tampões de extração CHAPS e SDS-PAGE. Dentre os resultados obtidos, na Figura 5 está o resultado da eletroforese obtida a partir da extração realizada com 50 larvas de *Hysterothylacium* sp. utilizando tampão CHAPS. Apesar da elevada quantidade de proteínas aplicada, 123,4µg segundo método de Bradford, o gel resultante apresentou arraste, não tendo sido possível a visualização de bandas.



**Figura 5:** Eletroforese SDS-PAGE-1-DE da extração realizada com 50 larvas de *Hysterothylacium* sp. utilizando tampão CHAPS.

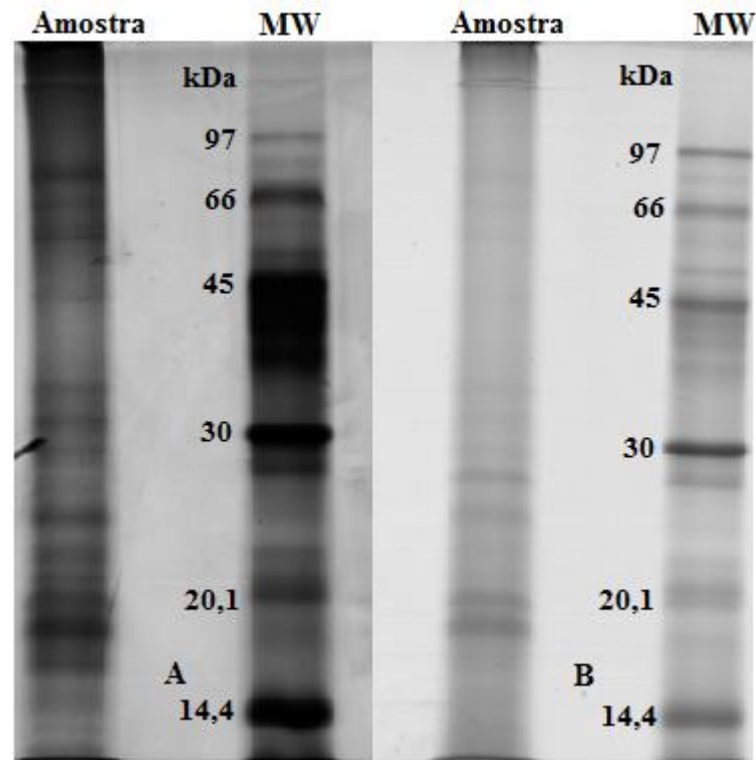
Um total de 40 amostras foram excisadas a partir do arraste de uma das canaletas desse gel, todas foram submetidas à digestão trípica e analisadas por espectrometria de massas tanto por MALDI-TOF/TOF, quanto por LC-MS/MS. Não tendo sido possível detectar nenhum sinal de peptídeos das referidas amostras em nenhuma das estratégias utilizadas.

Extratos provenientes das extrações realizadas com tampão SDS-PAGE não foram quantificados em decorrência das características do tampão o qual é incompatível com o método de Bradford. A partir do material remanescente (*pellet*) da extração anteriormente citada, com 50 larvas de *Hysterothylacium* sp. utilizando tampão CHAPS, foi realizada uma outra extração utilizando tampão SDS-PAGE, foi possível a visualização de bandas demonstrando certa integridade das proteínas (Figura 6).



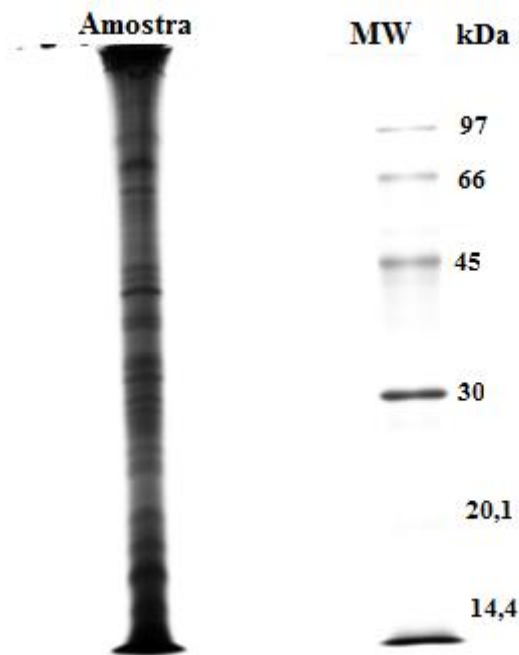
**Figura 6:** Eletroforese SDS-PAGE-1-DE da extração realizada com o *pellet* remanescente utilizando tampão SDS-PAGE.

O resultado da comparação entre as duas metodologias de coloração realizadas a partir de uma segunda extração de proteínas totais de *pellet* remanescente, utilizando tampão SDS-PAGE e submetida a corrida eletroforética pode ser observado na Figura 7, coloração com nitrato de prata na Figura 7A e Azul de Coomassie Brilhante G-250 na Figura 7B. No gel referente à coloração com prata, as bandas apresentaram-se mais evidentes do que no gel corado com o Azul de Coomassie Brilhante, no entanto, não foi observada bandas adicionais.



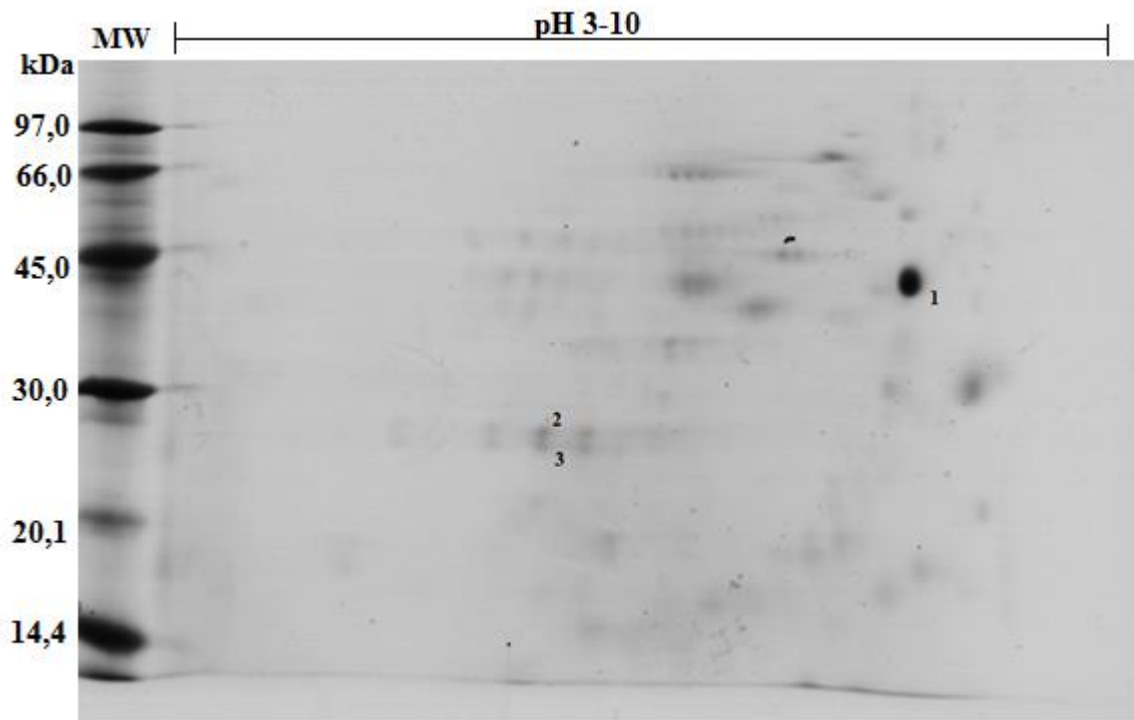
**Figura 7:** Eletroforese SDS-PAGE-1-DE da extração realizada com o *pellet* remanescente utilizando tampão SDS-PAGE. A – Gel submetido à coloração com nitrato de prata; B – Gel submetido à coloração com azul de Coomassie brilhante G-250.

A extração de proteínas totais de 50 larvas de *Hysterothylacium* sp. as quais foram extraídas com tampão SDS-PAGE e submetidas à eletroforese monodimensional podem ser observadas na Figura 8. Um total de 40 amostras foram geradas, as quais foram submetidas à digestão enzimática e, posteriormente, analisadas por MALDI-TOF/TOF e LC-MS/MS. Os sinais obtidos dessa análise foram bons, sendo as análises por LC-MS/MS determinantes para a detecção das proteínas aqui apresentadas.



**Figura 8:** Eletroforese SDS-PAGE-1-DE da extração realizada com 50 larvas de *Hysterothylacium* sp. utilizando tampão SDS-PAGE.

Na tentativa de obtenção do perfil da distribuição proteica das larvas de *Hysterothylacium* sp., 49 $\mu$ g de proteínas totais, provenientes da extração de 20 larvas de *Hysterothylacium* sp. utilizando tampão CHAPS, foram carregadas em uma fita de 7cm com faixa de pH de 3 a 10, a qual foi submetida à focalização isoeletrica. A imagem do gel resultante da corrida eletroforética para essa amostra pode ser visualizada na Figura 9. No gel foram observados vários *spots* com intensidade baixa e três *spots* com maior intensidade, sendo os *spots* mais intensos excisados, digeridos enzimaticamente e submetidos à análise por espectrometria de massas, tanto por MALDI- TOF/TOF quanto por LC-MS/MS. Todos os *spots* mostraram baixo sinal nas análises por espectrometria de massas, o que não permitiu a identificação de nenhuma proteína.



**Figura 9:** Eletroforese SDS-PAGE-2-DE das proteínas totais de 20 larvas de *Hysterothylacium* sp. extraídas com tampão CHAPS. Os *spots* 1, 2 e 3 foram submetidos às análises por espectrometria de massas.

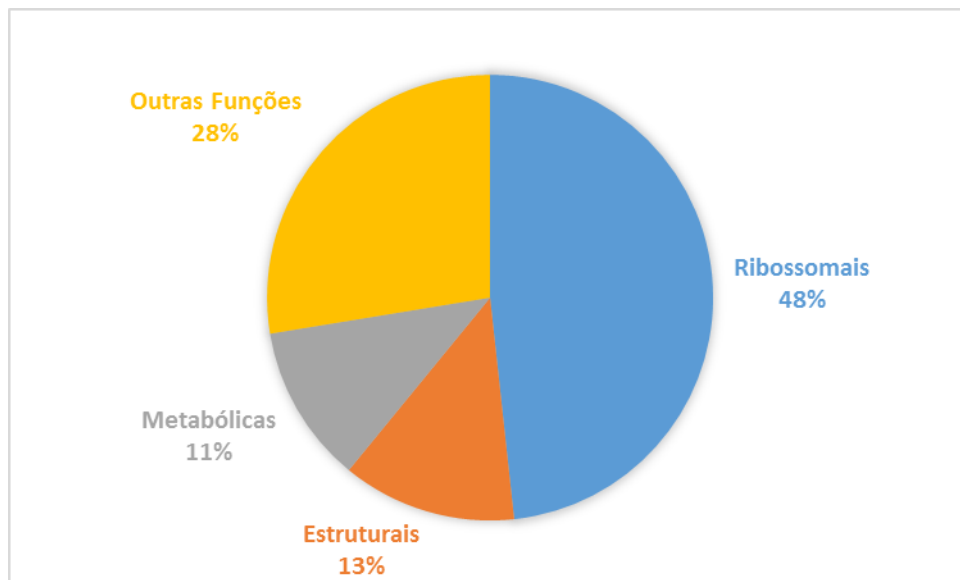
### 5.3. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS BASEADA NA PESQUISA EM BANCO DE DADOS DEPOSITADO NO NCBI<sup>Inr</sup>, COM O AUXÍLIO DO ALGORITMO MASCOT

As listas de picos geradas pelos espectrômetros de massa MALDI-TOF/TOF e LC-MS/MS a partir da análise das amostras da extração de 50 larvas de *Hysterothylacium* sp. utilizando tampão SDS-PAGE, foram analisadas e confrontadas com o banco de proteínas depositados no NCBI<sup>Inr</sup> utilizando o algoritmo MASCOT. Das listas geradas por MALDI-TOF/TOF, o resultado obtido pela busca no banco de dados possibilitou a identificação de três proteínas: actina, troponina e filamento intermediário. Das listas geradas por LC-MS/MS, os resultados obtidos permitiram a identificação de 29 proteínas: actina, fosfoenolpiruvato carboxiquinase, miosina, 14-3-3, calponina-like, troponina, filamento intermediário, triose fosfato isomerase, enolase, tropomiosina, glutamato desidrogenase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, adenilato quinase, proteína desorganizadora muscular 1, além de 15 proteínas ribossomais. Esses resultados nos direcionou para a realização das etapas posteriores, ou seja, validação por SCAFFOLD, sequenciamento *de novo* por Pepnovo e pesquisa por MS-BLAST com os espectros obtidos por LC-MS/MS.

#### 5.4. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS BASEADA NA PESQUISA EM BANCO DE DADOS E NA ESTRATÉGIA DO SEQUENCIAMENTO *DE NOVO*, ALIMENTADOS COM DADOS GERADOS POR LC-MS/MS

Por meio do confronto dos resultados obtidos pela análise realizada pelo LC-MS/MS das amostras geradas a partir da extração de 50 larvas de *Hysterothylacium* sp. utilizando tampão SDS-PAGE, contra os bancos de dados NCBIInr e NEMBASE4, e o sequenciamento *de novo* mediado pelo *software* PEPNOVO, foram identificadas um total de 87 proteínas, onde pelo menos um peptídeo de cada proteína foi validado através do SCAFFOLD (ANEXOS - Tabela 1).

As proteínas identificadas foram classificadas em quatro grandes grupos: “proteínas ribossomais”, “proteínas metabólicas”, “proteínas estruturais” e “outras funções”. Um total de 42 “proteínas ribossomais” (48%), 11 “proteínas estruturais” (13%), 10 “proteínas metabólicas” (11%) e 24 “proteínas com outras funções” (28%) foram identificadas (Gráfico 1).



**Gráfico 1:** Proteínas identificadas classificadas por grupo (em porcentagem).

Dentre as proteínas, a que apresentou maior área de cobertura foi a *hypothetical protein* CBG02161 com 24 peptídeos (Figura 10). Essa proteína é pertencente à família Actina (pfam 00022). Do total de peptídeos encontrados, 13 foram obtidos através do *software* “*pepnovo*”, sendo os outros 11 validados pelo *software* Scaffold.

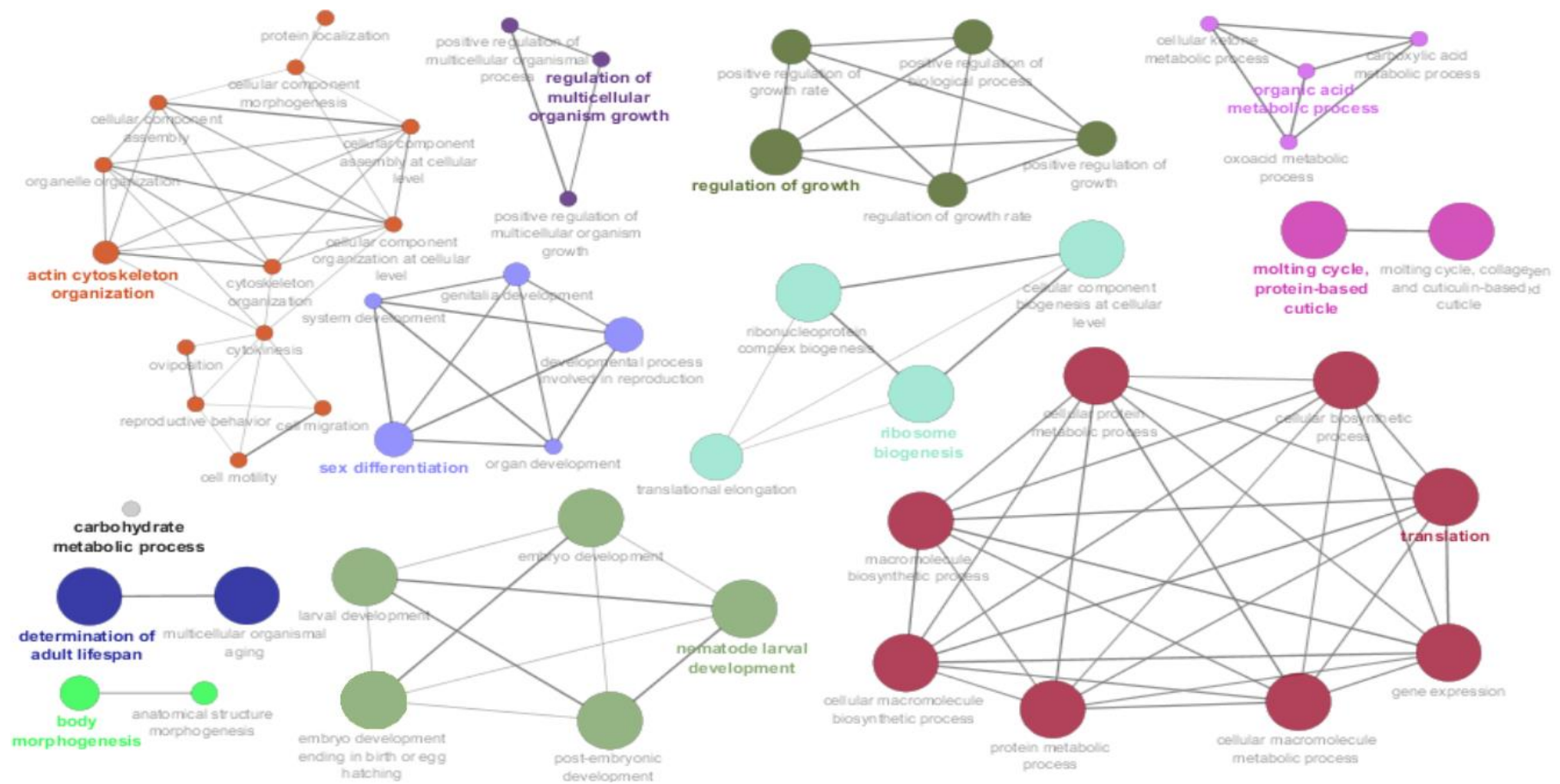
**Hypothetical protein CBG02161 [Caenorhabditis briggsae]**

