

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Análise da expressão de uma cromodomínio-helicase  
no parasito cestódeo *Mesocestoides corti***

**Caroline Borges Costa**

Porto Alegre, dezembro de 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Análise da expressão de uma cromodomínio-helicase  
no parasito cestódeo *Mesocestoides corti***

**Caroline Borges Costa**

Trabalho de Conclusão de Curso  
submetido à COMGRAD do Curso de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, como  
requisito parcial para a obtenção do  
título de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Orientador: Dr. Henrique B. Ferreira

Porto Alegre, dezembro de 2011.

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul e contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*“Lembro- me da mão trêmula para pipetar, do medo de fazer uma solução errada ou de estragar um experimento de alguém, do nervosismo ao apresentar o salão, da alegria de ver bandas no meu primeiro gel de agarose... O tempo passou, a tremedeira acabou, o nervosismo ainda persiste, a cobrança é maior, os experimentos não são tão simples, mas a mesma emoção de ver bandas em um simples gel de agarose ainda persiste, e é o que torna tudo fascinante nesta jornada acadêmica...”*

## **Agradecimentos**

Agradeço ao professor Henrique B. Ferreira pela oportunidade de realizar minha iniciação científica no laboratório de biologia molecular de cestódeos, pelo apoio e incentivo dedicados durante a realização deste trabalho.

Ao professor Arnaldo Zaha por todo apoio, incentivo e confiança que auxiliaram para o desenvolvimento deste trabalho.

A professora Estela Castillo e a Dra. Karina Monteiro, por aceitarem fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

A Dra. Karina Monteiro por todos os ensinamentos, incentivos e apoios dedicados para que este trabalho se desenvolvesse da melhor forma possível.

As minhas eternas amigas, Daiani e Edileuza, obrigada por me emprestarem seus ouvidos e ouvir minhas lamentações, minhas frustrações, obrigada por compartilharem muitos momentos de alegrias, como nos momentos “eu te considero”, obrigada por fazerem parte da minha vida e a tornarem ela tão agradável e valiosa.

A todos os colegas dos laboratórios 204, 206, 210, Helier, Martín, Jéssica, Guilherme, Karina L, Aline, Veridiana, Jéssica, Taylor, Gabriela, Bruna, João, Cristine e Poliana, pela amizade e apoio.

Aos colegas que não estão mais no lab, Alice (minha primeira mãe científica), Luciana Nunes, Taís, Marbella, obrigada por todos os ensinamentos e companheirismo.

Aos meus pais José e Eda, e demais familiares, por todo apoio e incentivo que sempre me deram, compreendendo todas as minhas crises, sendo meu refúgio nos momentos mais difíceis e desgastantes.

Ao meu namorado Daniel, pelo apoio e atenção dedicados para me ouvir e me motivar durante todo o desenvolvimento deste trabalho, obrigada por tornar os momentos difíceis em momentos mais leves, mostrando sempre o lado positivo das coisas.

A todos os professores que tive durante a graduação pelos ensinamentos e aprendizagens que foram transmitidos.

# Sumário

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELA.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.2 <i>Proteínas de M. corti como potenciais marcadores moleculares do desenvolvimento de cestódeos .....</i>	<i>14</i>
1.3 <i>Uma proteína cromodomínio-helicase (CHD) como potencial marcador de desenvolvimento de M. corti.....</i>	<i>16</i>
1.4 <i>Justificativa e objetivos .....</i>	<i>18</i>
1.4.1 <i>Objetivo geral.....</i>	<i>18</i>
1.4.2 <i>Objetivos específicos .....</i>	<i>19</i>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
2.1 <i>Manipulação in vivo e in vitro de M. corti.....</i>	<i>20</i>
2.1.1 <i>Manipulação in vivo .....</i>	<i>20</i>
2.1.2 <i>Manipulação in vitro .....</i>	<i>20</i>
2.1.3 <i>Indução da estrobilização de tetratirídeos.....</i>	<i>21</i>
2.1.4 <i>Preparação de extratos proteicos .....</i>	<i>21</i>
2.2 <i>Clonagem da sequência codificadora parcial da proteína McCHD de M. corti.....</i>	<i>21</i>
2.2.1 <i>Seleção da sequência alvo .....</i>	<i>21</i>
2.2.2 <i>Projeto de oligonucleotídeos iniciadores .....</i>	<i>22</i>
2.2.3 <i>Obtenção e amplificação da sequência parcial da proteína recMcCHD .....</i>	<i>22</i>
2.2.5 <i>Realização da clonagem por recombinação in vivo .....</i>	<i>23</i>
2.3 <i>Expressão da proteína recombinante .....</i>	<i>24</i>
2.3.1 <i>Solubilização da proteína recombinante.....</i>	<i>24</i>
2.3.2 <i>Purificação da proteína recombinante recMcCHD.....</i>	<i>25</i>
2.4 <i>Produção de antissoro policlonal monoespecífico .....</i>	<i>25</i>
2.5 <i>Imunoblot.....</i>	<i>25</i>
2.6 <i>Análise eletroforética em gel de agarose e gel de poliacrilamida .....</i>	<i>26</i>
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 <i>Obtenção e amplificação da sequência parcial da proteína recMcCHD .....</i>	<i>27</i>
3.1.1 <i>Extração de RNA de tetratirídeos de M. corti .....</i>	<i>27</i>
3.1.2 <i>Amplificação da sequência codificadora da proteína recMcCHD .....</i>	<i>27</i>
3.2 <i>Clonagem da sequência-alvo por recombinação in vivo.....</i>	<i>28</i>
3.2.1 <i>Preparação do vetor.....</i>	<i>28</i>
3.2.2 <i>Clonagem por recombinação in vivo.....</i>	<i>29</i>
3.3 <i>Expressão da proteína recMcCHD em E. coli.....</i>	<i>30</i>
3.3.1 <i>Solubilização da proteína recMcCHD.....</i>	<i>31</i>
3.3.2 <i>Purificação da proteína recMcCHD .....</i>	<i>32</i>
3.4 <i>Análise da expressão da proteína McCHD em extratos proteicos de M. corti .....</i>	<i>32</i>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>38</b>

## Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

- BAEE:** 10<sup>5</sup> unidades de benzoilarginina-etil-éter
- cDNA:** DNA complementar
- McCHD:** proteína cromodomínio-helicase de *Mesocestoides corti*
- CHD:** proteína cromodomínio-helicase
- DNA:** ácido desoxirribonucleico
- EDTA:** ácido etilenodiaminotetracético
- EST:** do inglês, *expressed sequence tag*
- GST:** glutationa-S-transferase
- IPTG:** isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
- kDa:** quilodalton
- mRNA:** RNA mensageiro
- NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*
- nt:** nucleotídeos
- pb:** pares de base
- PBS:** tampão fosfato salino, do inglês *phosphate-buffered saline*
- PCR:** reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*
- pH:** potencial hidrogeniônico
- recMcCHD:** proteína cromodomínio-helicase recombinante de *Mesocestoides corti*
- RNA:** ácido ribonucleico
- RT:** do inglês, *reverse transcription*
- PVDF:** fluoreto de polivinilideno
- SAP:** fosfatase alcalina de camarão, do inglês *shrimp alkaline phosphatase*
- SDS-PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
- SFB:** soro fetal bovino
- TEB:** solução tampão contendo uma mistura de tris-base, ácido bórico e EDTA
- TEV:** do inglês, *tobacco etch virus*
- Tm:** temperatura de anelamento dos iniciadores
- UV:** luz ultravioleta