**MIAAVVIDNGSGMTKAGFGGDDAPSGVLPSVVGSPKYCGIMVGMGKKDSYVGDEAQS KRGILT**  
**LKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTEIMFETFNTPA**  
**MYVAIQAVLSLYSSGRITGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTER**  
**GYSFTTTAEREIVRDIKEKLCYIALDFEQEMATAASSSSLEQTYELPDGQVITVGNERFRCPEALF**  
**QPSFLGMESAGIHQTSYNSIMKCDIDIRKDLFANTVLSGGTTMYPGIADRMQKEIAALAPSAMKI**  
**KIIPPERKYSVWMGGSLASLDSFQEMWISKEEYDEAGPSIVHRKCF**

**Figura 10:** Ilustração da cobertura resultante de todos os peptídeos detectados (em vermelho).

## 5.5. RECONSTRUÇÃO DOS AGRUPAMENTOS DE PROCESSOS BIOLÓGICOS

Utilizando o aplicativo ClueGo do Cytoscape, foi possível prever os processos biológicos e seus agrupamentos (Figura 11) e quais proteínas identificadas no trabalho estão relacionadas em cada um desses processos (ANEXOS – Tabela 2 a Tabela 13). Foi possível identificar 54 processos biológicos e 12 agrupamentos, dentre os processos cujo maior número de genes foi encontrado, destacaram-se o “desenvolvimento embrionário” e o “desenvolvimento embrionário que termina ao nascimento/eclosão dos ovos”, com 54 genes em cada um (Gráfico 2). Com relação à porcentagem de genes identificados em relação aos genes totais relacionados a um determinado processo, o “alongamento durante o processo de tradução” obteve uma maior porcentagem ilustrando, aproximadamente, 17,3% (Gráfico 2). Os 25 processos que apresentaram valores estatísticos de PValue mais significativos foram: “desenvolvimento pós-embrionário”, “desenvolvimento embrionário”, “desenvolvimento larval”, “desenvolvimento embrionário que termina ao nascimento/eclosão dos ovos”, “desenvolvimento larval do nematoda”, “biogênese do componente celular a nível celular”, “biogênese do complexo riboproteico”, “biogênese do ribossomo”, “alongamento durante o processo de tradução”, “determinação da vida útil”, “envelhecimento do organismo multicelular”, “ciclo de muda da cutícula”, “ciclo de muda do colágeno e da cutícula baseada em *cuticulin*”, “processo de biossíntese de macromoléculas”, “expressão gênica”, “processo metabólico da proteína”, “processo de biossíntese celular”, “processo metabólico de macromoléculas celulares”, “processo de biossíntese de macromoléculas celulares”, “processo metabólico da proteína celular”, “tradução”, “regulação da taxa de crescimento”, “regulação positiva da taxa do crescimento”, “regulação do crescimento” e “regulação positiva do crescimento” (Gráfico 2).



**Figura 11:** Predição e reconstrução dos agrupamentos de processos biológicos identificados em *Hysterothylacium* sp. com o auxílio do aplicativo ClueGo. Nota: Em destaque (negrito) estão indicados aqueles processos biológicos com maior valor estatístico Kappa. As cores se referem aos grupamentos de processos com proteínas compartilhadas, indicando, por meio de linhas, as vias de conexões entre estes.

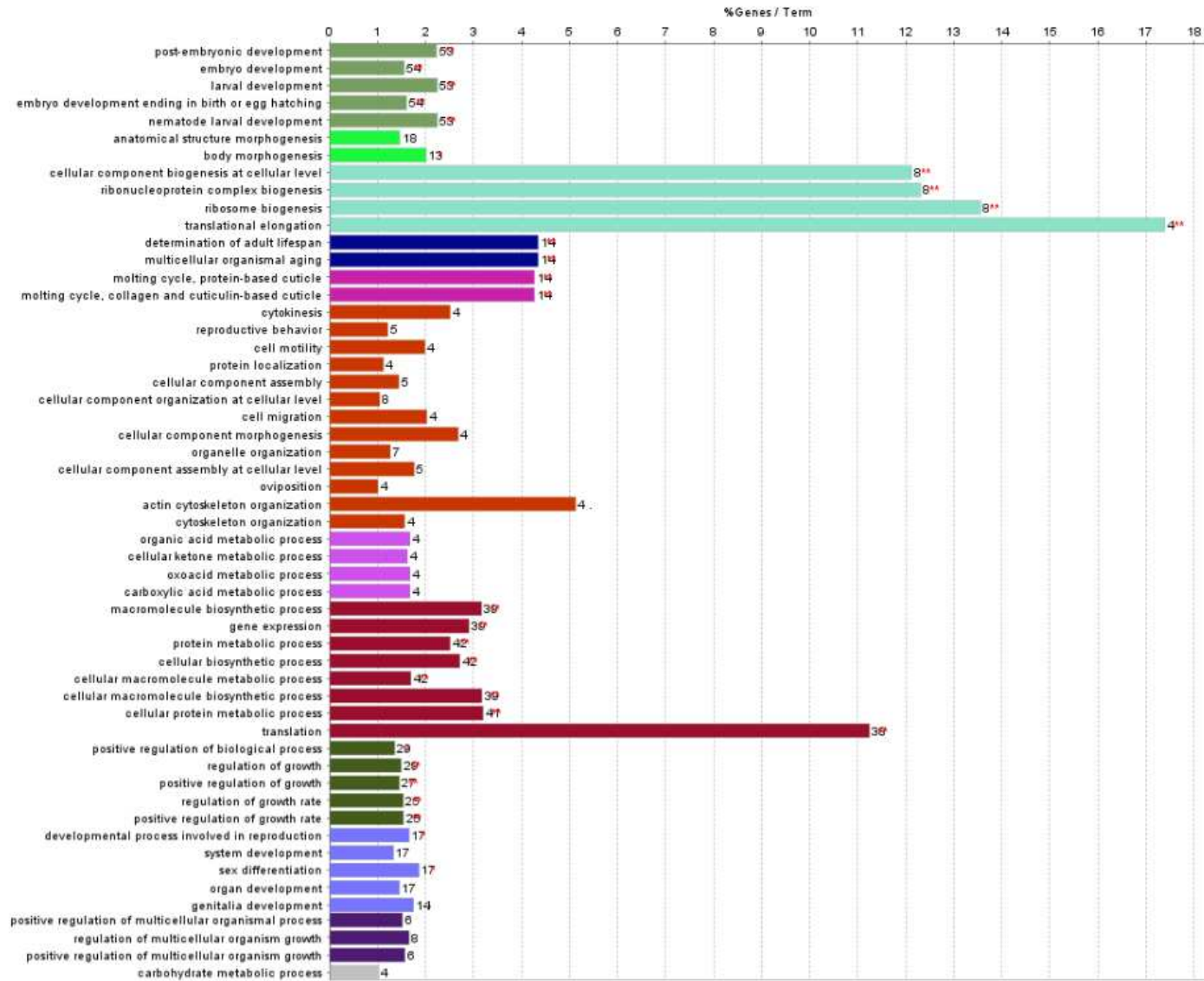


Gráfico 2: Número de genes relacionados a cada processo biológico, a porcentagem de genes identificados em relação ao total existente por processo biológico (barra). (\*\*\*) – mais significativa  $P\text{Value} < 0,001$ ; (\*) - significativa  $0,001 < P\text{Value} < 0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os resultados obtidos com as proteínas extraídas de larvas de *Hysterothylacium* sp. coletados em peixes *Trichiurus lepturus* capturados na costa do Rio de Janeiro, demonstram que o tampão SDS-PAGE apresenta maior eficiência para esse material biológico. As proteínas oriundas das extrações provenientes do tampão CHAPS não ficaram bem resolvidas nos géis de eletroforese SDS-PAGE, apresentando arraste ou *spots* com baixa intensidade. O arraste é um efeito que poderia estar atrelado à presença de uréia no tampão de extração CHAPS, no entanto, as análises por espectrometria de massa das amostras provenientes desse gel não apresentaram sinal de peptídeo e foram inviáveis dando uma pista adicional de que, ou não haviam proteínas ou elas eram insuficientes para a análise. Os testes realizados com os *pellets* remanescentes da extração feita com o tampão CHAPS resultaram em géis com bandas, o que nos permite deduzir quanto à existência de material biológico nos *pellets*, o tampão CHAPS não se mostrou eficiente nesta extração. O detergente anfipático SDS (dodecil sulfato de sódio) apresenta alta carga negativa, o que garante a desnaturação das proteínas, conferindo densidade de carga uniforme (Rocha *et al.*, 2005). Resultados similares foram obtidos por Rebello *et al.* (2011), os quais obtiveram melhores resultados de extração de proteínas em Nematoda *Angiostrongylus costaricensis* com a solução de extração contendo SDS.

A capacidade do detergente SDS em tornar solúveis proteínas hidrofóbicas, pode explicar a detecção de, por exemplo, aquaporina. Entretanto, devido à presença da elevada quantidade de carga em sua molécula, a utilização da mesma na eletroforese bidimensional é inviável por interferir na focalização isoelétrica (Rabilloud, 1999).

### 6.2. ELETROFORESE SDS-PAGE 1-DE E SDS-PAGE 2-DE

Conforme discutido anteriormente, a extração com tampão CHAPS não foi eficiente para este material biológico, não sendo a quantidade de proteína suficiente para a metodologia de eletroforese SDS-PAGE 2DE, a qual, quando da ocorrência de *spots*, estes não estavam intensos o suficiente de maneira a permitir uma análise por espectrometria de massas.

A eletroforese monodimensional, por ser compatível com o tampão SDS-PAGE, foi a técnica que demonstrou maior eficácia e solucionou o problema relacionado a extração. A eletroforese bidimensional é uma técnica que apresenta limitação na detecção de proteínas

com  $pI$  nos extremos, ou seja, proteínas com  $pI$  menores que 4 e maiores que 10. Além dessa limitação há também a difícil detecção de proteínas com massas moleculares nos extremos, aproximadamente 70% das proteínas detectadas por eletroforese bidimensional estão entre 20 e 70KDa e 8% entre 10 e 20 KDa, proteínas menores que 10KDa e maiores que 120 KDa não são frequentemente detectadas (Garbis *et al.*, 2005). Conforme ilustrado no Gráfico 3, em nossos achados houve um expressivo número de proteínas com  $pI$  maiores que 10, fato que poderia não ser alcançado caso nossa abordagem tivesse sido a eletroforese bidimensional. Adicionalmente, foi possível a detecção de proteínas muito grandes com massas acima de 160KDa Gráfico 4. Essas duas características encontradas nas proteínas aqui identificadas podem ser consideradas uma vantagem da utilização da técnica de eletroforese monodimensional. No entanto, vale salientar que o perfil de distribuição proteico foi inviável pois essa é a grande vantagem da utilização da eletroforese bidimensional.

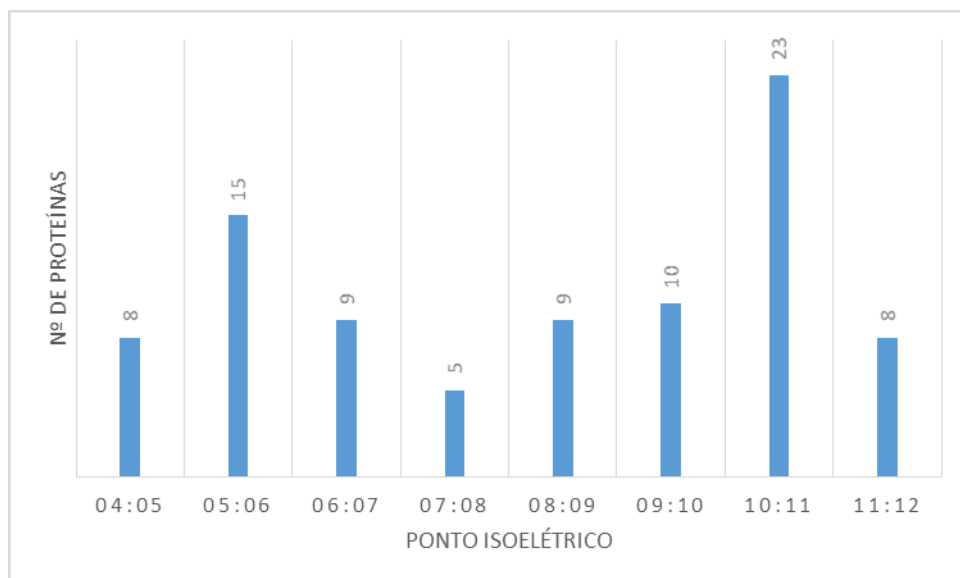


Gráfico 3: Distribuição das proteínas identificadas por eletroforese monodimensional e LC-MS/MS em relação aos valores de  $pI$ .

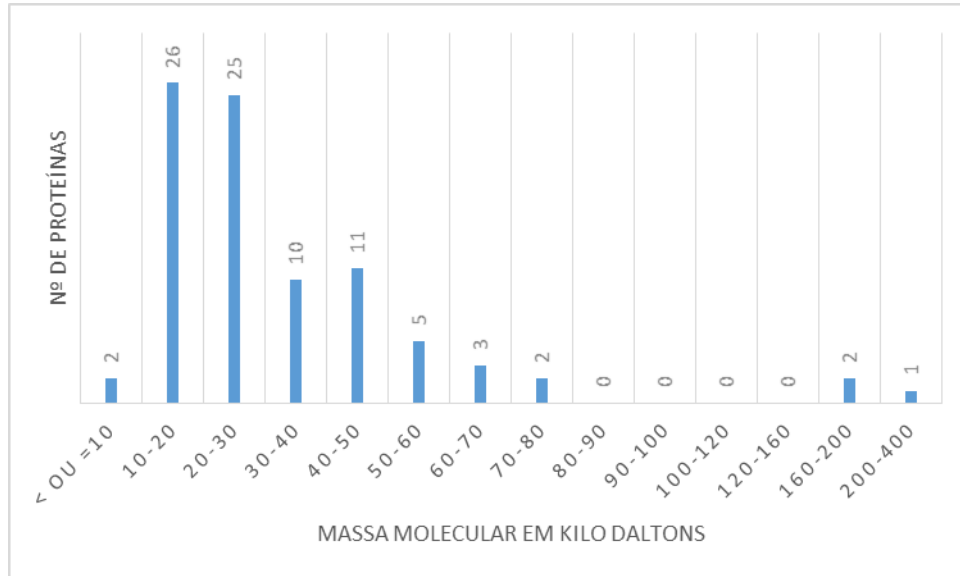


Gráfico 4: Distribuição das proteínas identificadas por eletroforese monodimensional e LC-MS/MS em relação aos valores de massa molecular.

### 6.3. MÉTODOS DE COLORAÇÃO

O teste realizado utilizando os métodos de coloração Coomassie Brillante Blue G-250 e prata não apresentaram diferenças visualmente significativas para a detecção do número de bandas, aumentando, no entanto, as intensidades das mesmas. A maior sensibilidade da coloração com nitrato de prata é bem difundida na literatura, com relatos de que esse procedimento é cem vezes mais sensível que a coloração com azul de Coomassie Brillante (Rabilloud, 1992; Schägger, 2006). Comparativamente a coloração com nitrato de prata, esta é uma metodologia mais trabalhosa, podendo interferir nas análises por espectrometria de massas, caso a concentração de formaldeído permaneça elevada durante o procedimento de coloração e demais (Schägger, 2006).

### 6.4. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MALDI-TOF/TOF E LC-MS/MS UTILIZANDO ALGORITMO MASCOT E BANCO DE DADOS NCBI nr

Baseados nos resultados obtidos podemos afirmar que o espectrômetro de massa LC-MS/MS apresentou-se como uma ferramenta mais eficiente para análise de nossas amostras, aumentando a identificação proteica em relação ao MALDI-TOF/TOF, nos permitindo realizar a caracterização proteica de larvas de *Hysterothylacium* sp. Esse fato pode estar atrelado aos altos picos de razão massa carga emitidos pelos peptídeos provenientes da proteína actina, esses peptídeos apareceram na análise de todas as amostras e provavelmente suprimiram os sinais emitidos pelos demais peptídeos, uma vez que, o espectrômetro de

massa MALDI-TOF/TOF analisa o *pool* de peptídeos sem que ocorra uma separação anterior a análise, o que ocorre por cromatografia líquida no caso do LC-MS/MS.

## 6.5. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

Conforme citado anteriormente, foram identificadas 87 proteínas as quais foram classificadas de acordo com suas funções. Identificou-se proteínas metabólicas, como por exemplo, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, triose fosfato isomerase, glutamato desidrogenase, proteínas estruturais tais como actina, miosina e ribossomais que foram as mais expressivas em termos de quantidade. Além dessas funções, também constaram em nossas análises outras proteínas com funções diversas como: proteínas ligantes de proteínas sinalizadoras (14-3-3 zeta), proteínas antioxidantes (tioredoxina peroxidase 2), proteínas auxiliaadoras do dobramento proteico (chaperonina Hsp-60) e muitas outras funções que serão melhor abordadas adiante (ANEXOS-Tabela 1).

Além de todas as funções já abordadas, houve proteínas que apresentaram importância adicional para o trabalho por serem possíveis proteínas imunogênicas segundo a literatura. Yan *et al.* (2010) utilizaram técnicas de imunoproteômica em machos e fêmeas de *H. contortus*, algumas das proteínas imunogênicas identificadas por esse grupo também foram identificadas nesse trabalho como: glutamato-desidrogenase, homólogo da proteína DIM-1, actina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Buscando proteínas no secretoma e excretoma de *B. malayi* para entender a interface entre o hospedeiro e o parasito, Hewitson *et al.* (2008) identificaram, através da eletroforese bidimensional e *shotgun* LC-MS/MS, 80 proteínas, muitas das quais, também foram demonstradas neste trabalho, quais sejam proteínas 14.3.3, chaperoninas (*Heat shock*), tioredoxina peroxidase, enolase, triose fosfato isomerase, actina, calsequestrina, tropomiosina e grande variedade de transtirretinas. Baseado nesse trabalho podemos supor que identificamos proteínas envolvidas na relação parasito - hospedeiro em larvas de *Hysterothylacium* sp.