## Lista de Figuras

<b>Figura 1-</b> Representação do ciclo vital provável de <i>Mesocestoides corti</i> .....	13
<b>Figura 2-</b> Representação esquemática da estrutura básica das proteínas CHDs .....	17
<b>Figura 3-</b> Diagrama esquemático da amplificação das seqüências alvo utilizando iniciadores projetados para adição de regiões de homologia com o vetor na extremidade da seqüência .....	24
<b>Figura 4-</b> Extração de RNA de tetratídeos de <i>M. corti</i> .....	27
<b>Figura 5-</b> Representação esquemática da seqüência parcial codificadora da proteína McCHD e amplicons da seqüência codificadora da recMcCHD com os iniciadores primários e secundários. ....	28
<b>Figura 6-</b> Clivagem do vetor pGEX-TEV Gel de agarose 1% corado com GelRed.....	29
<b>Figura 7-</b> PCR de colônia da seqüência recMcCHD. Gel de agarose 1,5% corado com GelRed dos produtos de amplificação obtidos a partir da clonagem em pGEX-TEV.....	30
<b>Figura 8-</b> Análise eletroforética de extratos protéicos de células de <i>E. coli</i> BL21 <i>Códon Plus</i> RIL expressando a proteína recMcCHD. ....	31
<b>Figura 9-</b> Análise eletroforética de extratos celulares da proteína recMcCHD após tratamento com sarcosil e separação das frações solúveis e insolúveis, sobrenadante e pellet respectivamente por centrifugação. ....	31
<b>Figura 10-</b> Análise eletroforética de extratos proteicos de recMcCHD após purificação por cromatografia de afinidade com a resina <i>Gluathione Sepharose</i> 4B (GE Healthcare) e clivagem com a protease TEV para liberação da porção GST.....	32
<b>Figura 11-</b> Análise da expressão diferencial da proteína McCHD em extratos de tetratídeos e vermes estrobilizados de <i>M. corti</i> .....	33

## Lista de tabela

<b>Tabela 1:</b> Sequências de oligonucleotídeos utilizados nesse estudo. Tm (temperaturas de anelamento utilizadas nos programas das PCRs) .....	22
---	----



## Resumo

*Mesocestoides corti* é um platelminto endoparasita utilizado como modelo experimental para o estudo da classe cestoda, a qual abriga também os gêneros *Echinococcus* e *Taenia*, ambos de grande importância médica e veterinária. *M. corti* é considerado um cestódeo-modelo, pois, entre outras vantagens, pode ser mantido *in vivo*, em hospedeiros experimentais, e cultivado *in vitro*. Pouco ainda é sabido sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo de estrobilização de cestódeos. Assim, o objetivo geral deste trabalho é estudar uma cromodomínio-helicase diferencialmente expressa durante este processo em *M. corti*. Em estudos anteriores, nosso grupo construiu bibliotecas de cDNA enriquecidas com sequências diferencialmente expressas em larvas (tetratirídeos) e vermes segmentados e, delas, foram selecionadas para estudo sequências de cDNAs correspondentes a genes conservados relacionados ao desenvolvimento. Um dos cDNAs selecionados codifica parte de uma cromodomínio-helicase (McCHD), com ortólogos envolvidos em processos de remodelagem de cromatina e controle da expressão gênica em diferentes espécies eucarióticas. A sequência parcial da McCHD foi amplificada a partir de RNA de tetratirídeos por RT-PCR, clonada por recombinação *in vivo* em vetor modificado da série pGEX e expressa em *Escherichia coli* como proteína de fusão com a glutathione-S-transferase (GST). A proteína recombinante foi posteriormente purificada por cromatografia de afinidade em coluna de *Glutathione Sepharose* clivada com a protease TEV para liberação da GST e utilizada na imunização de um coelho. O antissoro policlonal monoespecífico assim produzido foi utilizado em experimentos de imunoblot para confirmar que o nível de expressão da McCHD é maior em tetratirídeos do que em vermes adultos. Experimentos de imunohistoquímica e de análise transcricional por RT-qPCR serão agora realizados para uma melhor caracterização do padrão de expressão espaço-temporal da McCHD ao longo do processo de desenvolvimento de *M. corti*.

Palavras-chave: *Mesocestoides corti*, cromodomínio-helicase, expressão diferencial, cDNA.

## Abstract

*Mesocestoides corti* is a tapeworm of the Cestoda class, the same of species of medical and veterinary importance, such as those belonging to the genres *Echinococcus* and *Taenia*. *M. corti* was chosen as model cestode organism, and due to the availability of established protocols for its maintenance both *in vivo* and *in vitro*. Little is known about the molecular mechanisms involved in cestode strobilization and this work aims to study a chromodomain-helicase differentially expressed during this process in *M. corti*. From previously studies was obtained cDNA sequence data from subtracted cDNA libraries, several cDNAs corresponding to differentially expressed genes in larvae (tetrathyridia) or segmented adult worms, and these were selected for study sequences of cDNAs corresponding to conserved genes related to development. One of the selected cDNAs codes for part of a protein orthologous to the chromodomain-helicase (CHD), usually involved in chromatin remodeling and control of gene expression in different eukaryotic species. The partial McCHD sequence was amplified from larvae RNA by RT-PCR, cloned into a modified pGEX expression vector (pGEX-TEV), and expressed in *Escherichia coli* as a fusion with GST, being purified by affinity chromatography followed by TEV protease digestion. The recombinant recMcCHD was used to immunize rabbits and produce a specific antiserum, which, in immunoblot, confirmed the differential expression of native McCHD (~200 kDa) in tetrathyridia, with a lower level of expression in adults. Immunohistochemistry experiments and transcriptional analysis by RT-qPCR will now be conducted to better characterize the expression pattern of space-time along the McCHD development process of *M. corti*.

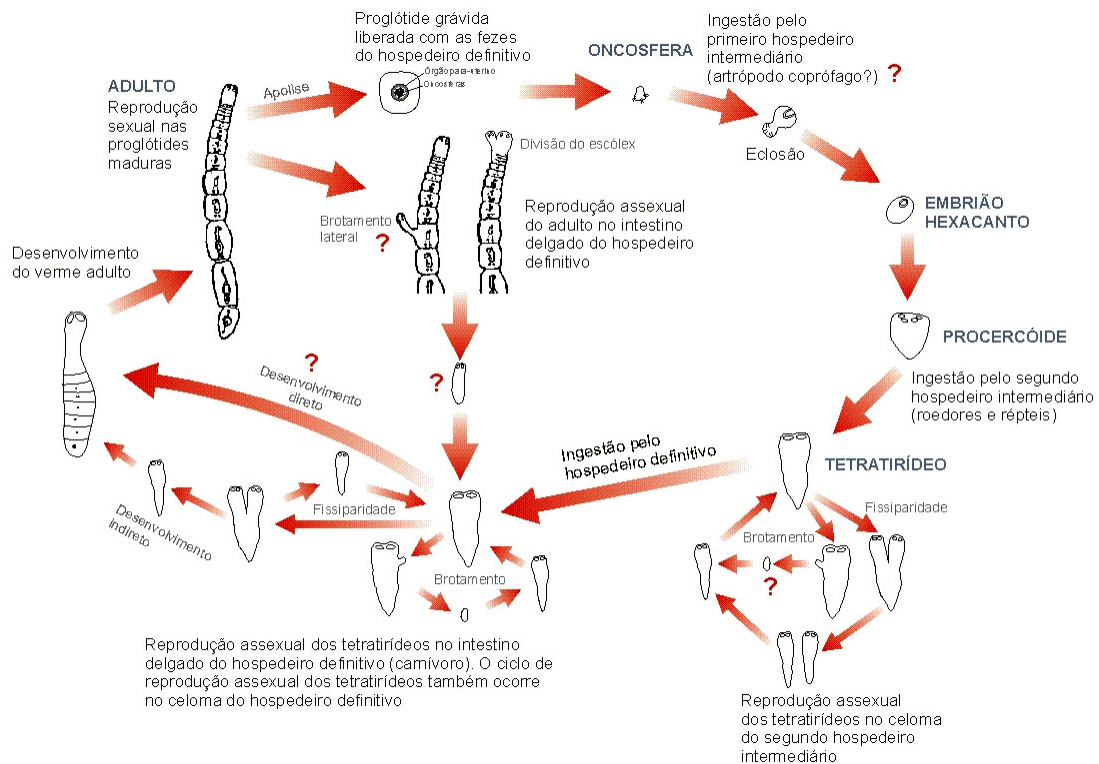
Key words: *Mesocestoides corti*, chromodomain-helicase, differential expression, cDNA.

# 1 Introdução

## 1.1 *Mesocestoides corti*

*Mesocestoides corti* (Hoepli, 1925) é um platelminto endoparasita pertencente à classe Cestoda a mesma de espécies de relevância médica e veterinária, como aquelas pertencentes aos gêneros *Echinococcus* e *Taenia*. *M. corti* apresenta um ciclo de vida complexo (Figura 1), o qual provavelmente inclui um hospedeiro definitivo (um carnívoro) e dois hospedeiros intermediários (o primeiro, artrópode, e o segundo, um roedor, um anfíbio ou um réptil), e que apresenta algumas etapas do seu desenvolvimento ainda desconhecidas (Soldatova, 1944; Novak, 1972; Barret *et al.*, 1982; Kawamoto *et al.*, 1986; Etges & Marinakis, 1991; Loos-Frank, 1991) Uma das etapas do seu desenvolvimento ocorre no seu hospedeiro definitivo, no qual a fase larval denominada de tetratrídeo é capaz de desenvolver-se no verme adulto, por meio do processo de estrobilização. O ciclo inicia-se com a ingestão de uma proglótide grávida, a qual eclodiria e levaria ao desenvolvimento do estágio larval denominado de procercóide. Em seu segundo hospedeiro intermediário ocorreria o desenvolvimento do procercóide em tetratrídeo, estágio larval capaz de reprodução assexuada por fissiparidade ou brotamento. Já no seu hospedeiro definitivo o verme é capaz de reprodução assexuada por divisão longitudinal do escólex e sexuada por fecundação cruzada que dá origem a novas proglótides grávidas, reiniciando o ciclo.

O processo de estrobilização, que ocorre na passagem da fase de tetratrídeo para a de adulto, envolve o alongamento e segmentação corporal, concomitantemente com a maturação dos órgãos sexuais (Ong & Smith, 1986, Olson *et al.*, 2001, 2005). Este processo pode ser induzido *in vitro* a partir de um protocolo desenvolvido em nosso laboratório (Markoski *et al.*, 2003). Dessa forma, torna-se possível o estudo de diferentes fases do desenvolvimento deste verme, bem como dos processos moleculares que levam à passagem da fase larval ao organismo adulto.



**Figura 1- Representação do ciclo vital provável de *Mesocestoides corti*.** O ciclo vital de *M. corti* é complexo, incluindo dois hospedeiros intermediários e um hospedeiro definitivo. O primeiro hospedeiro intermediário é um artrópodo que ingere uma proglótide grávida contendo oncosferas, que eclodem e dão origem ao primeiro estágio larval. No segundo hospedeiro intermediário ocorre o desenvolvimento da fase larval de tetratrídeo, capaz de reprodução assexual por fissiparidade e brotamento. No hospedeiro definitivo, os tetratrídeos passam pelo processo de estrobilização, desenvolvendo-se no estágio adulto. O verme adulto é capaz de reprodução assexuada por brotamento ou divisão do escólex e sexualmente por fecundação cruzada (Figura cedida por Henrique B. Ferreira).

Espécies do gênero *Mesocestoides* apresentam uma distribuição cosmopolita, e tem sido frequentemente encontradas em animais carnívoros, como raposas, coiotes, lobos, guaxinins, cachorros e em outros animais, principalmente na Europa Central e na América do Norte (Abdybekova & Torgerson, 2011; Boyce W *et al.*, 2011; Bružinskaitė-Schmidhalter *et al.*, 2011, Zaleśny & Hildebrand, 2011). Na América do Sul, especificamente no Brasil, recentemente foi relatado a identificação de espécies do gênero *Mesocestoides* parasitando quatro espécies de felinos selvagens (Gallas & Silveira, 2011). Apesar de ter uma ampla distribuição, infecções em seres humanos por espécies do gênero *Mesocestoides* são incomuns e geralmente eliminadas após tratamento com medicamento anti-helmíntico (Fuentes *et al.*, 2003).

*M. corti* é um organismo-modelo para diversos aspectos biológicos de cestódeos (Lalanne *et al.*, 2004, Bizarro *et al.*, 2005; Kermmerling *et al.*, 2006, Markoski *et al.*, 2006), e tem sido utilizado como modelo experimental para o estudo de relações parasito-hospedeiro, desenvolvimento de drogas anti-helmínticas e desenvolvimento de cestódeos (Britos *et al.*, 2000, Alvarez *et al.*, 2010, Cabrera *et al.*, 2010, Gundra *et al.*, 2011). Além disso, sua manipulação é segura, uma vez que *M. corti*, assim como outras espécies do mesmo gênero, não é normalmente infectivo para seres humanos, tendo sido os poucos casos de infecções humanas descritos na literatura causados por ingestão massiva acidental de tetratirídeos (Chandler, 1942; Soulsby, 1965; Gleason & Healy, 1967; Rey, 1991; Garcia & Bruckner, 1997, Fuentes *et al.* 2003).