### 6.5.1 CYTOSCAPE E PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

Dentre os processos biológicos identificados com o auxílio do aplicativo Cytoscape, alguns apresentaram-se como mais significativos baseando-se no valor estatístico PValue.

No agrupamento envolvido com a biossíntese de macromoléculas, foram preditos oito processos que atendem tal requisito estatístico (Gráfico 2). Em adição o processo biológico “tradução” vem em destaque segundo análise estatística do valor de Kappa (Figura 11), sendo um processo altamente relevante, contando com a participação de 36 proteínas ribossomais e, também, com a proteína nucleosídeo difosfato quinase (ANEXOS - Tabela 2). Esta última possuindo atividade de fosfotransferência à partir de ATP para nucleosídeos difosfatos, gerando nucleosídeos trifosfatos e autofosforilação do ATP e GTP, além do envolvimento com a transdução de sinais (Hasunuma *et al.*, 2003). Essa proteína secretada por organismos procarióticos patogênicos, foi observada em *Trichinella spiralis*, sugerindo ação na modulação da função de células do hospedeiro (Gounaris *et al.*, 2001), tendo sido apontada como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos que interrompam sua síntese no parasito *B. malayi* (Ghosh *et al.*, 1995).

Ainda nesse agrupamento, realizamos a predição de outros processos biológicos, como “processo metabólico da proteína”, “processo metabólico da proteína celular” e “processo metabólico de macromoléculas celulares”, que também apresentam a participação de grande número de proteínas ribossomais, reafirmando a importância destas na produção de proteínas (ANEXOS – Tabela 2). A aparição da proteína *Heat shock 60* nesses processos pode estar relacionada com a função primordial, qual seja, o dobramento e montagem de novas proteínas através da formação de um complexo que se liga à nova proteína e catalisa seu dobramento, em um processo dependente de ATP (Cheng *et al.*, 1990). Estas proteínas apresentam uma importância adicional por ser um potente biomarcador para o monitoramento da poluição ambiental (Arts *et al.*, 2004).

O processo “determinação da vida útil” também se apresentou como mais significativo em relação ao PValue (Gráfico 2), com destaque devido ao valor estatístico em Kappa (Figura 11), possuindo envolvimento de proteínas ribossomais, proteína metabólica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e a proteína antioxidante tiorredoxina peroxidase (ANEXOS - Tabela 3). Em parasitos, essas enzimas de ação antioxidante ganham importância adicional por protegê-los, também, contra células de defesa do hospedeiro (Henkle-Dührsen & Kampkötter,

2001), sendo relatadas como componentes críticos na defesa contra radicais de oxigênio provenientes de fontes endógenas e exógenas (Ghosh *et al.*, 1998).

Outro agrupamento predito nas análises realizadas, foi relacionado com o crescimento do parasito. Neste processo, “regulação do crescimento”, que aparece em destaque (Figura 11), também foi classificado como mais significativo (Gráfico 2), possuindo 16 proteínas ribossomais; proteínas estruturais como a tropomiosina e proteína do filamento intermediário; proteínas *Heat shock* 60; tioredoxina peroxidase e proteína 14.3.3; além de proteínas metabólicas como a adenosilhomocisteinase, enolase e glutamato desidrogenase (ANEXOS - Tabela 4). Um homólogo desta última enzima foi sugerida como componente de *Thiol Sepharose-Binding protein* (TSBP) utilizado para vacinação de ovinos contra o nematoda *H. contortus* (Skuce *et al.*, 1999).

A proteína 14.3.3 apresenta ação como inibidora (Toker *et al.*, 1992) ou ativadora (Acs *et al.*, 1995) de proteínas C quinases dependentes de cálcio e fosfolípidos. Sendo as proteínas C quinases envolvidas na diferenciação e crescimento celular, estas apresentam diferentes funções nas vias de sinalização celular, com grande importância quando em situações de super-expressão, o que estaria relacionada à transformação oncogênica (Acs *et al.*, 1995). Em nematodeos, esta proteína foi identificada em glândulas subventrais de *Meloidogyne incognita* (Vieira *et al.*, 2012).

No processo “metabolismo de carboidratos”, não foram verificados valores estatísticos significativos em relação ao PValue, apesar de quatro proteínas de grande importância metabólica evidenciadas nesse processo, quais sejam: enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (ANEXOS – Tabela 5). Esta última enzima é responsável pela formação de fosfoenolpiruvato a partir do oxaloacetato, com a utilização de uma molécula de GTP na gliconeogênese, tendo também sido encontrada em larvas L2 de *Ascaris lumbricoides* por Saz & Lescure (1967), os quais propuseram ser a gliconeogênese crucial para o metabolismo larval.

A enzima enolase pertencente ao metabolismo da glicose, com atividade específica na glicólise, converte 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato. Chen *et al.* (2011) realizaram o silenciamento da expressão gênica dessa proteína em nematodas *A. suum*, o qual resultou na diminuição das larvas desse parasito indicando relação desta proteína com o desenvolvimento larval. Esta enzima, predita, também, como relacionada aos processos de “desenvolvimento

larval” e “desenvolvimento larval do nematoda” (ANEXOS – Tabela 6), caracterizados por valores estatísticos de p-Value como mais significativos (Gráfico 2).

Predita como integrante dos processos “metabolismo de carboidratos” e “determinação da vida útil”, a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase apresenta como principal função a catálise reversível da oxidação e fosforilação de D-gliceraldeído-3-fosfato para 1,3 bifosfoglicerato, estando relacionada às vias da glicólise e gliconeogênese (Yarbrough *et al.*, 1987). Estudos filogenéticos baseados na sequência de seus genes proporcionaram melhor entendimento da evolução dos Nematoda *Caenorhabditis briggsae* e *C. elegans* sugerindo uma divergência evolutiva mais precoce em relação àquela estipulada quando considerada somente características morfológicas (Lee *et al.*, 1992).

Identificada no metabolismo de carboidratos, a malato desidrogenase é uma enzima NAD/NADH dependente a qual realiza a interconversão de malato em oxaloacetado, desempenhando papel crucial no transporte de malato/aspartato através da membrana mitocondrial (isoforma citosólica) e no ciclo do ácido cítrico na matriz mitocondrial (isoforma mitocondrial) (Minárik *et al.*, 2002), tendo sido encontrada em *B. malayi*, o parasito causador da filariose (Bhandary *et al.*, 2006). Em *Ascaridia galli* e *Heterakis gallie*, Sharma *et al.* (1986) testaram os anti-helmínticos carbendazole e tiabendazol, verificando ser esta enzima alvo para essas moléculas, com inibição moderada de sua atividade.

Os processos envolvidos com a “organização do citoesqueleto de actina” (Figura 11) relacionam-se, principalmente, com a montagem e organização de componentes celulares, apresentando destaque, conforme valor estatístico Kappa. Nesse processo evidenciamos também o envolvimento das proteínas actina-2, tropomiosina, troponina e calponina (ANEXOS – Tabela 7), indicando que as proteínas estruturais não possuem importância somente no âmbito da estruturação em si, mas, também, em processos de organização e montagem de componentes celulares. A calponina - uma proteína que se liga à actina, miosina, proteínas ligantes de cálcio e tropomiosina, além de inibir a ATPase da actomiosina, bem como, o movimento de filamentos de actina sobre miosina *in vitro* (el-Mezqueldi, 1996), inicialmente considerada apenas um componente da maquinaria de contração do músculo liso de vertebrado - parece estar também envolvida em regulações e eventos de transdução de sinais no citoesqueleto de actina, bem como, na regulação da contração de actomiosina e na redução da motilidade de células metastáticas (Rozenblum & Gimona, 2007), sendo a imunorreatividade da calponina-like descrita no músculo liso de muitos filos de invertebrados

(Jones *et al.*, 2001). O silenciamento da expressão gênica para essa proteína em nematodas da espécie *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934) resultou na paralisia e em movimentos descoordenados dos mesmos (Cardoso *et al.*, 2013).

#### 6.5.2 OUTRAS PROTEÍNAS COM FUNÇÕES RELEVANTES

Além das proteínas cuja importância já foi descrita acima, há mais que se possa explorar a respeito dos achados nesse trabalho conforme segue:

Dentre estes achados, proteínas DIM-1 (*disorganized muscle protein*) foram encontradas relacionadas às frações pró-inflamatórias da filariose humana, com estudos para determinação do modelo estrutural e purificação do gene *DIM-1bm* de *B. malayi*, sugerindo ser esta molécula um potente alvo como candidato vacinal, com total falta de homologia com humano e capacidade de prevenir parcialmente o estabelecimento da infecção por este parasito (Kushwaha *et al.*, 2014).

A arginina quinase é também uma enzima que catalisa a transferência de fosfato do MgATP para a arginina formando uma fosfoarginina e MgADP, sendo amplamente distribuída nos invertebrados e presente em certos protozoários (Uda, *et al.*, 2006). As enzimas pertencentes ao grupo do qual essa enzima está incluída, as fosfato quinases, em parasitos tem se mostrado como alvo potencial para o desenvolvimento de novos fármacos e para ferramentas de detecção de infecção (Nagataki, *et al.*, 2012), confirmando a grande importância da caracterização destas enzimas.

Abundantes em Nematoda, as proteínas transtirretina-like são muito estudadas em *C. elegans*. Estando, até o momento, de função ainda obscura, esta proteína tem sido identificada como de atividade no sistema nervoso de helmintos de *Radopholus similis* (Jacob *et al.*, 2007), participando ainda no reconhecimento de células em processos de apoptose por fagócitos em *C. elegans* (Wang *et al.*, 2010). Mesmo com o desconhecimento quanto a função biológica destas proteínas, devido a especificidade dessa família de genes em Nematoda, a mesma se coloca como alvo promissor para estudos de novas estratégias de controle de helmintos (Jacob *et al.*, 2007).

Muito conhecidas por sua grande importância, as histonas tem suas modificações relacionadas a processos biológicos envolvendo a manipulação e expressão do DNA (Bannister & Kouzarides, 2011). Codificadas por um gene que apresenta uma região chave em forma de *Hairpin*, a qual proteínas envolvidas na regulação da expressão gênica ligam-se,

observou-se em experimento com o silenciamento da expressão gênica dessas proteínas reguladoras em *C. elegans*, o aparecimento de embriões com fenótipo letal provocado por defeitos na condensação dos cromossomos (Pettit *et al.*, 2002).

## 7. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos nesse trabalho, algumas conclusões a respeito dos procedimentos executados com larvas de *Hysterothylacium* sp. podem ser inferidas:

- a. As extrações com a utilização do tampão CHAPS não apresentaram resultados significativos, os quais não foram passíveis de serem analisados pelas etapas subsequentes, para o número de vermes utilizados.
- b. Devido ao pouco rendimento proteico proveniente da extração com tampão CHAPS, não foi possível a obtenção de *spots* com intensidade suficiente para a identificação das proteínas, não tendo sido possível definir seu perfil de distribuição.
- c. A eletroforese monodimensional mostrou-se mais vantajosa por permitir que a extração ocorresse com tampão SDS-PAGE, no entanto, com a limitação de apenas permitir a separação das proteínas em uma única dimensão;
- d. No trabalho foi possível a identificação de proteínas com *pI* maiores que 10 e massas moleculares maiores que 160KDa, sendo essa faixa de *pI* e massa molecular difícil de se detectar pela eletroforese bidimensional, podemos atrelar esses achados como uma vantagem da utilização da eletroforese monodimensional.
- e. A técnica de espectrometria de massa que apresentou maior eficácia na análise das amostras proteicas de larvas de *Hysterothylacium* sp. coletadas a partir de peixes *T. lepturus* capturados na costa do Rio de Janeiro, foi a LC-MS/MS, a qual permitiu identificar 87 proteínas provenientes de um material de baixo conteúdo proteico.
- f. A identificação das proteínas aqui apresentadas corroboram aos achados relatados em outros trabalhos proteômicos realizados com Nematoda.
- g. A detecção de proteínas com caráter imunogênico, segunda a literatura, agrega importância adicional aos achados desse trabalho
- h. Um grande número de proteínas ribossomais e proteínas com diversas funções foram identificadas: metabólicas, estruturais, sinalizadoras, reguladoras, envolvidas no transporte e armazenamento, dentre outras. Além das proteínas com importância adicional como:

potencial vacinal e candidatas a alvos anti-helmínticos, potencial para estudos filogenéticos e biomarcadores;

i. Os diversos processos biológicos em larvas de *Hysterothylacium* sp. foram bem evidenciadas com a utilização do aplicativo ClueGo, com a predição de 54 processos aos quais as proteínas podem estar envolvidas, seus agrupamentos e o número de genes relacionados, sendo os valores percentuais, seu significado estatístico por PValue e legitimidade das informações baseada nos valores de Kappa.

j. Os dados preditos pelo aplicativo ClueGo nos permite avançar no conhecimento das funções das proteínas envolvidas em diferentes processos biológicos, com o desenvolvimento e avaliação de novas abordagens para sua caracterização.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNUR, P.V. **Imageamento químico por espectrometria de massas utilizando MALDI (MALDI imaging mass spectrometry) aplicado a tecidos vegetais**. 2011. 6f. Circular Técnica – Embrapa Agroenergia, Brasília DF, 2011.
- ABEBE, W; TSUJI, N; KASUGA-AOKI, H; MIYOSHI, T; ISOBE, T; ARAKAWA, T; MATSUMOTO, Y; YOSHIHARA, S. 2002. Species-specific proteins identified in *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* using two-dimensional electrophoresis. **Parasitology Research** 88:868-871.
- ACHA, P.N; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Volume 3. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud, 2003. p. 241-246.
- ACS, P; SZALLASI, Z; KAZANIETZ, M.G; BLUMBERG, P.M. 1995. Differential activation of PCK isozymes by 14.3.3 protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 216(1):103-109.
- ADROHER, F.J; VALERO, A; RUIZ-VALERO, J; IGLESIAS, L. 1996. Larval anisakids (Nematoda: Ascaridoidea) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish Market in Granada (Spain). **Parasitology Research** 82:253-256.
- ALTSCHUL, S.F; GISH, W; MILLER, W; MYERS, E.W; LIPMAN D.J. 1990. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** 215(3):403-410.
- ARTS, M.J.S.J; SCHILL, R.O; KNIGGET, T; ECKWERT, H; KAMMENGA, J.E; KÖHLER, H.R. 2004. Stress Proteins (hsp70, hsp60) Induced in Isopods and Nematodes by Field Exposure to Metals in a Gradient near Avonmouth, UK. **Ecotoxicology** 13:739-755.
- AUDICANA, M.T; ANSOTEGUI, I.J; CORRES, L.F; KENNEDY, M.W. *Anisakis simplex*: dangerous-dead and alive?. **TRENDS in Parasitology** 18(1):20-25.
- BALBUENA, J.A; KARISBAKK, E; SAKSVIK, M; KVENSETH, A.M; NYLUND, A. 1998. New data on the early development of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda, Anisakidae). **The Journal of Parasitology** 84(3):615-617.

- BANNISTER, A.J; KOUZARIDES, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research** 21:381-395.
- BENIGNO, R.N.M; SÃO CLEMENTE, S.C; MATOS, E.R; PINTO, R.M; GOMES, D.C; KNOFF, M. 2012. Nematodes in *Hoplerytinus unitaeniatus*, *Hoplias malabaricus* and *Pygocentrus nattereri* (pisces characiformes) in Marajó Island, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal** 21(2):165-170.
- BERANOVA-GIORGIANNI, S. 2003. Proteome analysis by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in Analytical Chemistry** 22(5):273-281.
- BHANDARY, Y.P; KRITHIKA, K.N; KULKARNI, S; REDDY, M.V.R; HARINATH, B.C. 2006. Detection of enzymes dehydrogenases and proteases in *Brugia malayi* filarial parasites. **Indian Journal of Clinical Biochemistry** 21(1):1-7.
- BORGES, J.N; CUNHA, L.F.G; SANTOS, H.L.C; MONTEIRO-NETO, C; SANTOS, C.P. 2012. Morphological and Molecular Diagnosis of Anisakid Nematode Larvae from Cutlassfish (*Trichiurus lepturus*) off the Coast of Rio de Janeiro, Brazil. **Plos one** 7:1-14.
- BRASIL. 2010. Ministério da pesca e aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura.** Disponível em : <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20Estat%203%ADstico%20MPA%202010.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%203%ADstico%20MPA%202010.pdf)>.
- BRASIL. 2011. Ministério da pesca e aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura.** Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf)>.
- BICUDO, A.J.A; TAVARES, L.E.R; LUQUE, J.L. 2005. Metazoários parasitos da cabrinha *Prionotus punctatus* (Bloch, 1793) (Osteichthyes: Triglidae) do litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 14(1): 27-33.
- BINDEA, G; MLECNIK, B; HACKL, H; CHAROENTONG, P; TOSOLINI, M; KIRILOVSKY, A; FRIDMAN W.H; PAGÈS, F; TRAJANOSKI, Z; GALON, J. 2009.

ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. **Bioinformatics** 25:1091–1093.

BITTAR, V.T; CASTELLO, B.F.L; DI BENEDITTO A.P.M. 2008. Hábito alimentar do peixe-espada adulto, *Trichiurus lepturus*, na costa norte do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. **Biotemas** 21(2):83-90.

CARDOSO, J.M.S; FONSECA, L; GOMES, P; EGAS, C; ABRANTES, I. (140) **Gene silencing in *Bursaphelenchus xylophilus*: knock down of a calponin gene and its effect on nematodes movement.** 2013. 3f. International Conference on Pine Wilt Disease, 2013.

CHAI, J.Y; MURRELL, K.D; LYMBERY, A.J. 2005. Fish borne parasitic zoonoses: Status and issues. **International Journal for Parasitology** 35:1233-1254.