Apesar de estudos realizados em diversos âmbitos da biologia de cestódeos (Espinoza *et al.*, 2005, Koziol *et al.*, 2010, 2011), pouco é conhecido sobre a biologia molecular do processo de desenvolvimento da fase larval para a adulta. Em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa, duas bibliotecas de cDNA subtraídas (uma de tetratirídeos e outra de vermes adultos) foram construídas para *M. corti*, e, através de macroarranjo de DNA, foi possível identificar sequências conservadas de genes relacionados ao desenvolvimento de *M. corti* que apresentaram expressão diferencial entre a fase larval e a fase adulta (verme estrobilizado) (Bizarro *et al.*, 2005). Em outro estudo, por meio de análises proteômicas de tetratirídeos submetidos ou não à indução da estrobilização por tratamento com tripsina, também foi possível identificar várias proteínas expressas diferencialmente, complementando, desta forma, o estudo anterior (Laschuk *et al.*, 2011).

## **1.2 Proteínas de *M. corti* como potenciais marcadores moleculares do desenvolvimento de cestódeos**

As relações filogenéticas relativas ao filo Platyhelminthes ainda não são muito claras. Como exemplo pode-se citar a segmentação corporal de platelmintos, na qual a idéia clássica de que esta seria uma segmentação metamérica ou secundária, esta sendo contestada. Tem sido proposto que esta segmentação seria uma segmentação primária ou verdadeira, e que

compartilharia uma origem monofilética com animais celomados como Artrópodes, Anelídeos e Cordados (Peel & Akam, 2003; Minelli & Fusco, 2004; Olson & Tkach, 2005). Neste contexto, a caracterização de genes e proteínas envolvidas na estrobilização de platelmintos da classe Cestoda é fundamental para viabilizar estudos comparados mais amplos, a partir dos quais poderão se estudar melhor as relações suprafiléticas existentes entre platelmintos e outros grupos de metazoários.

Brehm *et al.*, (2006, 2010) relataram a importância de estudos sobre o desenvolvimento de cestódeos para se obter informações mais relevantes sobre os processos biológicos destes organismos, que vão além do caráter descritivo. Compreender as bases moleculares, os mecanismos e as modificações que ocorrem durante o desenvolvimento e a co-evolução dos parasitos cestódeos são essenciais, tanto para o conhecimento na área de parasitologia como também altamente relevantes para o desenvolvimento de medicamentos antiparasitários e vacinas. Contudo, a caracterização dos processos moleculares que levam ao desenvolvimento de cestódeos até a fase adulta, principalmente durante o processo de estrobilização ainda é escassa, e a caracterização de genes e proteínas correspondentes a esta fase permitirá a identificação de marcadores moleculares específicos no desenvolvimento destes parasitos.

Os estudos de Bizarro *et al.*, (2005), no qual foi possível identificação de sequências correspondentes a genes diferencialmente expressos em tetratirídeos e vermes estrobilizados de *M. corti*, forneceram as primeiras informações mais abrangentes sobre diferenças de tetratirídeos e vermes estrobilizados. Neste trabalho vários fatores de transcrição e reguladores de cromatina estrutura, foram descritos pela primeira vez a partir de uma espécie de platelminto. Os fragmentos de cDNA sequenciados e analisados apresentaram-se relacionados a componentes de maquinarias moleculares muito antigas, como o complexo SWI/SNF, com ortólogos presentes em leveduras, seres humanos e em *Drosophila*. Os transcriptomas analisados também apresentam sequências que estão intimamente relacionadas com processos de desenvolvimento tanto de invertebrados como de vertebrados, envolvidas principalmente em processos de remodelação da cromatina para

atividades específicas de protomeres homeóticos e também com mecanismos morfogenéticos.

Em outros estudos Koziol *et al.*, (2009) identificaram dois genes HOX de *M. corti*, sete em *E. multilocularis*, e nove em *Schistosoma mansoni* e sugerem que há uma conservação evolutiva destes genes entre o táxon monofilético dos neodermatas. Koziol *et al.*, (2011), também identificaram genes da tropomiosina (TPM) e diferentes isoformas em *M. corti*, e descreveram umas das isoformas como marcador para o desenvolvimento dos músculos durante a diferenciação final dos primórdios genitais de *M. corti*. Os autores também especulam a idéia de que os genes TPM e as isoformas encontradas em *M. corti*, estariam conservados em outras espécies de neodermatas.

### **1.3 Uma proteína cromodomínio-helicase (CHD) como potencial marcador de desenvolvimento de *M. corti***

Proteínas CHDs fazem parte de uma família diversa de proteínas, apresentam em média massas moleculares acima de 200 kDa e compartilham uma certa homologia estrutural (Hall *et al.*, 2007). A estrutura básica das proteínas CHD é constituída por dois cromodomínios truncados na região N-terminal, um domínio ATPase/Helicase central, e um domínio de ligação ao DNA na região C-terminal (Figura 2).

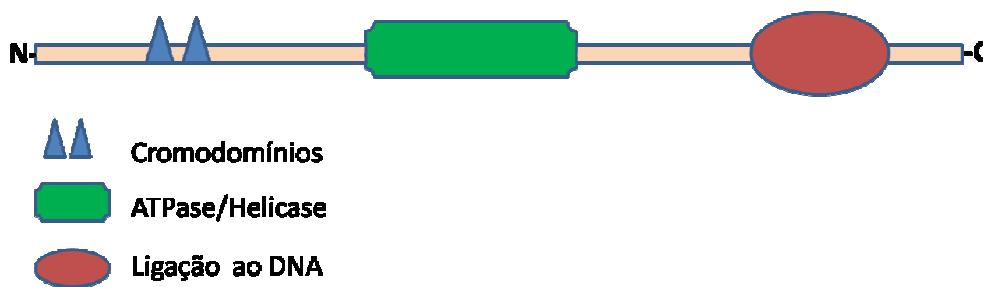
Proteínas CHDs estão envolvidas principalmente em processos de remodelagem de cromatina e podem estar associadas a grandes complexos enzimáticos como o complexo SWI/SNF, ou complexo NURD, sendo descritas como ativadoras ou repressoras da transcrição (Shimono *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Smeenk *et al.*, 2010).

O primeiro membro da família CHD foi descoberto e caracterizado em camundongo, durante a pesquisa de Delmas *et al.*, (1993) por reguladores dos promotores de imunoglobulinas. Atualmente a família de proteínas CHD compreende 9 membros, os quais podem ser encontrados em uma variedade de organismos eucarióticos, incluindo *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, camundongos, leveduras, seres humanos, e outros vertebrados (Hall *et al.*, 2007).

Baseado na estrutura básica das proteínas CHDs, e nas diferenças estruturais, além dos 3 domínios principais, as proteínas CHD foram divididas em três subfamílias: a subfamília I (CHD 1 e CHD 2), a subfamília II (CHD 3, CHD 4), e a subfamília III (CHD 5, CHD 6, CHD 7, CHD 8, CHD 9, Kismet-L, T04D-14, e KIAA1416)(Hall *et al.*, 2007). Cada subfamília apresenta características estruturais específicas, o que torna possível estudar suas interações com DNA e tentar identificar suas funções, bem como seu envolvimento na regulação da transcrição de genes (Köhler *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011).

A proteína CHD abordada neste estudo, foi identificada a partir dos estudos de Bizarro *et al.*, (2005). Esta proteína faz parte da biblioteca de cDNA de tetratirídeos (dp2reverse, Bizarro *et al.*, 2005) e codifica parte de uma cromodomínio-helicase de *M. corti* (McCHD). Devido ao envolvimento das proteínas CHD em processos de desenvolvimento e diferenciação celular (Jacobs-McDaniels & Albertson, 2011; Polo *et al.*, 2010; Tsukiyama 2002; Urquhart *et al.*, 2011), este alvo foi escolhido para se investigar o seu potencial envolvimento com o processo de desenvolvimento de *M. corti*.

A caracterização de proteínas que atuem durante o desenvolvimento do parasito *M. corti* é essencial para estabelecer quais são os seus papéis funcionais na biologia dos parasitos cestódeos, especialmente no que diz respeito ao potencial envolvimento no processo de estrobilização.



**Figura 2- Representação esquemática da estrutura básica das proteínas CHDs.** Está representado a sequência N-terminal para C-terminal, incluindo a distribuição dos seus domínios funcionais básicos: dois cromodomínios (triângulos) truncados na região N-terminal, um domínio ATPase/Helicase central (retângulo), e um domínio de ligação ao DNA na região C-terminal (elipse).



## 1.4 Justificativa e objetivos

*Mesocestoides corti* apresenta-se como um modelo experimental para o estudo da classe cestoda, devido à disponibilidade de protocolos estabelecidos para seu cultivo e manutenção *in vivo* e *in vitro*, bem como para a indução de sua estrobilização (Markoski *et al.*, 2003), não apresentando algumas das principais limitações encontradas para a manipulação experimental de outras espécies de tênias. Apesar de estudos realizados em diversos âmbitos da biologia de cestódeos, pouco é conhecido sobre a biologia molecular do processo de estrobilização, o qual confere aos cestódeos a diferenciação da fase larval na de adulto.

A proteína McCHD apresenta-se como um potencial marcador molecular do desenvolvimento de *M. corti* e, portanto, seu estudo neste modelo experimental pode servir para melhor elucidar os mecanismos moleculares determinantes do processo de estrobilização, contribuindo desta forma para o melhor entendimento de rotas do desenvolvimento de cestódeos, que devido à conservação evolutiva (Kozioł *et al.*, 2009), deverão ser válidos não só para *M. corti*, como também para as tênias em geral.

A caracterização de genes e proteínas envolvidas na estrobilização de platelmintos da classe cestoda poderá auxiliar na determinação de novos alvos quimioterápicos para o tratamento de cestodíases. O uso deste modelo experimental para estudos em nível celular da ação de drogas anti-helmínticas e de outros aspectos moleculares, como rotas de sinalização, regulação da expressão gênica e interações com o sistema imune hospedeiro demonstra ser interessante e aplicável.

### 1.4.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo é a caracterização de uma cromodomínio-helicase, como potencial marcador molecular de desenvolvimento de *M. corti*.

#### 1.4.2 Objetivos específicos

- (i) Clonar e expressar em *Escherichia coli* a sequência codificadora parcial de uma proteína cromodomínio-helicase de *M. corti* para produção da proteína recombinante correspondente;
- (ii) Produzir anti-soro específico contra a proteína recombinante (recMcCHD) para utilização como ferramenta para análise do padrão de expressão da proteína nativa correspondente;
- (iii) Caracterizar o padrão de expressão espaço-temporal da proteína recMcCHD durante processo de estrobilização de *M. corti*.

## **2 Materiais e Métodos**

### **2.1 Manipulação *in vivo* e *in vitro* de *M. corti***

#### **2.1.1 Manipulação *in vivo***

A manutenção de estoques *in vivo* foi realizada a partir da injeção intraperitoneal de 200 µL de tetratirídeos (aproximadamente 600 larvas) em camundongos (*Mus musculus*, linhagem BALB/c). Foram utilizadas, preferencialmente, fêmeas com mais de três meses de idade, as quais foram adquiridas e mantidas no biotério do Laboratório Central da Secretaria de Saúde e do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN-RS).

Após três meses de infecção, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e lavados em etanol 70% durante 5 min. A cavidade abdominal de cada animal era aberta em capela de fluxo laminar vertical, com material cirúrgico esterilizado, e os tetratirídeos, aspirados com auxílio de uma pipeta Pasteur e colocados em um tubo cônico (Falcon) com meio-zero (descrição abaixo) contendo antibiótico. Após a obtenção das larvas, estas foram cultivadas e utilizadas na indução de estrobilização e para a preparação de extratos protéicos conforme descritos nos itens abaixo.

#### **2.1.2 Manipulação *in vitro***

Os tetratirídeos foram cultivados seguindo o protocolo descrito por Markoski *et al.*, (2003). Neste protocolo utiliza-se meio RPMI 1640 (Gibco-BRL) suplementado com HEPES, NaHCO<sub>3</sub>, glutamina, glicose e extrato de levedura, necessários para o desenvolvimento *in vitro* dos tetratirídeos (Barret *et al.*, 1982), chamado meio McRPMI. A este meio (chamado de meio-zero), foi adicionado soro fetal bovino (SFB, Cultilab) na concentração de 20%. Aos meios foram também adicionados 80 mg/ml (concentração final) de garamicina (Schering-Plough). O cultivo foi realizado em frascos de cultivo horizontal (Corning) pequenos (75 cm<sup>2</sup>) contendo 10 ml de meio. A incubação foi realizada a 37°C numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em incubadora (Sanyo, modelo COM 175). Os tetratirídeos recém extraídos eram cultivados por 24 h

em meio-zero, e após, o meio era substituído por McRPMI suplementado com 20% de SFB. As trocas de meio eram realizadas a cada dois dias de cultivo.

### **2.1.3 Indução da estrobilização de tetratrídeos**

A indução da estrobilização de tetratrídeos foi também realizada de acordo com Markoski *et al.*, (2003), consistindo de uma pré-incubação dos tetratrídeos em meio de cultivo com tripsina ( $10^5$  BAEE/ml) por 24 h e elevação da temperatura de cultivo de 37°C para 39°C. Após as 24 h de pré-incubação, foi realizada a troca de meio e manutenção da temperatura elevada. Após 6-7 dias de cultivo (tempo necessário para que ocorresse a segmentação) os vermes completamente estrobilizados eram selecionados em estereomicroscópio.