CHEN, N; XU, M.J; NISBET, A.J, HUANG, C.Q; LIN, R.Q; YUAN, Z.G; SONG, H.Q; ZHU, X.Q. 2010. *Ascaris suum*: RNAi mediated silencing of enolase gene expression in infective larvae. **Experimental Parasitology** 127:142-146.

CHENG, M.Y; HARTL, F.U; HORWICH, A.L. 1990. The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. **Nature** 348(6300):455-458.

EL-MEZQUELDI, M. 1996. Calponin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** 28(11):1185-1189.

FAO. 1997. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Assurance of seafood quality.** Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/T1768E/T1768E03.htm>>.

FAO. 2000. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Parte 2. Temas de interés para los pescadores y acuicultores.** Disponible em: <[http://www.fao.org/docrep/003/X8002S/x8002s05.htm#P0\\_0](http://www.fao.org/docrep/003/X8002S/x8002s05.htm#P0_0)>.

FAO. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Species fact sheets.** Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/species/2468/en>>.

FELIZARDO, N.N; MENEZES, R.C; TORTELLY, R; KNOFF, M; PINTO, R.M; GOMES, D.C. 2009. Larvae of *Hysterothylacium* sp. (Nematoda Anisakidae) in the sole fish

*Paralichthys isósceles* Jordan, 1890 (Pisces: Teleostei) from the litoral of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology** 166:175-177.

FONTENELLE, G; KNOFF, M; FELIZARDO, N.N; LOPES, L.M.S; SÃO CLEMENTE, S.C. 2013. Nematodes of zoonotic importance in *Cynoscion guatucupa* (Pisces) in the state of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal** 22(2):281-284.

GARBIS, S; LUBEC, G; FOUNTOULAKIS, M. 2005. Limitations of current proteomics technologies. **Journal of Chromatography A** 1077:1-18.

GELLER, M; GELLER, P. 1999. Reações alérgicas provocadas por *Anisakis simplex* após a ingestão de peixes parasitados. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia** 22(2):60-62.

GERDT, S; LOCKNIT, G; DENNIS, R.D; GEYER, R. 1997. Isolation and structural analysis of three neutral glycosphingolipids from a mixed population of *Caenorhabditis elegans*. **Glicobiology** 7(2):265-275.

GHOSH, I; EISINGER, S.W; RAGHAVAN, N; SCOTT, A.L. 1998. Thioredoxin peroxidases from *Brugia malayi*. **Molecular and Biochemical Parasitology** 91(2): 207-220.

GHOSH, I., RAGHAVAN, N; FITZGERALD, P.C; SCOTT, A.L. Nucleoside diphosphate kinase from the parasitic nematode *Brugia malayi*. **Gene** 164(2):261-266.

GONZALEZ, I; GARCIA, T; HERNANDEZ, Pablo.E; MARTIN, R. 2001. **Alimentaria** 321:55-60.

GOUNARIS, K; THOMAS, S; NAJARRO, P; SELKIRK, M.E. 2001. Secreted variant of Nucleoside Diphosphate Kinase from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spirallis*. **Infection and immunity** 69(6):3658-3662.

HAIMOVICI, M; MARTINS, A.S; FIGUEIREDO, J.L; VIEIRA, P.C. 1994. Demersal bony fish of the outer shelf and upper slope of the southern Brazil subtropical convergence ecosystem. **Marine Ecology Progress Series** 108:59-77.

HASUNUMA, K; YABE, N; YOSHIDA, Y; OGURA, Y; HAMADA, T. 2003. Putative functions of nucleoside diphosphate kinase in plants and fungi. **Journal of Bioenergetic and Biomembranes** 35(1):57-65.

- HENKLE-DÜHRSEN, K; KAMPKÖTTER, A. 2001. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. **Molecular and Biochemical Parasitology** 114(2):129-142.
- HEWITSON, J.P; HARCUS, Y.M; CURWEN, R.S; DOWLE, A.A; ATMADJA, A.K; ASHTON, P.D; WILSON, A; MAIZELS, R.M. 2008. **Molecular & Biochemical Parasitology** 160:8-21.
- ISLAM, M.K; MIYOSHI, T; YOKOMIZO, Y; TSUJI, N. 2004. The proteome expression patterns in adult *Ascaris suum* under exposure to aerobic/anaerobic environments analyzed by two-dimensional electrophoresis. **Parasitology Research** 93:96-101.
- JACOB, J; VANHOLME, B; HAEGEMAN, A; GHEYSEN, G. 2007. Fou transthyretin-like gene of the migratory plant parasitic nematode *Radopholus similis*: Members of an extensive nematodes-specific family. **Gene** 40(2): 9-19.
- JONES, M.K; YANG, W; MAC MANUS, D.P. 2001. Immunolocalization of the 38.3 kDa calponin-like protein in stratified muscles of the tail of *Schistosoma japonicum* cercariae. **Parasitology International** 50:129-133.
- KAJI, H; TSUJI, T; MAWUENYEGA, K.G; WAKAMIYA, A; TAOKA, M; ISOBE, T. 2000. Profiling of *Caenorhabditis elegans* proteins using two-dimensional gel electrophoresis and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-mass spectrometry. **Electrophoresis** 21:1755-1765.
- KIEL, M; JOSH, P; JONES, A; WINDON, R; HUNT, P; KONGSUWAN, K. 2007. **International Journal for Parasitology** 37:1419-1429.
- KIJEWSKA, A; ROKICKI, J; SITKO, J; WEGRZYN, G. 2002. Ascaridoidea: a simple DNA assay for identification of 11 species infecting marine and freshwater fish, mammals, and fish-eating birds. **Experimental Parasitology** 101:35-39.
- KLIMPEL, S; RÜCKERT, S. 2005. Life cycle strategy of *Hysterothylacium aduncum* to become the most abundant anisakid fish nematode in the North Sea. **Parasitology Research** 97:141-149.

- KOEI, M. 1993. Aspects of the life cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). **Canadian Journal of Zoology** 71(7):1289-1296.
- KNOFF, M; SÃO CLEMENTE, S.C; DA FONSECA, M.C.G; DE ANDRADE, C.D.G; PADOVANI, R.D.E.S; GOMES, D.C. 2007. Anisakidae parasitos de condro-rosa, *Genypterus brasiliensis* Regan, 1903 comercializados no estado do Rio de Janeiro, Brasil de interesse na saúde pública. **Parasitologia Latinoamericana** 62:127:133.
- KUSHWAHA, V; KUMAR, V; VERMA, S.K; SHARMA, R; SIDDIQI, M.I; MURTHY, P.K. 2014. Disorganized muscle protein-1 (DIM-1) of filarial parasite *Brugia malayi*: cDNA cloning, expression, purification, structural modeling and its potential as vaccine candidate for filarial infection. **Vaccine** 32:1693-1699.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227(5259):680-685.
- LEE, Y.H; HUANG, X.Y; HIRSH, D; FOX, G.E; HECHT, R.M. 1992. Conservation of gene organization and *trans*-splicing in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes of *Caenorhabditis briggsae*. **Gene** 121:227-235.
- LUQUE, J.L. 2004. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 13:161-165.
- LI, L; LIU, Y.Y; ZHANG, L.P. 2012. Morphological and genetic characterization of *Hysterothylacium zhoushanensis* sp. nov. (Ascaridida: Anisakidae) from the flatfish *Pseudorhombus oligodon* (Bleeker) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) in the East China Sea. **Parasitology Research** 111:2393-2401.
- MARTINS, A.S; HAIMOVICI, M. 1996. Distribution, abundance and biological interactions of the cutlassfish *Trichiurus lepturus* in the southern Brazil subtropical convergence ecosystem. **Fisheries Research** 30:217-227.
- MARTINS, A.S; HAIMOVICI, M. 2000. Reproduction of the cutlassfish *Trichiurus lepturus* in the southern Brazil subtropical convergence ecosystem. **Scientia Marina** 64(1):97-105.

- MATTIUCCI, S.; NASCETTI, G. 2008. Chapter 2 Advances and trends in the molecular systematics of Anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host—parasite co-evolutionary processes. **Advances in Parasitology** 66:47-148.
- MATTIUCCI, S; PAOLETTI, M; BORRINI, F; PALUMBO, M; PALMIERI, R.M; GOME, V; CASATI, A; NASCETTI, G. 2011. First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. **BMC Infections Diseases** 11:82-87.
- MEDZIHRADESKY, K.F; CAMPBELL, J.M; BALDWIN, M.A; FALICK, A.M; JUHASZ, P; VESTAL, M.L; BURLINGAME, A.L. 2000. The Characteristics of Peptide Collision-Induced Dissociation Using a High-Performance MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometer. **Analytical Chemistry** 72(3):552-558.
- MINÁRIK, P; TOMÁSKOV, M; KOLLÁROVÁ, M; ANTALÍK, M. 2002. Matala dehydrogenases – Structure and function. **General Physiology Biophysics** 21:257-265.
- MORENO, Y; GEARY, T.T. 2008. Stage- and Gender-Specific Proteomic Analysis of *Brugia malayi* Excretory-Secretory Products. **Plos Neglected Tropical Diseases** 2:1-12.
- NARVAS, A; LÓPEZ, J.A; ESPÁRRAGO, G; CAMAFEITA, E; ALBAR, J.P. 2002. Protein Variability in *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) Revealed by Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. **Journal of Proteome Research** 1:421-427.
- NAGATAKI, M; UDA, K; JARILLA, B.R. 2012. Molecular and catalytic properties of an arginine kinase from the nematode *Ascaris suum*. **Journal of helminthology** 86(3):276-286.
- NAVONE, G.T; SARDELLA, N.H; TIMI, J.T. 1998. Larvae and adults of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda: Anisakidae) in fishes and crustaceans in the South west Atlantic. **Parasite** 5(2):127-136.
- NEVES, D.N. **Helminhos parasitos de peixes de importância higiênico-sanitária**. 2009. 57f. Monografia (Pós graduação Lato sensu em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Castelo Branco UBC, Belém, PA, 2009.

- OKUMURA, M.P.M; PÉREZ, A.C.A; FILHO, A.E. 1999. Principais zoonoses parasitárias transmitidas por pescado – revisão. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP** 2:66-80.
- OVERSTREET, R.M; MEYER, G.W. 1981. Hemorrhagic lesions in stomach of Rhesus monkey caused by a piscine ascaridoid nematode. **Journal of Parasitology** 67(2): 226-235.
- PASTERNAK, J. 2012. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. **Einstein** 1(1):118-119.
- PENG, J; ELIAS, J.E; THOREEN, C.C; LICKLIDER, L.J; GYGI, S.P. 2002. Evaluation of Multidimensional Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC/LC-MS/MS) for Large-Scale Protein Analysis: The Yeast Proteome. **Journal of Proteome Research** 2:43-50.
- PÉREZ, A.C.A. 1999. Empreendimentos piscícolas e o médico veterinário. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP** 2:43-65.
- PÉREZ-ARELLANO, J.L; ANDRADE, M.A; LÓPEZ-ABÁN, J; CARRANZA, C, MURO, A. 2006. Helminths and the Respiratory System. **Archivos de Bronconeumología** 42(2):81-91.
- PETTIT, J; CROMBIE, C; SCHÜMPERLI, D; MÜLLER, B. 2002. The *Caenorhabditis elegans* histone hairpin-binding protein is required for core histone gene expression and is essential for embryonic and postembryonic cell division. **Journal of Cell Science** 115:857-866.
- RABILLOUD, T. 1999. Solubilization of protein in 2D electrophoresis: An outline. **Methods in Molecular Biology** 112:9-19.
- RABILLOUD, T. 1992. A comparison between low background silver diammine and silver nitrate proteins stains. **Electrophoresis** 13(7):429-439.

- RAFFEL, T.R; ANDERSON, T.K. 2009. A new species of Hysterothylacium (Nematoda: Anisakidae) from the stomach of the red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens*, from Pennsylvania fishless ponds. **Journal of Parasitology** 95(6):1503-1506.
- REBELLO, K.M; BARROS, J.S.L; MOTA, E.M; CARVALHO, P.C; PERALES, J; LENZI, H.L; NEVES-FERREIRA, A.G.C. 2011. Comprehensive proteomic profiling of adult *Angiostrongylus costaricensis* a human parasitic nematode. **Journal of proteomics** 74:1545-1559.
- ROBINSON, M.W; CONNOLY, B. **Proteomic analysis of the excretory-secretory protein of the *Trihinella spiralis* L1 larva, a nematode parasite of skeletal muscle.** 2005. 23f. School of Medical Sciences, Institute of Medical Sciences - University of Aberdeen, Scotland UK, 2005.
- ROCHA, T.L; COSTA, P.H.A; MAGALHÃES, J.C.C; EVARISTO, R.G.S; VASCONCELOS, E.A.R; COUTINHO, M.V; PAES, N.S; SILVA, M.C.M; GROSSI-DE-SÁ, M.F. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas.** 2005. 12f. Comunicado técnico – Embrapa recursos genéticos e biotecnológicos, Brasília DF, 2005.
- ROSSIN, M.A; DATRI, L.L; INCORVAIA, I.S; TIMI, J.T. 2011. A new species of Hysterothylacium (Ascaridoidea, Anisakidae) parasitic in *Zenopsis conchifer* (Zeiformes, Zeidae) from Argentinean Waters. **Acta parasitologia** 56(3):310-314.
- ROZENBLUM, G.T; GIMONA, M. 2007. Calponins: adaptable modular regulators of the actin cytoskeleton. 2007. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 40(10):1990-1995.
- SABAS, C.S.S; LUQUE, J.L. 2003. Metazoan parasites of weakfish, *Cynoscion guatucupa* and *Macrodon ancylodon* (Osteichthyes: Sciaenidae), from the coastal zone of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 12(4):171-178.
- SAZ, H.J; LERCURE, O.L. 1967. Glyconeogenesis, fructose-1,6-diphosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities of *Ascaris lumbricoides* adult muscle and larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology** 22:15-28.
- SCHÄGGER, H. 2005. Tricine-SDS-PAGE. **Nature Protocol** 1(1):16-22.

- SHAMSI, S; GASSER, R; BEVERIDGE, I. 2013. Description and genetic characterisation of *Hysterothylacium* (Nematoda: Raphidascarididae) larvae parasitic in Australian marine fishes.
- SHARMA, R.K; SINGH, L; SAXENA, R; SAXENA, K.K. 1986. effect of some anthelmintics on malate dehydrogenase activity and mortality in two avian nematodes *Ascaridia galli* and *Heterakis gallinae*. **Angewandte Parasitologie** 27(3):175-180.
- SHEVCHENKO, A; TOMAS, H; HAVLIS, J; OLSEN, J.V; MANN, M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocol** 1(6):2856-2860.
- SKUCE, P.J; STEWART, E.M; SMITH, W.D; KNOX, P. 1999. Cloning and characterization of glutamate dehydrogenase (GDH) from the gut of *Haemonchus contortus*. **Parasitology** 18(3):297-304.
- TOKER, A; SELLERS, L.A; AMESS, B; PATEL, Y, HARRIS, A; AITKEN, A. 1992. Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor (KCIP-1/14-3-3) from sheep brain Amino acid sequence of phosphorylated form. **European Journal of Biochemistry** 206:453-461.
- UDA, K; FUJIMOTO, N; AKIYAMA, Y; MIZUTA, K; TAMAKA, L; ELLIGTON, N.R; SUKUKI, T. 2006. Evolution of the arginine kinase gene family. **Comparative Biochemistry and Physiologi** 1(2):209-218.
- VIEIRA, P; BANORA, M.Y; CASTAGNONE-SERENO, P; ROSSO, M.N; ENGLER, G; ENGLER, J.A. 2012. An Immunocytochemical Procedure for Protein Localization in Various Nematode Life Stages Combined with Plant Tissues Using Methylacrylate-Embedded Specimens. **Phytopathology** 102(10):990-996.
- WANG, X; LI, W; ZHAO, D; LIU, B; SHI, Y; CHEN, B; YANG, H; GUO, P; GENG, X; SHANG, Z; PEDEN, E; KAGE-NAKADAI, E; MITANI, S; XUE, D. 2010. *Caenorhabditis elegans* transthyretin-like protein TTR-52 mediates recognition of apoptotic cells by the CED-1 phagocyte receptor. **Nature Cell Biology** 12:655-664.
- YAGI, K; NAGASAWA, K; ISHIKURA, H; NAKAGAWA, A; SATO, N; KIKUCHI, K; ISHIKURA, H. 1996. Female worm *Hysterothylacium aduncum* excreted from human. **Journal of Parasitology** 45(1):12-23

- YAN, F; XU, L; LIU, L; YAN, R; SONG, X; LI, X. 2010. Immunoproteomic analysis of whole proteins from male and female adult *Haemonchus contortus*. **The veterinary Journal** 185:174-179.
- YARBROUGH, P.O; HAYDEN, M.A; DUNN, L.A; VERMERSCH, P.S; KLASS, M.R; HECHT, R.M. 1987. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family in the nematode, *Caenorhabditis elegans*: isolation and characterization of one of the genes. **Biochimica et Biophysica Acta** 908:21-33.
- YEW J.Y; DIKLES, S; STRETTON, A.O. 2003. *De novo* sequencing of novel neuropeptides directly from *Ascaris suum* tissue using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight. **Rapid Communication in Mass Spectrometry** 17:2693-2698.
- ZULOAGA, J; ARIAS, J; BALIBREA, J.L. 2004. Anisakis digestiva: Aspectos de interés para el cirujano. **Cirugía Española** 75(1):9-13.

## ANEXOS

Tabela 1 - Identificação de proteínas extraídas de larvas de *Hysterothylacium* sp. As proteínas foram separadas por eletroforese monodimensional, identificadas por LC-MS/MS, algoritmo MASCOT e *software* SCAFFOLD contra os bancos de dados NEMBASE4 e NCBIInr. Foram utilizadas também as ferramentas Pepnovo (*De Novo Peptide Sequencing via Probabilistic Network Modeling*) e MS-BLAST (<http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>).