### **2.1.4 Preparação de extratos proteicos**

Os tetratrídeos estrobilizados e os não estrobilizados eram lavados 10 vezes em tampão Tris-HCl 40 mM pH 7,2 antes de serem homogeneizados em um homogeneizador de vidro, em um banho de gelo. Após, os homogeneizados eram centrifugados a 15.000 x g por 30 min à temperatura ambiente, para a separação das fases solúvel e insolúvel. O conteúdo proteico da fase solúvel era quantificado pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad), usando como referência curvas-padrão de albumina sérica bovina. Após a quantificação, as amostras (fase solúvel) eram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

## **2.2 Clonagem da sequência codificadora parcial da proteína McCHD de *M. corti***

### **2.2.1 Seleção da sequência alvo**

A partir das bibliotecas de cDNA subtraídas (uma de tetratrídeos e outra de vermes adultos), as quais foram construídas em nosso laboratório para *M. corti*, (Bizarro *et al.*, 2005), foi possível selecionar a sequência parcial codificadora da proteína cromodomínio-helicase (McCHD). Tal sequência está disponível no banco de dados do NCBI e seu número de acesso é CX864854

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/CX864854>). Baseada na função conservada descrita para ortólogos desta proteína, este alvo foi escolhido para clonagem e caracterização molecular.

### 2.2.2 Projeto de oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo foram projetados utilizando-se o *software* Vector NTI Advance 10 (Invitrogen). Os iniciadores específicos da sequência codificadora parcial da proteína recMcCHD contém regiões de 25 nt de homologia com o vetor para posterior clonagem por recombinação *in vivo*. A Tabela 1 apresenta todos os iniciadores utilizados neste estudo.

**Tabela 1:** Sequências de oligonucleotídeos utilizados nesse estudo. T<sub>m</sub> (temperaturas de anelamento utilizadas nos programas das PCRs)

Oligos	Sequências	T <sub>m</sub> (°C)
RrecCHD	5'-GCG AGG CAG ATC GTC AGT CAG TCA AAC AGA TTG GCA CTG AAC G-3'	52
FrecCHD	5'-TAT TTT CAG GGA GAA TTC CCG GGT ACA GAA CTC CAA CTG GAA GTG-3'	52
RrecII	5'-TGA CTG ACT GAC GAT CTG CCT CGC GCG TTT CGG TGA TGA CGG TGA AAA CC-3'	60
FrecII	5'-TGG TTC CGC GTG GAT CTG AAA ACC TGT ATT TTC AGG GAG AAT TCC CGG GT-3'	60
pGEX-AltF	5'-CCT GGA TGC GTT CCC AAA A-3'	54
pGEX-AltR	5'-CGA CAC CCG CCA ACA CC-3'	54

### 2.2.3 Obtenção e amplificação da sequência parcial da proteína recMcCHD

A amplificação da sequência codificadora parcial da proteína recMcCHD foi realizada por RT-PCR. Inicialmente o RNA de tetratídeos foi extraído utilizando-se Brazol (LGC Biotecnologia), conforme descrito pelo fabricante. A

síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se a enzima *M-MuIV Reverse Transcriptase* (Fermentas), conforme as instruções do fabricante. Após, os cDNAs foram amplificados por PCR utilizando-se iniciadores específicos contendo 25 nt de homologia com o vetor. (Tabela 1, iniciadores primários – FrecCHD e RrecCHD para sequência recMcCHD). O produto resultante desta primeira amplificação foi utilizado como molde para uma segunda reação de PCR para a inserção de 25 nucleotídeos adicionais de homologia com o vetor (Tabela 1, FrecII e RrecII) para posterior clonagem por recombinação *in vivo* (Figura 2). As reações da PCR foram realizadas utilizando-se o *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas), seguindo as instruções do fabricante.

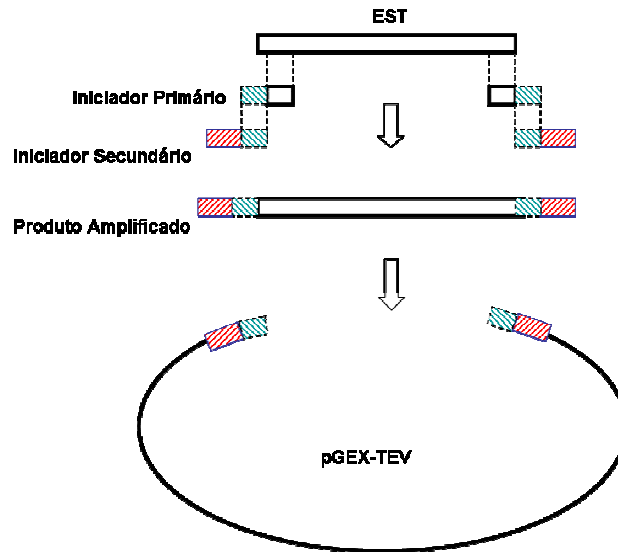
#### **2.2.4 Preparação do vetor**

O vetor utilizado para clonagem foi o pGEX-TEV, o vetor pGEX foi modificado em nosso laboratório no qual foi inserido o sítio de clivagem para a protease TEV (Vargas *et al.*, 2009). A extração plasmidial foi realizada utilizando o Plasmidial Maxi Kit (Quiagen), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação foi realizada utilizando Qubit Fluorometer (Invitrogen).

A clivagem foi realizada com a endonuclease de restrição *XhoI* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. A clivagem do vetor foi analisada em gel de agarose 0,8% e a eficiência determinada por transformação em células de *E. coli* KC8. A defosforilação do vetor foi realizada utilizando-se a enzima SAP (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

#### **2.2.5 Realização da clonagem por recombinação *in vivo***

A clonagem por recombinação *in vivo* foi realizada segundo o protocolo descrito por Parrish *et al.*, (2004). A confirmação da clonagem da sequência codificadora parcial da proteína cromodomínio-helicase no vetor de expressão pGEX-TEV foi realizada por PCR de colônia, e utilizando-se os iniciadores específicos do vetor pGEX-TEV (Tabela 1- pGEX-AltF e pGEX-AltR).



**Figura 3: Diagrama esquemático da amplificação das seqüências alvo utilizando iniciadores projetados para adição de regiões de homologia com o vetor na extremidade da seqüência.** Iniciadores primários contêm nucleotídeos específicos para amplificação da seqüência-alvo e 25 nt de homologia com o vetor; Iniciadores secundários contêm uma região adicional de 25 nt de homologia com o vetor. (Figura cedida por Daiani Vargas).

## 2.3 Expressão da proteína recombinante

O plasmídeo recombinante foi transformado em células de *E. coli* BL21 *Codon Plus* RIL (Stratagene) e a expressão da proteína recombinante em fusão com a glutationa-S-transferase foi induzida com IPTG (Invitrogen) na concentração final de 0,1 mM, a 37°C por 3 e 16-18 h. As células bacterianas foram rompidas por sonicação (6 pulsos de 30 s, com amplitude 60) em banho de gelo e o lisado foi centrifugado a 20.000 rpm, por 30 min, a 4°C, para separação das frações solúvel e insolúvel. A análise da expressão da proteína recombinante foi realizada submetendo-se os extratos protéicos a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% e a proteína visualizada por coloração com *coomassie blue*.