Nº de acesso NEMBASE4	Nº de acesso NCBIInr	Nome das proteínas	Organismo ao qual foi descrita	Função	NPI	Sequência de peptídeos	Número de resíduos (aa)	Massa molecular (Da)	Ponto isoelétrico
>ALP00899_1	ERG81670.1	Proteína ribossomal 40S S26	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	DISDASAYESYPLPK NIVEAAAVR	121	13758.31	11.10
>ASP01234_1	ERG78782.1	Proteína ribossomal 40S S17	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	DNYMPEISVVDPR IAGFITHLMK	135	15738.39	9.69
>ASP00628_2	ERG87338.1	Proteína ribossomal 40S S13	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	KGLRPSQIGVILR LTSEDVQEQITR	152	17397.65	10.80
>ASP01358_1	ERG81369.1	Proteína ribossomal 40S S6	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	KGEQEIPGLDITVPR MAQEVEADALGDEWK	228	26407.73	10.57
>ALP00089_1	ERG79404.1	Proteína ribossomal 40S S18	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	1	IPNWFLNR	154	17899.68	10.49
>ASP01345_1	ERG83269.1	Proteína ribossomal 40S S8	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	IVDTVYNASNNELV LDVGNFSWGSEGITR	208	23875.95	10.54
>AIP00055_1	ERG80845.1	Proteína ribossomal 40S S16	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	1	IKLQEPILLIGK	145	16553.07	10.26
>ALP00327_1	CAA82999.1	Proteína ribossomal 40S S195	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	3	ALQTLEAIK LGITKELAPVDSWYYVR VKVPEWSDLVK	150	16954.27	10.43
>ASP01375_1 >BMP11634_1	ERG82483.1	Proteína ribossomal 40S S15	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	GVDLDQLDMNRDQ LAKDMIVLPEMVG SVVGVYNGK	152	17365.56	10.54
>AIP00253_1	ERG83155.1	Proteína ribossomal S4	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	EKHGPGSFDIVHIK ESLPLILFLR	262	29554.00	10.38
>ASP00431_3	ERG80784.1	Proteína ribossomal 60S L17	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	1	SAEFLQLLR	186	21626.43	10.07
>ASP00965_1	ERG81585.1	Proteína ribossomal 60S L12	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	HSADLSIDQIINIAR IDVVPSAASLIK	165	17763.69	9.49
>ASP17373_1	ERG80123.1	Proteína ribossomal 60S L18	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	AGGEIITFDQLALR GENTLLIQGPR	225	25691.35	11.61
>ALP00617_1	ERG85329.1	Proteína ribossomal 60S L35	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	ILTVINQTQK QLDEQKTELASLQVSK	123	14184.34	11.31
>ALP00004_1	ERG85836.1	Proteína ribossomal 60S L38	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	1	QITEIKEFLTAR	70	8199.69	10.01
>ASP00556_1	ERG85579.1	Proteína ribossomal 60S L8	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	GAPLAIVQFR GVVKDIIHDPGR	260	28337.18	10.74
>ASP01341_1	ERG85443.1	Proteína ribossomal 60S L31	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	KLTTVNVDSSE TLVTHVPVTSFK**	127	14870.04	10.60
>PTP04423_1	ERG79484.1	Proteína ribossomal 60S L36	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	1	QRDEVQAILTNMR	102	11989.82	11.49
>ASP00211_1	ERG79127.1	Proteína ribossomal 60S L6	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	1	FLFGYMGR	251	28264.47	10.65

Nº de acesso NEMBASE4	Nº de acesso NCBInr	Nome das proteínas	Organismo ao qual foi descrita	Função	NPI	Sequência de peptídeos	Número de resíduos (aa)	Massa molecular (Da)	Ponto isoelétrico
>ASP27299_1 >XIP01727_1	ERG83884.1	Proteína ribossomal 60S L13	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	LGYGFTLEELKAVGIGR SVESLQQNVQR	213	24648.66	11.23
>ALP01065_1	ERG86236.1	Proteína ribossomal 60S L13a	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	1	LAHEVGWQYQDVVAK	203	23490.97	10.65
>ASP00195_1	ERG79917.1	Proteína ribossomal 60S L5	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	VGLTNYAAAYATGLLLAR KDLLTQLAYAR**	258	29582.42	9.64
>ASP00586_1	ERG83043.1	Proteína ribossomal 60S L10	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	1	VDIGDLLISVR	214	24824.87	9.99
>ASP13657_1	ERG83440.1	Proteína ribossomal 60S L23a	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	1	LAPDYDALDVANKIGII	210	23891.20	10.26
>ASP00458_1						NLFVIAVYGIK			
>PTP03392_1	ERG81802.1	Proteína ribossomal 60S L23	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	ISLALPVGAVMNCADNTGAK	140	14885.02	10.58
>AIP00152_1	ERG81656.1	Proteína ribossomal ácida 60S P1	<i>Ascaris suum</i>	Ribossomal	2	AAHVEVEPFWPLFAK ALEGVDDVK	122	12436.16	4.37
>ACP00463_1	EYB99416.1	<i>Hypothetical protein</i> Y032_0122g1039	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	Ribossomal	1	VLEQLTGQTPVFSK	196	22331.05	10.13
>ACP02024_1	EYC13195.1	<i>Hypothetical protein</i> Y032_0044g1026	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	Ribossomal	1	TSFFQALQIPTK	315	34290.96	6.93
>OVP00582_1	XP_001894896.1	Proteína ribossomal 40S S10	<i>Brugia malayi</i>	Ribossomal	2	AIYEYLFK THPDIPNVTNLEVIK	164	18515.54	9.52
>AIP00299_1	XP_001894478.1	Proteína ribossomal 40S S9	<i>Brugia malayi</i>	Ribossomal	1	QIVNVPSFIVR	192	22364.55	11.05
>BMP00817_1	XP_001901838.1	Proteína ribossomal 40S S23	<i>Brugia malayi</i>	Ribossomal	1	VANTSLIALFK	144	16003.84	10.70
>ASP17365_1	XP_001895164.1	Proteína ribossomal 40S S28	<i>Brugia malayi</i>	Ribossomal	1	EGDILTLEAER	66	7398.06	9.85
>AIP00156_1	XP_001901957.1	Proteína ribossomal 40S S25	<i>Brugia malayi</i>	Ribossomal	1	STKADESAIVE	126	13705.63	10.12
>ASP00122_1	XP_001896338.1	Proteína ribossomal 60S L7	<i>Brugia malayi</i>	Ribossomal	10	IVDPYVAWGYPNMK KVLQLLR ATNFLWPFK KLPVAVPETILK HDLLYKR** LTDNALVE** FYVPDPTR** EHSLVENSLG** LPLTDN** NALLKK**	249	29130.01	10.62

Nº de acesso NEMBASE4	Nº de acesso NCBInr	Nome das proteínas	Organismo ao qual foi descrita	Função	NPI	Sequência de peptídeos	Número de resíduos (aa)	Massa molecular (Da)	Ponto isoelétrico
>PPP00044_1	EGT36335.1	Hypothetical protein CAEBREN_05980	<i>Caenorhabditis brenneri</i>	Ribossomal	2	TIAECLADELINA VNQAMWLLCTGAR	210	23113.24	9.83
>HCP00673_1	CDJ82518.1	Proteína ribossomal 60S L14	<i>Haemonchus contortus</i>	Ribossomal	1	IATIVDVVDGNR	135	15396.83	11.00
>NBP00407_1	CDJ82904.1	Proteína contendo domínio ribossomal L7Ae L30e S12e Gadd45	<i>Haemonchus contortus</i>	Ribossomal	1	LLDLVQQALNYK	128	14016.56	7.73
>ASP00138_1	EFO25684.2	Proteína ribossomal 40S S2	<i>Loa loa</i>	Ribossomal	2	TYSYLTPLDWK YWEFLAQTPVR	271	29466.69	10.23
>ALP00577_1	XP_003141401.1	Proteína ribossomal 60S L30	<i>Loa loa</i>	Ribossomal	2	SEIEYYAMLAK VCTMSITDPGDSDIIR	112	12273.43	9.75
>ASP00276_1	EFO17796.2	Hypothetical protein LOAG_10701	<i>Loa loa</i>	Ribossomal	3	KVWLDPNVNEISNANSR NLMEFIFKR KPVAVHSR	209	25060.99	11.31
>ASP00314_2	XP_003139379.1	Proteína ribossomal 60S L7a	<i>Loa loa</i>	Ribossomal	1	LKETVTTNFNER	249	28634.86	10.56
>PPP00180_1	ABR87600.1	Proteína ribossomal subunidade maior 2	<i>Pristionchus pacificus</i>	Ribossomal	1	TSGNYATVIAHNPDTK	260	28543.23	10.74
>ACP07262_1						LISWYDNEFGYScR VPTPDVSVVDLTcR GAAQNIIPASTGAAK VVDLLSYLAHH** LSMNPH**	360	38476.52	7.73
>ACP01080_1	ERG79426.1	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	<i>Ascaris suum</i>	Metabólica	5				
>ALP00060_1	ERG79150.1	Glutamato desidrogenase	<i>Ascaris suum</i>	Metabólica	1	TAAYANAIEKVYNTYR	538	59677.40	7.93
>ACP22460_1	XP_001897269.1	Triose fosfato isomerase	<i>Brugia malayi</i>	Metabólica	1	IVIAIEPVWAIGTGK	247	27080.22	8.30
>BMP05321_1						ANVPIFFIVGGPGSGK IPSEGTIDVFK	387	44494.32	9.05
>TCP00164_1	XP_001894222.1	Adenilato quinase isoenzima 1	<i>Brugia malayi</i>	Metabólica	3	YGLTHLSSGDLRL			
>BMP07010_1	XP_001901095.1	Adenosilhomocisteinase	<i>Brugia malayi</i>	Metabólica	1	VIVTEIDPINALQAAMEGYEVK	409	45144.21	5.93

Nº de acesso NEMBASE4	Nº de acesso NCBInr	Nome das proteínas	Organismo ao qual foi descrita	Função	NPI	Sequência de peptídeos	Número de resíduos (aa)	Massa molecular (Da)	Ponto isoelétrico
>CJP00862_1	NP_497134.1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase-1 isoforma a	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Metabólica	7	EIWSFGSGYGGNSLLGK VLDWILKR FLWPGFGENIR LNPEAGFMGVAP** DLAETPLGMVPK** VVDVLTHK** FMSYNY**	651	73152.50	6.03
>BUP01149_1	AAO49799.1	Arginina quinase	<i>Heterodera glycines</i>	Metabólica	1	LGWLTFCPTNLGTTVR	360	39937.60	8.49
>AIP00062_1	XP_003139722.1	Nucleosídeo difosfato quinase	<i>Loa loa</i>	Metabólica	2	LMLGATNPLASNPGTIR ESLEAAQ**	153	17378.79	7.79
>BXP01625_1	ETN79000.1	Malato desidrogenase NAD dependente	<i>Necator americanus</i>	Metabólica	3	VLVVGPNPANTNALIAAK LVGAMPR** PTVLVLL**	378	40652.86	6.46
>ACP01204_1 >SRP00979_1 >DIP01904_1	ADH95417.1	Enolase	<i>Steinernema feltiae</i>	Metabólica	11	VNQIGSVTESIEAAKLSR GNPTVEVDLTTEKGIFR GLAGYTG** LPVTTLNVLN** EEMMLMPVGAK** VPLYK** VDQTVL** FNEAMGM** HEALEYR** LDGTANK** LVADDLVTNPKR**	436	47143.05	5.59
>ASP01133_1	ERG85616.1	Cadeia leve essencial	<i>Ascaris suum</i>	Estrutural	1	ITFEEWLPIYEQLSK	151	17221.78	4.88
>ASP00083_1	ERG80822.1	Filamento intermediário ifa-1	<i>Ascaris suum</i>	Estrutural	4	IDYQNQVQTLQEEIDFIR SYEALNDRDAQIR QIQELNFQLEDDQR TTGINEVADTETMR	582	67552.54	5.71
>ASP00006_2	P27393.1	Cadeia alfa 2(IV) do colágeno	<i>Ascaris suum</i>	Estrutural	1	LWDGYSLLYIEGNEK	1763	168421.24	8.62
>AIP00002_1	ERG87158.1	Actina 2	<i>Ascaris suum</i>	Estrutural	22	LCYVALDFEQEMATAASSSLEK DLYANNVLSGGSTMYPGIADR VAPEEHPVLLTEAPLNPK SYELPDGQVITVGNER LDLAGRDLTDYLMK IWHHTFYNELR AVFPSIVGRPR DSYVGDEAQS GYSFVTTAER AGFAGDDAPR EITALAPSTMK VAALVVDNNGSGMCK** YPLHLSLVTNWDD** YEGYAL** LMFQTY** CAEALF** KVLPPPE** GLLTLK** LVNDLKDK** LHHTFYNEL** KDEYD** PLYEQY**	376	41802.78	5.30

Nº de acesso NEMBASE4	Nº de acesso NCBInr	Nome das proteínas	Organismo ao qual foi descrita	Função	NPI	Sequência de peptídeos	Número de resíduos (aa)	Massa molecular (Da)	Ponto isoelétrico
>ASP00020_1	P23731.1	Filamento intermediário B	<i>Ascaris suum</i>	Estrutural	13	MVTEMGASASIGGISPALSANA AK INQWQHAIEDAQSELEMLR IDYQNVQVTLQEEIDFIR EVQNLNYQLNDDQR QSQESSEYEIAYR ELQALLAQAPADTR DIKDEYDYIAK YEAALNDRDAQIR LVADLDELGR SFLEATDKEK LRDDLAE LR THSLQQQESED S** ELVYTLPATNLLK**	589	67653.35	5.73
>BMP00967_1 >ACP05731_1 >PPP00062_1 >ASP00695_1	XP_001899601.1	Miosina cadeia pesada	<i>Brugia malayi</i>	Estrutural	12	INELQEALDAANSK GLDEAEAAEAEEK QIEEAEEVANLNLQK LVSDLDDAQVDVER SQLNALTR** DDLEDNLER** AQLELNK** QLSEGGR** VEMQPHQLQAR** EENMN** ELGDQLEQAQK** DQAE**	1957	225964.70	5.49
>ASP00790_1 >ACP25981_1 >BUP00547_1	XP_001898461.1	Proteína família troponina	<i>Brugia malayi</i>	Estrutural	4	DAEINELTIAVNDLR KENVIDDIVNKQMAK KGLTPER KTDKPEWSK	278	31017.18	4.94
>ASP02463_1	XP_002643901.1	Hypothetical protein CBG02161	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	Estrutural	24	LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK DLYANNVLSGGSTMYPGIADR VAPEEHPVLLTEAPLNPK SYELPDGQVITVGNR LDLAGRDLTDYLMK IWHHTFYNELR DSVVGDEAQS K GYSFVTTAER EITALAPSTMK AGFAGDDAPR AVFPSIVGRPR VAALVVDNGSGMCK** YPLHLSLVTNWDD** YEGYALTMGLLR** PLYEQY** CAEALF** KVLPPPE** GLLTLK** LMFQTY** LVNDLKDK** LHHTFYNEL** KDEYD** SALEQSY** FEAFDT**	372	41059.44	5.09

Nº de acesso NEMBASE4	Nº de acesso NCBIInr	Nome das proteínas	Organismo ao qual foi descrita	Função	NPI	Sequência de peptídeos	Número de resíduos (aa)	Massa molecular (Da)	Ponto isoelétrico
>TMP00013_1	NP_499809.1	Actina 5	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Estrutural	22	DLYANNVLSGGSTMYPGIADR VAPEEHPVLLTEAPLNPK LCYVALDFEQEMATAAASSSLEK SYELPDGQVITVGNER EITALAPSTMK IWHHTFYNELR LDLAGRDLTDYLMK AVFPSIVGRPR DSYVGDEAQS AGFAGDDAPR GYSFVTTAER VAALVVDNGSGMCK** YPLHLSLVTNWDD** YEGYAL** KVLPPPE** LMFQTY** GLLTK** LVNDLKDK**  PLYEQY**  MAEQLAAL** EALATLVVN** FEAFDT**	375	41845.87	5.44
>ASP04697_1	CDJ92091	Proteína contendo domínio tropomiosina	<i>Haemonchus contortus</i>	Estrutural	7	AEAGENKIVEEEELR ANTVESQLK KVQEAEEVAALNR LATEKLEEATHTADESER  MTLLEEELER SISEELDQTFQELSGY  AGAQQTSLLDVLK	302	35012.79	4.69
>ASP00589_1	XP_003137600.1	Proteína desorganizadora muscular 1	<i>Loa loa</i>	Estrutural	2	LTGFSAPTFFVEKPIQISSR PEGKAPHFPQQPVAR	321	35521.76	4.98
>ASP04174_1	ERG83538.1	32kDa Lectina lec-3 ligante de beta-galactosídeo	<i>Ascaris suum</i>	Outra função (ligante de carboidrato)	4	LTEPFEPGQTLIIK  NGDIALHFNPR SLLIFATPEKK YYPVPYESGIAADGLVPGK  EGASQAGMTGFGAFR	283	31882.26	6.08
>ALP00126_1						SQGMIPYQMGVNFILDSQAGK			
>AIP00168_1	ERG86671.1	Calponina-like proteína ov9m	<i>Ascaris suum</i>	Outra função (ligante de cálcio)	5	FASQQGMTGFGTVR IWELEYPEEAESLDR  SETIIPSQAGWNR	368	40705.09	8.46

Nº de acesso NEMBASE4	Nº de acesso NCBIInr	Nome das proteínas	Organismo ao qual foi descrita	Função	NPI	Sequência de peptídeos	Número de resíduos (aa)	Massa molecular (Da)	Ponto isoelétrico
>ASP08144_1	ERG87132.1	Transtirretina like proteína 46	<i>Ascaris suum</i>	Outra função (função não esclarecida)	2	VKLWEEDSGPDPDLDLQGYTDAQGMFNLK ELTTLDPVMK**	169	18861.76	6.09
>AIP00120_1	ERG84468.1	Peptidil prolil cis-trans isomerase 3	<i>Ascaris suum</i>	Outra função (isomerização da ligação peptídica entre uma prolina e um aminoácido precedente)	3	ILMELYSDIVPK VIPNFMCGGDFTR VQEVETVGSKSGK**	172	18483.16	7.68
>HGP07930_1	ERG78976.1	Aquaporina-10	<i>Ascaris suum</i>	Outra função (transporte de água pela bicamada lipídica)	1	KLVDLSLK	299	33574.07	8.56
>ASP00253_1	ERG82930.1	Domínio transferidor de elétrons da flavoproteína (putativo)	<i>Ascaris suum</i>	Outra função (transferência de elétrons)	1	LIYDLADKLK	362	37870.19	8.80
>ASP03352_1	ERG87814.1	Mioglobina (putativo)	<i>Ascaris suum</i>	Outra função (transporte de oxigênio)	1	TTDAFLAAMEK	143	16688.09	5.22
>ASP29877_1	ERG80783.1	Subunidade alfa associada ao polipeptídeo nascente	<i>Ascaris suum</i>	Outra função (ligam-se a polipeptídeos nascentes)	2	KADNDIVNAIMELTM NILFVINKPDVYK	216	23445.75	4.87
>ALP00664_1	ERG87647.1	Subunidade beta-2 like 1 da proteína ligante do nucleotídeo guanina	<i>Ascaris suum</i>	Outra função	1	GTLKGHSGWVTQIATNAR	324	35381.77	8.40
>ASP02798_1	ERG80944.1	Hypothetical protein ASU_10993	<i>Ascaris suum</i>	Outra função	1	AESSGLVPGFWLR	143	17046.70	8.52
>ACP41234_1	EYC36628.1	Hypothetical protein Y032_0873g2807	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	Outra função	1	AARMLIR	528	58830.93	8.38
>ACP01389_1	EYC16545.1	Hypothetical protein Y032_0033g2713	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	Outra função	1	GIAELAIYPAVDPLDSTSR	540	57927.22	5,57
>PAP00090_1	Q17172.2	Tiorredoxina peroxidase 2	<i>Brugia malayi</i>	Outra função (antioxidante)	3	GLFIIDPK LVQAFQFVEK QITINDLPVGR	199	22028.33	6.58

Nº de acesso NEMBASE4	Nº de acesso NCBInr	Nome das proteínas	Organismo ao qual foi descrita	Função	NPI	Sequência de peptídeos	Número de resíduos (aa)	Massa molecular (Da)	Ponto isoelétrico
>ACP05965_1 >ACP31268_1	XP_001892004.1	Histona H2B 2	<i>Brugia malayi</i>	Outra função (regulação da expressão gênica)	3	GSVTESLEAAQLSR VELDK** QQFML**	497	53676.50	6.00
>CJP08423_1	EGT39123.1	<i>Hypothetical protein CAEBREN_01080</i>	<i>Caenorhabditis brenneri</i>	Outra função	1	NFNEAFGMTR	145	16338.37	9.52
>CGP00044_1	CDJ94035.1	Proteína contendo subunidade reguladora de proteassoma 26S e região PCI componente de proteassoma	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	Outra função (regulação da catálise proteica)	1	IAVETNDQAR	506	57909.12	6.94
>ACP06675_1	AHJ11155.1	14-3-3 zeta	<i>Dirofilaria immitis</i>	Outra função (ligante de proteínas sinalizadoras)	1	SQSQYQEAFDIAKDK	251	28515.18	4.79
>SSP00672_1	CDJ96210.1	Proteína contendo domínio Snf7	<i>Haemonchus contortus</i>	Outra função	1	EKNLFQVK	223	25274.89	5.84
>ACP04260_1	CDJ90614.1	Proteína contendo domínio Hsp-70	<i>Haemonchus contortus</i>	Outra função (auxilia para o correto dobramento proteico)	2	IINEPTAAAIAYGLDKK TESLEAA**	658	72524.59	5.18
>ACP00468_1	CDJ84377.1	Proteína contendo domínio inibitório de dissociação GDP	<i>Haemonchus contortus</i>	Outra função	1	SPYLYPLYGLGELPQGFAR	444	49911.92	5.42
>BUP00936_1	EGT58068.1	<i>Hypothetical protein CAEBREN_21378</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	Outra função	1	AGAEFLKR	408	45316.13	6.93
>OVP01910_1	XP_003135904.1	Proteína família calsequestrina	<i>Loa loa</i>	Outra função (armazenamento de cálcio)	1	LTLQNYFNVWK	419	48560.77	4.42
>GPP00015_1 >ASP11611_1 >MIP03015_1	EJD75295.1	Chaperonina Hsp-60	<i>Loa loa</i>	Outra função (auxilia na correta conformação proteica)	3	AAVEEGIVPGGGVALLR GYISPYFINSK AAMLQGVLDVADAVAVTMGPK	572	61231.07	5.55
>TSP00452_1	XP_003376578.1	Subunidade eta do complexo T da proteína 1	<i>Trichinella spiralis</i>	Outra função (auxilia para o correto dobramento proteico)	1	KVALEIK	1491	169278.68	5.92

Legenda: NPI – Número de peptídeos identificados.

(\*\*) – Peptídeos identificados através do sequenciamento *de novo* assistido por Pepnovo e ferramenta MS-BLAST.

Tabela 2 - Genes e identificação nos bancos de dados NCBIInr e NEMBASE4 das proteínas identificadas como envolvidas em cada processo biológico do grupo “*Translation*” e determinação da função de cada processo.

Gene	ID NCBIInr	ID NEMBASE4	Processo biológico	Função
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
ndk-1	XP_003139722.1	>AIP00062_1		
prdx-2	Q17172.2	>PAP00090_1		
rla-0	EYC13195.1	>ACP02024_1		
rla-1	ERG81656.1	>AIP00152_1		
rpl-10	ERG83043.1	>ASP00586_1		
rpl-11.2	EYB99416.1	>ACP00463_1		
rpl-12	ERG81585.1	>ASP00965_1		
rpl-13	ERG83884.1	>ASP27299_1		
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-16	ERG86236.1	>ALP01065_1		
rpl-17	ERG80784.1	>ASP00431_3		
rpl-18	ERG80123.1	>ASP17373_1		
rpl-19	EFO17796.2	>ASP00276_1	Processo de biossíntese celular	Reações químicas e vias que resultam na formação de substâncias, realizados por células individuais
rpl-2	ERG85579.1	>ASP00556_1		
rpl-23	ERG81802.1	>ASP00458_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1		
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rpl-35	ERG85329.1	>ALP00617_1		
rpl-36	ERG79484.1	>PTP04423_1		
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-6	ERG79127.1	>ASP00211_1		
rpl-7	XP_001896338.1	>ASP00122_1		
rps-13	ERG87338.1	>ASP00628_2		
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-16	ERG80845.1	>AIP00055_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-18	ERG79404.1	>ALP00089_1		
rps-19	CAA82999.1	>ALP00327_1		
rps-2	EFO25684.2	>ASP00138_1		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1		
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-4	ERG83155.1	>AIP00253_1		
rps-5	EGT36335.1	>PPP00044_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		
cct-7	XP_003376578.1	>TSP00452_1		
cyn-3	ERG84468.1	>AIP00120_1		
hsp-60	EJD75295.1	>GPP00015_1		
prdx-2	Q17172.2	>PAP00090_1		
rla-0	EYC13195.1	>ACP02024_1		
rla-1	ERG81656.1	>AIP00152_1		
rpl-10	ERG83043.1	>ASP00586_1		
rpl-11.2	EYB99416.1	>ACP00463_1		
rpl-12	ERG81585.1	>ASP00965_1		
rpl-13	ERG83884.1	>ASP27299_1	Processo metabólico de macromoléculas celulares	Reações químicas e vias que envolvem macromoléculas.
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-16	ERG86236.1	>ALP01065_1		
rpl-17	ERG80784.1	>ASP00431_3		
rpl-18	ERG80123.1	>ASP17373_1		
rpl-19	EFO17796.2	>ASP00276_1		
rpl-2	ERG85579.1	>ASP00556_1		
rpl-23	ERG81802.1	>ASP00458_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1		
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rpl-35	ERG85329.1	>ALP00617_1		

rpl-36	ERG79484.1	>PTP04423_1		
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-6	ERG79127.1	>ASP00211_1		
rpl-7	XP_001896338.1	>ASP00122_1		
rps-13	ERG87338.1	>ASP00628_2		
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-16	ERG80845.1	>AIP00055_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-18	ERG79404.1	>ALP00089_1	Processo metabólico de macromoléculas celulares	Reações químicas e vias que envolvem macromoléculas.
rps-19	CAA82999.1	>ALP00327_1		
rps-2	EFO25684.2	>ASP00138_1		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1		
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-4	ERG83155.1	>AIP00253_1		
rps-5	EGT36335.1	>PPP00044_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		
cct-7	XP_003376578.1	>TSP00452_1		
cyn-3	ERG84468.1	>AIP00120_1		
hsp-60	EJD75295.1	>GPP00015_1		
rla-0	EYC13195.1	>ACP02024_1	Processo metabólico da proteína	Reação e vias químicas envolvendo uma proteína específica
rla-1	ERG81656.1	>AIP00152_1		
rpl-10	ERG83043.1	>ASP00586_1		
rpl-11.2	EYB99416.1	>ACP00463_1		
rpl-12	ERG81585.1	>ASP00965_1		
rpl-13	ERG83884.1	>ASP27299_1		
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-16	ERG86236.1	>ALP01065_1		
rpl-17	ERG80784.1	>ASP00431_3		
rpl-18	ERG80123.1	>ASP17373_1		
rpl-19	EFO17796.2	>ASP00276_1		
rpl-2	ERG85579.1	>ASP00556_1		
rpl-23	ERG81802.1	>ASP00458_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1		
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rpl-35	ERG85329.1	>ALP00617_1		
rpl-36	ERG79484.1	>PTP04423_1		
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-6	ERG79127.1	>ASP00211_1		
rpl-7	XP_001896338.1	>ASP00122_1		
rpn-3	CDJ94035.1	>CGP00044_1		
rps-13	ERG87338.1	>ASP00628_2		
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-16	ERG80845.1	>AIP00055_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-18	ERG79404.1	>ALP00089_1		
rps-19	CAA82999.1	>ALP00327_1		
rps-2	EFO25684.2	>ASP00138_1		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1		
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-4	ERG83155.1	>AIP00253_1		
rps-5	EGT36335.1	>PPP00044_1		

rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1	Processo metabólico da proteína	Reação e vias químicas envolvendo uma proteína específica		
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1				
rps-9	ERG83269.1	>AIP00299_1				
M28.5	XP_001894478.1	>NBP00407_1				
cct-7	XP_003376578.1	>TSP00452_1				
cyn-3	ERG84468.1	>AIP00120_1				
hsp-60	EJD75295.1	>GPP00015_1				
rla-0	XP_003139722.1	>ACP02024_1				
rla-1	EYC13195.1	>AIP00152_1				
rpl-10	ERG81656.1	>ASP00586_1				
rpl-11.2	ERG83043.1	>ACP00463_1				
rpl-12	EYB99416.1	>ASP00965_1				
rpl-13	ERG81585.1	>ASP27299_1				
rpl-14	ERG83884.1	>HCP00673_1				
rpl-16	CDJ82518.1	>ALP01065_1				
rpl-17	ERG86236.1	>ASP00431_3				
rpl-18	ERG80784.1	>ASP17373_1			Processo metabólico da proteína celular	Reação e vias químicas envolvendo uma proteína específica
rpl-19	ERG80123.1	>ASP00276_1				
rpl-2	EFO17796.2	>ASP00556_1				
rpl-23	ERG85579.1	>ASP00458_1				
rpl-25.1	ERG81802.1	>ASP13657_1				
rpl-30	ERG83440.1	>ALP00577_1				
rpl-31	XP_003141401.1	>ASP01341_1				
rpl-35	ERG85443.1	>ALP00617_1				
rpl-36	ERG85329.1	>PTP04423_1				
rpl-38	ERG79484.1	>ALP00004_1				
rpl-5	ERG85836.1	>ASP00195_1				
rpl-6	ERG79917.1	>ASP00211_1				
rpl-7	ERG79127.1	>ASP00122_1				
rps-13	XP_001896338.1	>ASP00628_2				
rps-15	ERG87338.1	>ASP01375_1				
rps-16	ERG82483.1	>AIP00055_1				
rps-17	ERG80845.1	>ASP01234_1				
rps-18	ERG78782.1	>ALP00089_1				
rps-19	ERG79404.1	>ALP00327_1	Processo de biossíntese de macromoléculas	Reações e vias químicas que resultam na formação de uma macromolécula		
rps-2	CAA82999.1	>ASP00138_1				
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1				
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1				
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1				
rps-4	ERG83155.1	>AIP00253_1				
rps-5	EGT36335.1	>PPP00044_1				
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1				
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1				
rps-9	ERG83269.1	>AIP00299_1				
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1				
prdx-2	Q17172.2	>PAP00090_1				
rla-0	XP_003139722.1	>ACP02024_1				
rla-1	EYC13195.1	>AIP00152_1				
rpl-10	ERG81656.1	>ASP00586_1				
rpl-11.2	ERG83043.1	>ACP00463_1				
rpl-12	EYB99416.1	>ASP00965_1				
rpl-13	ERG81585.1	>ASP27299_1				
rpl-14	ERG83884.1	>HCP00673_1				
rpl-16	CDJ82518.1	>ALP01065_1				
rpl-17	ERG86236.1	>ASP00431_3				
rpl-18	ERG80784.1	>ASP17373_1				
rpl-19	ERG80123.1	>ASP00276_1				
rpl-2	EFO17796.2	>ASP00556_1				
rpl-23	ERG85579.1	>ASP00458_1				
rpl-25.1	ERG81802.1	>ASP13657_1				
rpl-30	ERG83440.1	>ALP00577_1				
rpl-31	XP_003141401.1	>ASP01341_1				
rpl-35	ERG85443.1	>ALP00617_1				
rpl-36	ERG85329.1	>PTP04423_1				
rpl-38	ERG79484.1	>ALP00004_1				
rpl-5	ERG85836.1	>ASP00195_1				
rpl-6	ERG79917.1	>ASP00211_1				
rpl-7	ERG79127.1	>ASP00122_1				

rps-13	XP_001896338.1	>ASP00628_2		
rps-15	ERG87338.1	>ASP01375_1		
rps-16	ERG82483.1	>AIP00055_1		
rps-17	ERG80845.1	>ASP01234_1		
rps-18	ERG78782.1	>ALP00089_1		
rps-19	ERG79404.1	>ALP00327_1		
rps-2	CAA82999.1	>ASP00138_1		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1	Processo de biossíntese de macromoléculas	Reações e vias químicas que resultam na formação de uma macromolécula
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-4	ERG83155.1	>AIP00253_1		
rps-5	EGT36335.1	>PPP00044_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1		
rps-9	ERG83269.1	>AIP00299_1		
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		
prdx-2	Q17172.2	>PAP00090_1		
rla-0	XP_003139722.1	>ACP02024_1		
rla-1	EYC13195.1	>AIP00152_1		
rpl-10	ERG81656.1	>ASP00586_1		
rpl-11.2	ERG83043.1	>ACP00463_1		
rpl-12	EYB99416.1	>ASP00965_1		
rpl-13	ERG81585.1	>ASP27299_1		
rpl-14	ERG83884.1	>HCP00673_1	Processo de biossíntese de macromoléculas celulares	Reações e vias químicas resultando na formação de uma macromolécula
rpl-16	CDJ82518.1	>ALP01065_1		
rpl-17	ERG86236.1	>ASP00431_3		
rpl-18	ERG80784.1	>ASP17373_1		
rpl-19	ERG80123.1	>ASP00276_1		
rpl-2	EFO17796.2	>ASP00556_1		
rpl-23	ERG85579.1	>ASP00458_1		
rpl-25.1	ERG81802.1	>ASP13657_1		
rpl-30	ERG83440.1	>ALP00577_1		
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rpl-35	ERG85443.1	>ALP00617_1		
rpl-36	ERG85329.1	>PTP04423_1		
rpl-38	ERG79484.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG85836.1	>ASP00195_1		
rpl-6	ERG79917.1	>ASP00211_1		
rpl-7	ERG79127.1	>ASP00122_1		
rps-13	XP_001896338.1	>ASP00628_2		
rps-15	ERG87338.1	>ASP01375_1		
rps-16	ERG82483.1	>AIP00055_1		
rps-17	ERG80845.1	>ASP01234_1		
rps-18	ERG78782.1	>ALP00089_1		
rps-19	ERG79404.1	>ALP00327_1		
rps-2	CAA82999.1	>ASP00138_1		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1		
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-4	ERG83155.1	>AIP00253_1		
rps-5	EGT36335.1	>PPP00044_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1		
rps-9	ERG83269.1	>AIP00299_1		
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		
prdx-2	Q17172.2	>PAP00090_1		
rla-0	XP_003139722.1	>ACP02024_1		
rla-1	EYC13195.1	>AIP00152_1		
rpl-10	ERG81656.1	>ASP00586_1		
rpl-11.2	ERG83043.1	>ACP00463_1		
rpl-12	EYB99416.1	>ASP00965_1		
rpl-13	ERG81585.1	>ASP27299_1		
rpl-14	ERG83884.1	>HCP00673_1		
rpl-16	CDJ82518.1	>ALP01065_1		
rpl-17	ERG86236.1	>ASP00431_3		
rpl-18	ERG80784.1	>ASP17373_1		
rpl-19	ERG80123.1	>ASP00276_1		
			Expressão gênica	Processo no qual a sequência de um gene é convertida num produto de gene maduro ou produtos (proteínas ou RNA).

rpl-2	EFO17796.2	>ASP00556_1
rpl-23	ERG85579.1	>ASP00458_1
rpl-25.1	ERG81802.1	>ASP13657_1
rpl-30	ERG83440.1	>ALP00577_1
rpl-31	XP_003141401.1	>ASP01341_1
rpl-35	ERG85443.1	>ALP00617_1
rpl-36	ERG85329.1	>PTP04423_1
rpl-38	ERG79484.1	>ALP00004_1
rpl-5	ERG85836.1	>ASP00195_1
rpl-6	ERG79917.1	>ASP00211_1
rpl-7	ERG79127.1	>ASP00122_1
rps-13	XP_001896338.1	>ASP00628_2
rps-15	ERG87338.1	>ASP01375_1
rps-16	ERG82483.1	>AIP00055_1
rps-17	ERG80845.1	>ASP01234_1
rps-18	ERG78782.1	>ALP00089_1
rps-19	ERG79404.1	>ALP00327_1
rps-2	CAA82999.1	>ASP00138_1
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1
rps-4	ERG83155.1	>AIP00253_1
rps-5	EGT36335.1	>PPP00044_1
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1
rps-9	ERG83269.1	>AIP00299_1
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1
rla-0	XP_003139722.1	>ACP02024_1
rla-1	EYC13195.1	>AIP00152_1
rpl-10	ERG81656.1	>ASP00586_1
rpl-11.2	ERG83043.1	>ACP00463_1
rpl-12	EYB99416.1	>ASP00965_1
rpl-13	ERG81585.1	>ASP27299_1
rpl-14	ERG83884.1	>HCP00673_1
rpl-16	CDJ82518.1	>ALP01065_1
rpl-17	ERG86236.1	>ASP00431_3
rpl-18	ERG80784.1	>ASP17373_1
rpl-19	ERG80123.1	>ASP00276_1
rpl-2	EFO17796.2	>ASP00556_1
rpl-23	ERG85579.1	>ASP00458_1
rpl-25.1	ERG81802.1	>ASP13657_1
rpl-30	ERG83440.1	>ALP00577_1
rpl-31	XP_003141401.1	>ASP01341_1
rpl-35	ERG85443.1	>ALP00617_1
rpl-36	ERG85329.1	>PTP04423_1
rpl-38	ERG79484.1	>ALP00004_1
rpl-5	ERG85836.1	>ASP00195_1
rpl-6	ERG79917.1	>ASP00211_1
rpl-7	ERG79127.1	>ASP00122_1
rps-13	XP_001896338.1	>ASP00628_2
rps-15	ERG87338.1	>ASP01375_1
rps-16	ERG82483.1	>AIP00055_1
rps-17	ERG80845.1	>ASP01234_1
rps-18	ERG78782.1	>ALP00089_1
rps-19	ERG79404.1	>ALP00327_1
rps-2	CAA82999.1	>ASP00138_1
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1
rps-4	ERG83155.1	>AIP00253_1
rps-5	EGT36335.1	>PPP00044_1
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1
rps-9	ERG83269.1	>AIP00299_1

Expressão gênica

Processo no qual a sequência de um gene é convertida num produto de gene maduro ou produtos (proteínas ou RNA).