### 2.3.1 Solubilização da proteína recombinante

A solubilidade da proteína recombinante foi avaliada utilizando-se 0,5% e 1% de sarcosil (N-laurilsarcosina, Serva) seguindo o protocolo descrito por Frangioni *et al.*, (1993). Os extratos celulares, depois de tratados com sarcosil,

foram submetidos à centrifugação para separação das frações solúveis e insolúveis, sobrenadante e pellet, respectivamente. A análise da solubilização da proteína recombinante foi realizada submetendo-se as frações solúveis e insolúveis à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% e as proteínas visualizadas por coloração com *coomassie blue*.

### **2.3.2 Purificação da proteína recombinante recMcCHD**

A proteína recombinante fusionada com a GST foi purificada por cromatografia de afinidade, utilizando-se a resina *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare), conforme descrito por Smith & Johnson (1988). A proteína de fusão foi clivada com a protease TEV, utilizando 0,01 mg da protease para 0,1 mg da proteína de fusão, a 34°C por 16 h. A eficiência da clivagem foi determinada submetendo-se a clivagem a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15% e as proteínas visualizadas por coloração com *coomassie blue*.

### **2.4 Produção de antissoro policlonal mono específico**

Após a clivagem da proteína de fusão recMcCHD-GST com a protease TEV, esta foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15% para posterior excisão de porções do gel contendo a proteína recMcCHD livre da GST. Após a excisão, o antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund para primeira imunização, e em adjuvante incompleto nas imunizações subsequentes. Aproximadamente 100 µg de antígeno por dose foram utilizadas para imunização de um coelho por via subcutânea para produção de anti-soro específico. Foram realizadas ao todo três imunizações, com intervalos de 15 dias, colhendo-se o sangue e obtendo-se o soro uma semana após a última imunização.

### **2.5 Imunoblot**

Aproximadamente 40 µg de extrato proteico de tetratídeos e de vermes estrobilizados foram submetidos à SDS-PAGE 12% e transferidos para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) conforme descrito por Towbin *et*



*al.*, (1992) por 1 h e 30 min. A membrana de PVDF foi incubada com soro anti-CHD na diluição de 1:5000. Como anticorpo secundário foi utilizado o imunoc conjugado constituído de imunoglobulinas de cabra anti-IgG de coelho na diluição de 1:9000. As reações foram reveladas através de quimioluminescência, utilizando-se o kit de detecção ECL Plus *Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare).

## **2.6 Análise eletroforética em gel de agarose e gel de poliacrilamida**

Para a visualização de DNA e RNA utilizou-se a eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 1X (89 mM Tris-HCl; 2,5 mM EDTA e 89mM Ácido Bórico- pH 8,3) corado com GelRed. As amostras eram resolvidas em um sistema de cuba horizontal de eletroforese (BioRad). A eletroforese era realizada em tampão TBE 1X (89 mM Tris-HCl; 2,5 mM EDTA e 89 mM ácido bórico pH 8,3) e com uma voltagem constante de 90 V. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e fotodocumentadas em aparelho Gel Doc XR (Bio-Rad). O marcador de tamanho molecular utilizado foi o plasmídeo pUC 18 clivado com a endonuclease de restrição *HinfI* (Promega) segundo as instruções do fabricante.

Nas análises eletroforéticas para resolução de extratos protéicos, solubilização e purificação de proteínas utilizou-se o sistema de SDS-PAGE na concentração de 12% e de 15% (Laemmli, 1970). As amostras eram resolvidas em um sistema de cubas verticais de eletroforese (BioRad). A eletroforese era realizada em tampão Tris-glicina/SDS (250 mM Tris-Cl; 1,92 mM glicina; 1% SDS; pH 8,3) e com uma voltagem constante de 100V. Às amostras a serem analisadas eram adicionadas 0,2 volumes de tampão de amostra 5X com  $\beta$ -mercaptoetanol (625 mM Tris-Cl; 0,2% azul de bromofenol; 2,3% SDS; 10% glicerol; 5%  $\beta$ -mercaptoetanol), para eletroforese em condições redutoras.

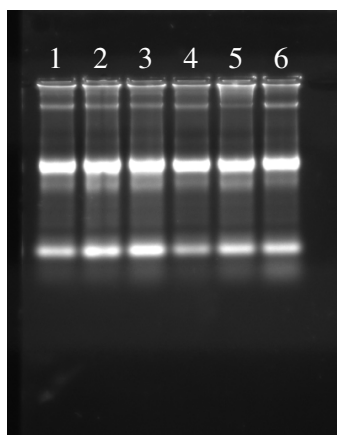
As estimativas de massa molecular das proteínas eram feitas por comparação com marcadores comerciais aplicados nos géis. Para visualização das proteínas após a eletroforese, os géis eram corados com *coomassie blue* (1% *coomassie brilliant blue* R-250; 10% ácido acético; 50% metanol) por 20 min a 65°C. O excesso de corante era removido com ácido acético 10% em água a 65°C.

### 3 Resultados

#### 3.1 Obtenção e amplificação da sequência parcial da proteína recMcCHD

##### 3.1.1 Extração de RNA de tetratirídeos de *M. corti*

As extrações de RNA de tetratirídeos de *M. corti* apresentaram um rendimento de aproximadamente 1500ng a cada 50µl de vermes. Ao todo foram realizadas seis extrações que apresentaram o mesmo rendimento (Figura 4).

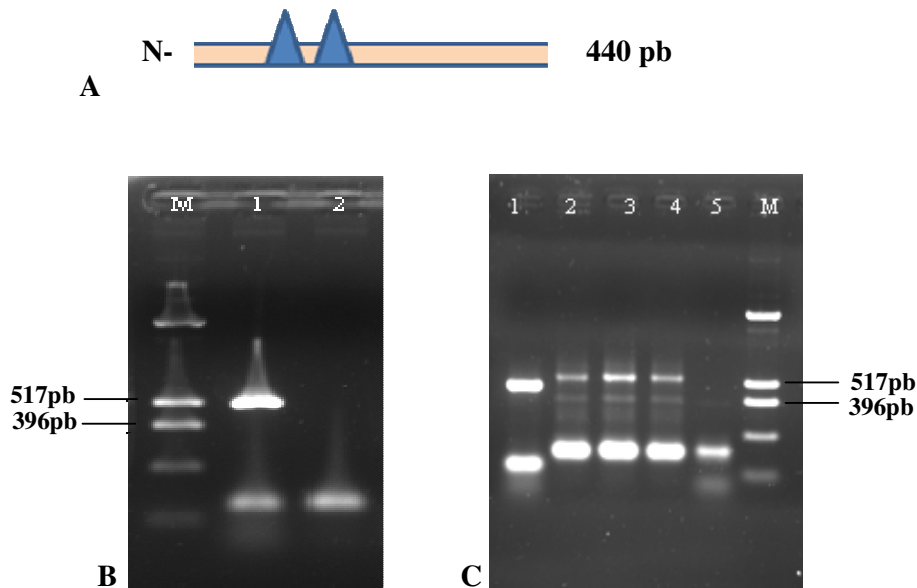


**Figura 4- Extração de RNA de tetratirídeos de *M. corti*.** Gel de agarose 1% corado com GelRed, (1- 6) extrações realizadas com Brazol, obtendo-se rendimento de aproximadamente 1500 ng a cada 50 µl de vermes.