Tradução

O processo metabólico celular em que uma proteína é formada utilizando a sequência de uma molécula de mRNA madura para especificar a sequência de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica

Tabela 3 - Genes e identificação nos bancos de dados NCBIInr e NEMBASE4 das proteínas identificadas como envolvidas em cada processo biológico do grupo “*Determination of adult lifespan*” e determinação da função de cada processo.

Gene	ID NCBIInr	ID NEMBASE 4	Processo Biológico	Função
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
gpd-3	ERG79426.1	>ACP07262_1		
ifb-1	P23731.1	>ASP00020_1		
prdx-2	Q17172.2	>PAP00090_1		
rpl-19	EFO17796.2	>ASP00276_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1	Determinação da vida útil	O controle da viabilidade e duração da fase adulta do ciclo de vida
rpl-6	ERG79127.1	>ASP00211_1		
rps-10	XP_001894896.1	>OVP00582_1		
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		
tpi-1	XP_001897269.1	>ACP22460_1		
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
gpd-3	ERG79426.1	>ACP07262_1		
ifb-1	P23731.1	>ASP00020_1		
prdx-2	Q17172.2	>PAP00090_1		
rpl-19	EFO17796.2	>ASP00276_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1	Envelhecimento do organismo multicelular	Processo de envelhecimento de um organismo multicelular inteiro
rpl-6	ERG79127.1	>ASP00211_1		
rps-10	XP_001894896.1	>OVP00582_1		
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		
tpi-1	XP_001897269.1	>ACP22460_1		

Tabela 4 - Genes e identificação nos bancos de dados NCBIInr e NEMBASE4 das proteínas identificadas como envolvidas em cada processo biológico do grupo “*Regulation of growth*” e determinação da função de cada processo.

Gene	ID NCBIInr	ID NEMBASE 4	Processo Biológico	Função
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		
ftt-2	AHJ11155.1	>ACP06675_1		
gdh-1	ERG79150.1	>ALP00060_1		Qualquer processo que modula a taxa de crescimento da totalidade ou de parte de um organismo
got-1.2	EGT58068.1	>BUP00936_1		
hsp-60	EJD75295.1	>GPP00015_1		
mua-6	ERG80822.1	>ASP00083_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		
rpl-10	ERG83043.1	>ASP00586_1		
rpl-11.2	EYB99416.1	>ACP00463_1	Regulação da taxa de crescimento	
rpl-12	ERG81585.1	>ASP00965_1		
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-17	ERG80784.1	>ASP00431_3		
rpl-2	ERG85579.1	>ASP00556_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-7	XP_001896338.1	>ASP00122_1		
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-25	XP_001901957.1	>AIP00156_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		
ftt-2	AHJ11155.1	>ACP06675_1		
gdh-1	ERG79150.1	>ALP00060_1		
got-1.2	EGT58068.1	>BUP00936_1		
hsp-60	EJD75295.1	>GPP00015_1		
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
mua-6	ERG80822.1	>ASP00083_1		
prdx-2	Q17172.2	>PAP00090_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		
rpl-10	ERG83043.1	>ASP00586_1		
rpl-11.2	EYB99416.1	>ACP00463_1	Regulação do crescimento	Modula a frequência, a velocidade ou a extensão do crescimento da totalidade ou de parte de um organismo de modo que ocorre na sua velocidade adequada, tanto de forma global ou numa parte específica do desenvolvimento do organismo.
rpl-12	ERG81585.1	>ASP00965_1		
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-17	ERG80784.1	>ASP00431_3		
rpl-2	ERG85579.1	>ASP00556_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1		
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-7	XP_001896338.1	>ASP00122_1		
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-25	XP_001901957.1	>AIP00156_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		

T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		
ftt-2	AHJ11155.1	>ACP06675_1		
gdh-1	ERG79150.1	>ALP00060_1		
got-1.2	EGT58068.1	>BUP00936_1		
hsp-60	EJD75295.1	>GPP00015_1		
mua-6	ERG80822.	>ASP00083_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		
rpl-10	ERG83043.1	>ASP00586_1		
rpl-11.2	EYB99416.1	>ACP00463_1		
rpl-12	ERG81585.1	>ASP00965_1	Regulação positiva da taxa de crescimento	Processo que aumenta a taxa de crescimento da totalidade ou de parte de um organismo
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-17	ERG80784.1	>ASP00431_3		
rpl-2	ERG85579.1	>ASP00556_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-7	XP_001896338.1	>ASP00122_1		
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-25	XP_001901957.1	>AIP00156_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		
ftt-2	AHJ11155.1	>ACP06675_1		
gdh-1	ERG79150.1	>ALP00060_1		
got-1.2	EGT58068.1	>BUP00936_1		
hsp-60	EJD75295.1	>GPP00015_1		
mua-6	ERG80822.	>ASP00083_1		
prdx-2	Q17172.2	>PAP00090_1		
rpl-10	ERG83043.1	>ASP00586_1		
rpl-11.2	EYB99416.1	>ACP00463_1		
rpl-12	ERG81585.1	>ASP00965_1	Regulação positiva do crescimento	Modula a frequência, a velocidade ou a extensão do crescimento da totalidade ou de parte de um organismo de modo que ocorre na sua velocidade adequada, tanto de forma global ou numa parte específica do desenvolvimento do organismo.
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-17	ERG80784.1	>ASP00431_3		
rpl-2	ERG85579.1	>ASP00556_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1		
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-7	XP_001896338.1	>ASP00122_1		
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-25	XP_001901957.1	>AIP00156_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		

T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1
ftt-2	AHJ11155.1	>ACP06675_1
gdh-1	ERG79150.1	>ALP00060_1
got-1.2	EGT58068.1	>BUP00936_1
mua-6	ERG80822.1	>ASP00083_1
prdx-2	Q17172.2	>PAP00090_1
hsp-60	EJD75295.1	>GPP00015_1
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1
myo-3	XP_001899601.1	>BMP00967_1
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1
rpl-10	ERG83043.1	>ASP00586_1
rpl-11.2	EYB99416.1	>ACP00463_1
rpl-12	ERG81585.1	>ASP00965_1
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1
rpl-17	ERG80784.1	>ASP00431_3
rpl-2	ERG85579.1	>ASP00556_1
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1
rpl-7	XP_001896338.1	>ASP00122_1
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1
rps-25	XP_001901957.1	>AIP00156_1
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1

Regulação positiva de  
processos biológicos

Processo que ativa ou aumenta a frequência, taxa ou a extensão de um processo biológico.

Tabela 5 - Genes e identificação nos bancos de dados NCBIInr e NEMBASE4 das proteínas identificadas como envolvidas em cada processo biológico do grupo “*Carbohydrate metabolic process*” e determinação da função de cada processo.

Gene	ID NCBIInr	ID NEMBASE 4	Processo Biológico	Função
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		Reações e vias químicas envolvendo carboidratos
gpd-3	ERG79426.1	>ACP07262_1	Processo metabólico de	
mdh-1	ETN79000.1	>BXP01625_1	carboidratos	
pck-1	NP_497134.1	>CJP00862_1		

Tabela 6 - Genes e identificação nos bancos de dados NCBIInr e NEMBASE4 das proteínas identificadas como envolvidas em cada processo biológico do grupo “*Nematode larval development*” e determinação da função de cada processo.

Gene	ID NCBIInr	ID NEMBASE 4	Processo Biológico	Função
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
act-2	XP_002643901.1	>ASP02463_1		
act-5	NP_499809.1	>TMP00013_1		
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
cct-7	XP_003376578.1	>TSP00452_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		
ftt-2	AHJ11155.1	>ACP06675_1		
gdi-1	CDJ84377.1	>ACP00468_1		
gpd-3	ERG79426.1	>ACP07262_1		
hsp-60	EJD75295.1	>GPP00015_1		
ifb-1	P23731.1	>ASP00020_1		
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
myo-3	XP_001899601.1	>BMP00967_1	Desenvolvimento embrionário	Processo cujo resultado específico é a progressão de um embrião a partir da sua formação até o final do estágio embrionário
ndk-1	XP_003139722.1	>AIP00062_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		
rla-0	EYC13195.1	>ACP02024_1		
rla-1	ERG81656.1	>AIP00152_1		
rpl-10	ERG83043.1	>ASP00586_1		
rpl-12	ERG81585.1	>ASP00965_1		
rpl-13	ERG83884.1	>ASP27299_1		
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-16	ERG86236.1	>ALP01065_1		
rpl-17	ERG80784.1	>ASP00431_3		
rpl-18	ERG80123.1	>ASP17373_1		
rpl-19	EFO17796.2	>ASP00276_1		
rpl-2	ERG85579.1	>ASP00556_1		
rpl-23	ERG81802.1	>ASP00458_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1		
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rpl-35	ERG85329.1	>ALP00617_1		
rpl-36	ERG79484.1	>PTP04423_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-6	ERG79127.1	>ASP00211_1		
rpl-7	XP_001896338.1	>ASP00122_1		
rpl-7A	XP_003139379.1	>ASP00314_2		
rpn-3	CDJ94035.1	>CGP00044_1		
rps-10	XP_001894896.1	>OVP00582_1		
rps-13	ERG87338.1	>ASP00628_2		
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-16	ERG80845.1	>AIP00055_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-19	CAA82999.1	>ALP00327_1		
rps-2	EFO25684.2	>ASP00138_1		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1		
rps-25	XP_001901957.1	>AIP00156_1		
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-4	ERG83155.1	>AIP00253_1		
rps-5	EGT36335.1	>PPP00044_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		
vps-2	CDJ96210.1	>SSP00672_1		
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
act-2	XP_002643901.1	>ASP02463_1		
act-5	NP_499809.1	>TMP00013_1	Desenvolvimento larval	Processo cujo resultado específico é a progressão da larva ao longo do tempo, da sua formação até estrutura madura.
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
cct-7	XP_003376578.1	>TSP00452_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		
ftt-2	AHJ11155.1	>ACP06675_1		

hsp-3	CDJ90614.1	>ACP04260_1		
hsp-60	EJD75295.1	>GPP00015_1		
ifb-1	P23731.1	>ASP00020_1		
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
myo-3	XP_001899601.1	>BMP00967_1		
ndk-1	XP_003139722.1	>AIP00062_1		
mua-6	ERG80822.1	>ASP00083_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		
rla-0	EYC13195.1	>ACP02024_1		
rpl-10	ERG83043.1	>ASP00586_1		
rpl-11.2	EYB99416.1	>ACP00463_1		
rpl-12	ERG81585.1	>ASP00965_1		
rpl-13	ERG83884.1	>ASP27299_1		
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-16	ERG86236.1	>ALP01065_1	Desenvolvimento larval	Processo cujo resultado específico é a progressão da larva ao longo do tempo, da sua formação até estrutura madura.
rpl-17	ERG80784.1	>ASP00431_3		
rpl-18	ERG80123.1	>ASP17373_1		
rpl-19	EFO17796.2	>ASP00276_1		
rpl-2	ERG85579.1	>ASP00556_1		
rpl-23	ERG81802.1	>ASP00458_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1		
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rpl-35	ERG85329.1	>ALP00617_1		
rpl-36	ERG79484.1	>PTP04423_1		
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-6	ERG79127.1	>ASP00211_1		
rpl-7	XP_001896338.1	>ASP00122_1		
rpn-3	CDJ94035.1	>CGP00044_1		
rps-10	XP_001894896.1	>OVP00582_1		
rps-13	ERG87338.1	>ASP00628_2		
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-16	ERG80845.1	>AIP00055_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-19	CAA82999.1	>ALP00327_1		
rps-2	EFO25684.2	>ASP00138_1		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1		
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-5	EGT36335.1	>PPP00044_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
act-2	XP_002643901.1	>ASP02463_1		
act-5	NP_499809.1	>TMP00013_1		
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1	Desenvolvimento larval do nematoda	Processo específico cujo resultado é a progressão da larva nematóide ao longo do tempo, a partir da sua formação para a estrutura madura.
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
cct-7	XP_003376578.1	>TSP00452_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		
ftt-2	AHJ11155.1	>ACP06675_1		
hsp-3	CDJ90614.1	>ACP04260_1		
hsp-60	EJD75295.1	>GPP00015_1		
ifb-1	P23731.1	>ASP00020_1		
mua-6	ERG80822.1	>ASP00083_1		

lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
myo-3	XP_001899601.1	>BMP00967_1		
ndk-1	XP_003139722.1	>AIP00062_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		
rla-0	EYC13195.1	>ACP02024_1		
rpl-10	ERG83043.1	>ASP00586_1		
rpl-11.2	EYB99416.1	>ACP00463_1		
rpl-12	ERG81585.1	>ASP00965_1		
rpl-13	ERG83884.1	>ASP27299_1		
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-16	ERG86236.1	>ALP01065_1		
rpl-17	ERG80784.1	>ASP00431_3		
rpl-18	ERG80123.1	>ASP17373_1		
rpl-19	EFO17796.2	>ASP00276_1		
rpl-2	ERG85579.1	>ASP00556_1		
rpl-23	ERG81802.1	>ASP00458_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1	Desenvolvimento larval do nematoda	Processo específico cujo resultado é a progressão da larva nematóide ao longo do tempo, a partir da sua formação para a estrutura madura.
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rpl-35	ERG85329.1	>ALP00617_1		
rpl-36	ERG79484.1	>PTP04423_1		
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-6	ERG79127.1	>ASP00211_1		
rpl-7	XP_001896338.1	>ASP00122_1		
rpn-3	CDJ94035.1	>CGP00044_1		
rps-10	XP_001894896.1	>OVP00582_1		
rps-13	ERG87338.1	>ASP00628_2		
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-16	ERG80845.1	>AIP00055_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-19	CAA82999.1	>ALP00327_1		
rps-2	EFO25684.2	>ASP00138_1		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1		
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-5	EGT36335.1	>PPP00044_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
act-2	XP_002643901.1	>ASP02463_1		
act-5	NP_499809.1	>TMP00013_1		
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
cct-7	XP_003376578.1	>TSP00452_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		
ftt-2	AHJ111155.1	>ACP06675_1		
hsp-3	CDJ90614.1	>ACP04260_1		
hsp-60	EJD75295.1	>GPP00015_1		
ifb-1	P23731.1	>ASP00020_1		
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1	Desenvolvimento pós-embriônico	Processo cujo resultado específico é a progressão do organismo ao longo do tempo, a partir da conclusão do desenvolvimento embrionário para a estrutura madura.
myo-3	XP_001899601.1	>BMP00967_1		
ndk-1	XP_003139722.1	>AIP00062_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		
rla-0	EYC13195.1	>ACP02024_1		
rpl-10	ERG83043.1	>ASP00586_1		
rpl-11.2	EYB99416.1	>ACP00463_1		
rpl-12	ERG81585.1	>ASP00965_1		
rpl-13	ERG83884.1	>ASP27299_1		
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-16	ERG86236.1	>ALP01065_1		
rpl-17	ERG80784.1	>ASP00431_3		
rpl-18	ERG80123.1	>ASP17373_1		
rpl-19	EFO17796.2	>ASP00276_1		
rpl-2	ERG85579.1	>ASP00556_1		

rpl-23	ERG81802.1	>ASP00458_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1		
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rpl-35	ERG85329.1	>ALP00617_1		
rpl-36	ERG79484.1	>PTP04423_1		
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-6	ERG79127.1	>ASP00211_1		
rpl-7	XP_001896338.1	>ASP00122_1		
rpn-3	CDJ94035.1	>CGP00044_1		
rps-10	XP_001894896.1	>OVP00582_1	Desenvolvimento pós-embriônico	
rps-13	ERG87338.1	>ASP00628_2		
rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-16	ERG80845.1	>AIP00055_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		Processo cujo resultado específico é a progressão do organismo ao longo do tempo, a partir da conclusão do desenvolvimento embrionário para a estrutura madura.
rps-19	CAA82999.1	>ALP00327_1		
rps-2	EFO25684.2	>ASP00138_1		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1		
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-5	EGT36335.1	>PPP00044_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
	ERG80783.1	>ASP29877_1		
65B4BR.5			Desenvolvimento embrionário que termina ao nascimento/eclosão dos ovos	Processo cujo resultado específico é a progressão de um embrião ao longo do tempo, da formação do zigoto até ao final da vida embrionária
act-2	XP_002643901.1	>ASP02463_1		
act-5	NP_499809.1	>TMP00013_1		
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
cct-7	XP_003376578.1	>TSP00452_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		
ftt-2	AHJ11155.1	>ACP06675_1		
gdi-1	CDJ84377.1	>ACP00468_1		
gpd-3	ERG79426.1	>ACP07262_1		
hsp-60	EJD75295.1	>GPP00015_1		
ifb-1	P23731.1	>ASP00020_1		
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
myo-3	XP_001899601.1	>BMP00967_1		
ndk-1	XP_003139722.1	>AIP00062_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		
rla-0	EYC13195.1	>ACP02024_1		
rla-1	ERG81656.1	>AIP00152_1		
rpl-10	ERG83043.1	>ASP00586_1		
rpl-12	ERG81585.1	>ASP00965_1		
rpl-13	ERG83884.1	>ASP27299_1		
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-16	ERG86236.1	>ALP01065_1		
rpl-17	ERG80784.1	>ASP00431_3		
rpl-18	ERG80123.1	>ASP17373_1		
rpl-19	EFO17796.2	>ASP00276_1		
rpl-2	ERG85579.1	>ASP00556_1		
rpl-23	ERG81802.1	>ASP00458_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1		
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rpl-35	ERG85329.1	>ALP00617_1		
rpl-36	ERG79484.1	>PTP04423_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-6	ERG79127.1	>ASP00211_1		
rpl-7	XP_001896338.1	>ASP00122_1		
rpl-7A	XP_003139379.1	>ASP00314_2		
rpn-3	CDJ94035.1	>CGP00044_1		
rps-10	XP_001894896.1	>OVP00582_1		
rps-13	ERG87338.1	>ASP00628_2		

rps-15	ERG82483.1	>ASP01375_1		
rps-16	ERG80845.1	>AIP00055_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-19	CAA82999.1	>ALP00327_1		
rps-2	EFO25684.2	>ASP00138_1		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1	Desenvolvimento embrionário que termina ao nascimento/eclosão dos ovos	Processo cujo resultado específico é a progressão de um embrião ao longo do tempo, da formação do zigoto até ao final da vida embrionária
rps-25	XP_001901957.1	>AIP00156_1		
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-4	ERG83155.1	>AIP00253_1		
rps-5	EGT36335.1	>PPP00044_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		
vps-2	CDJ96210.1	>SSP00672_1		

---

Tabela 7 - Genes e identificação nos bancos de dados NCBIInr e NEMBASE4 das proteínas identificadas como envolvidas em cada processo biológico do grupo “*Actin cytoskeleton organization*” e determinação da função de cada processo.

Gene	ID NCBIInr	ID NEMBASE 4	Processo Biológico	Função
hsp-3 ifta-1 rack-1 unc-27	CDJ90614.1 EYC36628.1 ERG87647.1 XP_001898461.1	>ACP04260_1 >ASP00083_1 >ALP00664_1 >ASP00790_1	Morfogênese do componente celular	Geração e organização de componentes celulares (toda a célula e partes celulares)
act-2 lev-11 rack-1 rpl-19	XP_002643901.1 CDJ92091 ERG87647.1 EFO17796.2	>ASP02463_1 >ASP04697_1 >ALP00664_1 >ASP00276_1	Citocinese	Divisão do citoplasma e membrana plasmática celular; separação celular em duas células filhas
act-2 hsp-60 lev-11 rack-1 rps-17 unc-27 unc-87	XP_002643901.1 EJD75295.1 CDJ92091 ERG87647.1 ERG78782.1 XP_001898461.1 ERG86671	>ASP02463_1 >GPP00015_1 >ASP04697_1 >ALP00664_1 >ASP01234_1 >ASP00790_1 >ALP00126_1	Organização de organelas	Montagem, disposição das partes constituintes, ou desmontagem de uma organela dentro de uma célula
act-2 lev-11 unc-27 unc-87	XP_002643901.1 CDJ92091 XP_001898461.1 ERG86671	>ASP02463_1 >ASP04697_1 >ASP00790_1 >ALP00126_1		Montagem, arranjo das partes constituintes, ou a desmontagem de estruturas do citoesqueleto
act-2 hsp-60 ifta-1 lev-11 rack-1 rps-17 unc-27 unc-87	XP_002643901.1 EJD75295.1 EYC36628.1 CDJ92091 ERG87647.1 ERG78782.1 XP_001898461.1 ERG86671	>ASP02463_1 >GPP00015_1 >ACP41234_1 >ASP04697_1 >ALP00664_1 >ASP01234_1 >ASP00790_1 >ALP00126_1	Organização de componentes celulares a nível celular	Montagem, arranjo de partes constituintes, ou a desmontagem de um componente celular
atp-2 rack-1 rpl-19 rps-13	EYC16545.1 ERG87647.1 EFO17796.2 ERG87338.1	>ACP01389_1 >ALP00664_1 >ASP00276_1 >ASP00628_2	Motilidade celular	Processo envolvido no movimento de auto-propulsão controlada de uma célula que resulta na translocação da mesma.
atp-2 rack-1 rpl-19 rps-13	EYC16545.1 ERG87647.1 EFO17796.2 ERG87338.1	>ACP01389_1 >ALP00664_1 >ASP00276_1 >ASP00628_2	Migração celular	Processo envolvido no movimento de auto-propulsionadas controlada de uma célula.
ifta-1 lev-11 rps-17 unc-27 unc-87	EYC36628.1 CDJ92091 ERG78782.1 XP_001898461.1 ERG86671	>ASP00083_1 >ASP04697_1 >ASP01234_1 >ASP00790_1 >ALP00126_1	Montagem de componente celular a nível celular	Agregação e organização de um componente celular.
atp-2 ftt-2 lev-11 mlc-3 rack-1	EYC16545.1 AHJ11155.1 CDJ92091 ERG85616.1 ERG87647.1	>ACP01389_1 >ACP06675_1 >ASP04697_1 >ASP01133_1 >ALP00664_1	Comportamento reprodutivo	Comportamento específico associado à reprodução de um organismo.
ftt-2 lev-11 mlc-3 rack-1	AHJ11155.1 CDJ92091 ERG85616.1 ERG87647.1	>ACP06675_1 >ASP04697_1 >ASP01133_1 >ALP00664_1	Postura de ovos	Processo envolvido na deposição de ovos (fertilizados ou não)
act-2 lev-11 unc-27 unc-87	XP_002643901.1 CDJ92091 XP_001898461.1 ERG86671	>ASP02463_1 >ASP04697_1 >ASP00790_1 >ALP00126_1	Organização do citoesqueleto de actina	Montagem, arranjo de partes constituintes, ou a desmontagem de estruturas do citoesqueleto compreendendo filamentos de actina e suas proteínas associadas

ifta-1	ERG80822.1	>ASP00083_1	Montagem de componente celular	Arranjo e agregação de um componente celular
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
unc-27	XP_001898461.1	>ASP00790_1		
unc-87	ERG86671	>ALP00126_1		
gdi-1	CDJ84377.1	>ACP00468_1	Localização das proteínas	Qualquer processo em que uma proteína é transportada ou mantida em um local específico.
hsp-3	CDJ90614.1	>ACP04260_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		
vps-2	CDJ96210.1	>SSP00672_1		
act-2	XP_002643901.1	>ASP02463_1	Organização do citoesqueleto	Processo que é realizado a nível celular, resulta na montagem, desmontagem ou disposição das partes constituintes das estruturas do citoesqueleto
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
unc-27	XP_001898461.1	>ASP00790_1		
unc-87	ERG86671	>ALP00126_1		

---

Tabela 8 - Genes e identificação nos bancos de dados NCBIInr e NEMBASE4 das proteínas identificadas como envolvidas em cada processo biológico do grupo “*Ribosome biogenesis*” e determinação da função de cada processo.

Gene	ID NCBIInr	ID NEMBASE 4	Processo Biológico	Função
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		Processo que resulta na biossíntese de macromoléculas, a montagem dos constituintes, e arranjo das partes constituintes de subunidades do ribossomo; inclui o transporte para os locais de síntese de proteína.
rla-0	EYC13195.1	>ACP02024_1	Biogênese do ribossomo	
rpl-7A	XP_003139379.1	>ASP00314_2		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-18	ERG79404.1	>ALP00089_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1		
rla-0	EYC13195.1	>ACP02024_1		
rla-1	ERG81656.1	>AIP00152_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1		
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		Processo que resulta na biossíntese de macromoléculas, a montagem dos constituintes, e arranjo das partes constituintes de um componente celular.
rla-0	EYC13195.1	>ACP02024_1	Biogênese do componente celular a nível celular	
rpl-7A	XP_003139379.1	>ASP00314_2		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-18	ERG79404.1	>ALP00089_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1		
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		
rla-0	EYC13195.1	>ACP02024_1		
rpl-7A	XP_003139379.1	>ASP00314_2		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-18	ERG79404.1	>ALP00089_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		
rps-8	ERG83269.1	>ASP01345_1		

Tabela 9 - Genes e identificação nos bancos de dados NCBIInr e NEMBASE4 das proteínas identificadas como envolvidas em cada processo biológico do grupo “*Organic acid metabolic process*” e determinação da função de cada processo.

Gene	ID NCBIInr	ID NEMBASE 4	Processo Biológico	Função
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1	Processo metabólico da cetona celular	As reações e vias químicas envolvendo qualquer classe de compostos orgânicos que contêm o grupo carbonil
gdh-1	ERG79150.1	>ALP00060_1		
got-1.2	EGT58068.1	>BUP00936_1		
mdh-1	ETN79000.1	>BXP01625_1		
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1	Processo metabólico do oxiácido	As reações químicas e caminhos que envolvem qualquer oxiácido
gdh-1	ERG79150.1	>ALP00060_1		
got-1.2	EGT58068.1	>BUP00936_1		
mdh-1	ETN79000.1	>BXP01625_1		
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1	Processo metabólico do ácido orgânico	As reações e vias químicas que envolvem ácido orgânico
gdh-1	ERG79150.1	>ALP00060_1		
got-1.2	EGT58068.1	>BUP00936_1		
mdh-1	ETN79000.1	>BXP01625_1		
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1	Processo metabólico do ácido carboxílico	As reações e vias químicas que envolvem os ácidos carboxílicos
gdh-1	ERG79150.1	>ALP00060_1		
got-1.2	EGT58068.1	>BUP00936_1		
mdh-1	ETN79000.1	>BXP01625_1		

Tabela 10 - Genes e identificação nos bancos de dados NCBIInr e NEMBASE4 das proteínas identificadas como envolvidas em cada processo biológico do grupo “*Body morphogenesis*” e determinação da função de cada processo.

Gene	ID NCBIInr	ID NEMBASE4	Processo biológico	Função
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
act-5	NP_499809.1	>TMP00013_1		
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
hsp-3	CDJ90614.1	>ACP04260_1		
ifb-1	P23731.1	>ASP00020_1		
ifta-1	EYC36628.1	>ASP00083_1	Morfogênese da estrutura anatômica	Processo em que as estruturas são geradas e organizadas
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
mua-6	ERG80822.1	>ASP00083_1		
myo-3	XP_001899601.1	>BMP00967_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		
unc-27	XP_001898461.1	>ASP00790_1		
M28.5	CDJ82904.1	>NBP00407_1		
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1	Morfogênese do corpo	Processo no qual as estruturas anatômicas são geradas e organizadas
hsp-3	CDJ90614.1	>ACP04260_1		
ifb-1	P23731.1	>ASP00020_1		
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
mua-6	ERG80822.1	>ASP00083_1		
myo-3	XP_001899601.1	>BMP00967_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
rps-26	ERG81670.1	>ALP00899_1		
rps-9	XP_001894478.1	>AIP00299_1		

Tabela 11 - Genes e identificação nos bancos de dados NCBIInr e NEMBASE4 das proteínas identificadas como envolvidas em cada processo biológico do grupo “*Regulation of multicellular organism growth*” e determinação da função de cada processo.

Gene	ID NCBIInr	ID NEMBASE 4	Processo Biológico	Função
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
ahcy-1	XP_001901095.1	>BMP07010_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1	Regulação do crescimento do organismo multicelular	Processo que modula a frequência, a taxa ou o grau de crescimento do corpo de um organismo de modo a que ele atinge o seu tamanho corporal habitual
prdx-2	Q17172.2	>PAP00090_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1	Regulação positiva do crescimento do organismo multicelular	Processo que ativa ou aumenta a frequência, taxa ou extensão de crescimento de um organismo para atingir o seu tamanho corporal habitual
prdx-2	Q17172.2	>PAP00090_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		
T02H6.11	ERG80944.1	>ASP02798_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1	Regulação positiva do processo do organismo multicelular	Processo que ativa ou aumenta a frequência, taxa ou extensão de um processo do organismo
prdx-2	Q17172.2	>PAP00090_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-30	XP_003141401.1	>ALP00577_1		
rps-17	ERG78782.1	>ASP01234_1		

Tabela 12 - Genes e identificação nos bancos de dados NCBIInr e NEMBASE4 das proteínas identificadas como envolvidas em cada processo biológico do grupo “*Molting cycle protein based-cuticle*” e determinação da função de cada processo.

Gene	ID NCBIInr	ID NEMBASE4	Processo biológico	Função
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
ifb-1	P23731.1	>ASP00020_1		
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
mua-6	ERG80822.1	>ASP00083_1		
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-18	ERG80123.1	>ASP17373_1		
rpl-23	ERG81802.1	>ASP00458_1	Ciclo de muda da cutícula	Descolamento periódico de uma parte ou a totalidade de uma cutícula e substituição por uma nova.
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rps-10	XP_001894896.1	>OVPO0582_1		
rps-16	ERG80845.1	>AIP00055_1		
rps-19	CAA82999.1	>ALPO0327_1		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
ifb-1	P23731.1	>ASP00020_1		
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
mua-6	ERG80822.1	>ASP00083_1		
rpl-14	CDJ82518.1	>HCP00673_1		
rpl-18	ERG80123.1	>ASP17373_1		
rpl-23	ERG81802.1	>ASP00458_1	Ciclo de muda do colágeno e da cutícula baseada em <i>cuticulin</i>	O descolamento periódico de parte ou da totalidade de um colágeno e cutícula baseada em <i>cuticulin</i> , que depois é substituído por novos.
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rps-10	XP_001894896.1	>OVPO0582_1		
rps-16	ERG80845.1	>AIP00055_1		
rps-19	CAA82999.1	>ALPO0327_1		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1		
rps-28	XP_001895164.1	>ASP17365_1		
rps-6	ERG81369.1	>ASP01358_1		

Tabela 13 - Genes e identificação nos bancos de dados NCBIInr e NEMBASE4 das proteínas identificadas como envolvidas em cada processo biológico do grupo “*Sex differentiation*” e determinação da função de cada processo.

Gene	ID NCBIInr	ID NEMBASE4	Processo biológico	Função
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
act-2	XP_002643901.1	>ASP02463_1		
act-5	NP_499809.1	>TMP00013_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
cct-7	XP_003376578.1	>TSP00452_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
ndk-1	XP_003139722.1	>AIP00062_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1	Desenvolvimento de órgãos	Desenvolvimento de um tecido ou tecidos que funcionam em conjunto para executar uma função ou funções específicas
rpl-19	EFO17796.2	>ASP00276_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-7A	XP_003139379.1	>ASP00314_2		
rps-13	ERG87338.1	>ASP00628_2		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
act-2	XP_002643901.1	>ASP02463_1		
act-5	NP_499809.1	>TMP00013_1		
cct-7	XP_003376578.1	>TSP00452_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1	Desenvolvimento da genitália	Processo cujo resultado específico é a progressão da genitália ao longo do tempo para a estrutura madura
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
ndk-1	XP_003139722.1	>AIP00062_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-7A	XP_003139379.1	>ASP00314_2		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
act-2	XP_002643901.1	>ASP02463_1		
act-5	NP_499809.1	>TMP00013_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1		
cct-7	XP_003376578.1	>TSP00452_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
ndk-1	XP_003139722.1	>AIP00062_1	Processo de desenvolvimento envolvido na reprodução	Processo de desenvolvimento em que uma progressiva mudança no estado de uma parte de um organismo contribui especificamente para a sua capacidade para formar prole.
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		
rpl-19	EFO17796.2	>ASP00276_1		
rpl-25.1	ERG83440.1	>ASP13657_1		
rpl-31	ERG85443.1	>ASP01341_1		
rpl-38	ERG85836.1	>ALP00004_1		
rpl-5	ERG79917.1	>ASP00195_1		
rpl-7A	XP_003139379.1	>ASP00314_2		
rps-13	ERG87338.1	>ASP00628_2		
rps-23	XP_001901838.1	>BMP00817_1		
Y65B4BR.5	ERG80783.1	>ASP29877_1		
act-2	XP_002643901.1	>ASP02463_1		
act-5	NP_499809.1	>TMP00013_1		
atp-2	EYC16545.1	>ACP01389_1	Diferenciação sexual	O estabelecimento do sexo de um organismo pela diferenciação física.
cct-7	XP_003376578.1	>TSP00452_1		
enol-1	ADH95417.1	>ACP01204_1		
lev-11	CDJ92091	>ASP04697_1		
ndk-1	XP_003139722.1	>AIP00062_1		
rack-1	ERG87647.1	>ALP00664_1		