##### 3.1.2 Amplificação da sequência codificadora da proteína recMcCHD

A sequência codificadora da proteína recMcCHD obtida por RT-PCR, teve sua identidade confirmada por sequenciamento automático de DNA. O segmento clonado corresponde à 440 pb e codifica 147 aminoácidos da sequência N-terminal de uma proteína CHD nativa (Figura 5A). Este segmento foi analisado com a ferramenta *Search for Conserved Domain*, disponível *on line* em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, para detectar domínios funcionais da proteína McCHD. Utilizando esta ferramenta foi possível detectar a presença dos dois cromodomínios no segmento clonado. Após a confirmação do sequenciamento, a sequência codificadora da proteína recMcCHD foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores primários, gerando o produto de 490 pb (Figura 5B). Os produtos das reações de PCR iniciais foram utilizados como molde para uma segunda reação de PCR, utilizando-se

os iniciadores secundários, para adição de mais 25 nt de homologia com o vetor em cada extremidade, gerando o fragmento de 540 pb (Figura 5C).

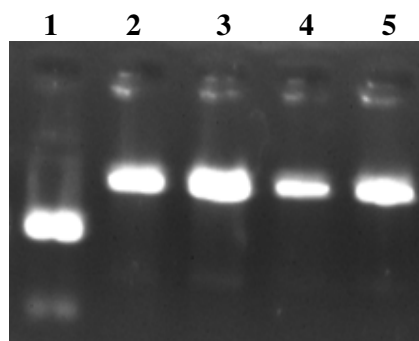


**Figura 5: Representação esquemática da sequência parcial codificadora da proteína McCHD e amplicons da sequência codificadora da recMcCHD com os iniciadores primários e secundários.** (A) desenho esquemático representando o segmento parcial correspondente a 440 pb da região N-terminal da proteína McCHD, incluindo os dois cromodomínios (triângulos). Em (B) amplificação da sequência codificadora da recMcCHD com os iniciadores primários gerou produto de 490pb (B-1), (B-2) controle negativo da reação. Em (C) amplificação com os iniciadores secundários gerou um produto de 540pb (C-2-3-4), em C-1 amplificação com o iniciador primário (490pb), em (C-5) controle negativo da reação (sem adição de DNA); M- marcador de tamanho dos fragmentos de DNA. Géis de agarose 1,5% corados com GelRed.

### 3.2 Clonagem da sequência-alvo por recombinação *in vivo*

#### 3.2.1 Preparação do vetor

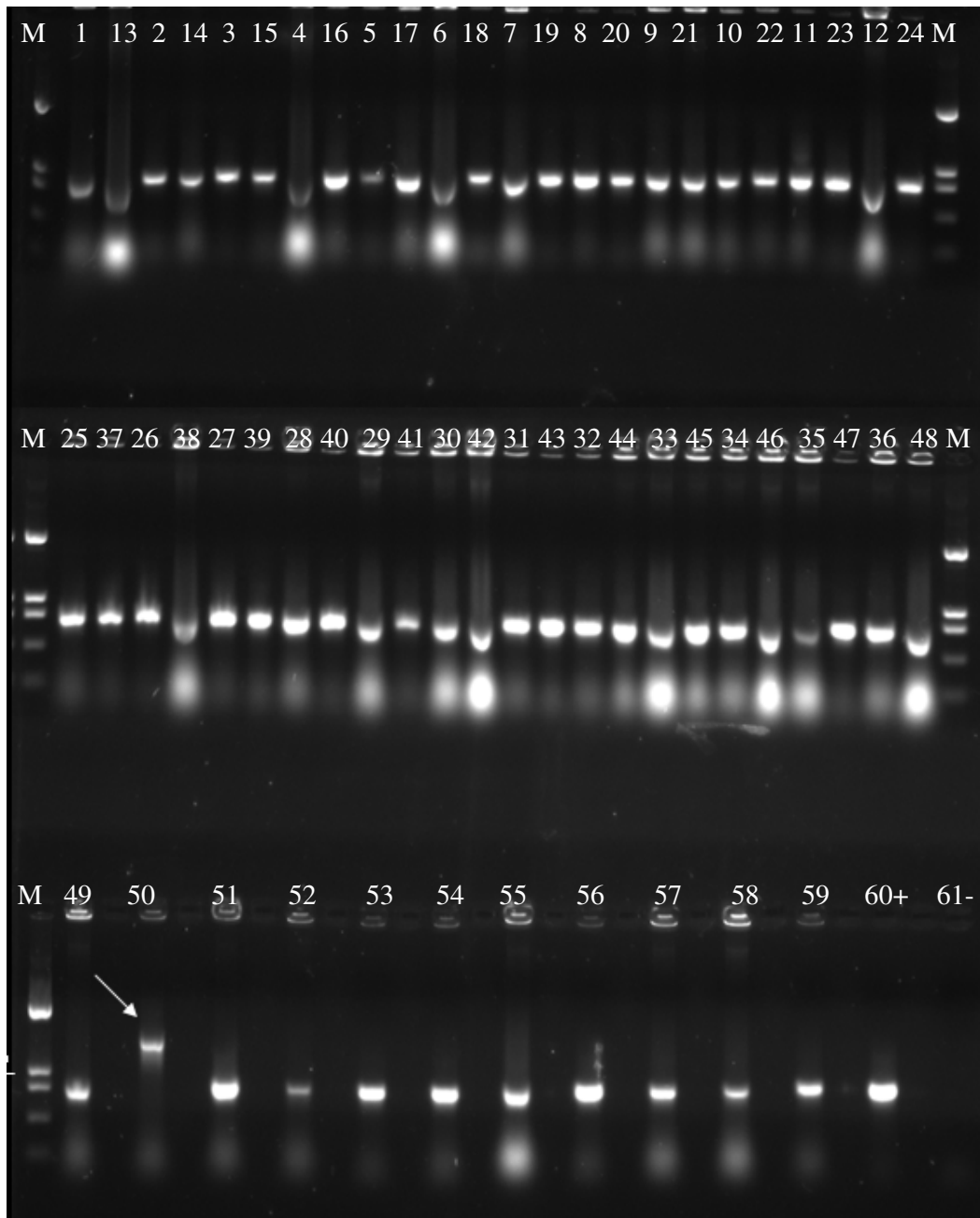
O vetor de expressão modificado pGEX-TEV foi preparado conforme descrito no item 2.2.4. A clivagem do vetor eficiência de 99%. Foram realizadas quadruplicatas de reações de clivagem para obter-se uma quantidade suficiente de vetor clivado para posterior clonagem (Figura 6).



**Figura 6- Clivagem do vetor pGEX-TEV** Gel de agarose 1% corado com GelRed.(1) pGEX-TEV íntegro, (2-5) pGEX-TEV clivado com endonuclease de restrição *Xho* I.

### 3.2.2 Clonagem por recombinação *in vivo*

A clonagem da sequência parcial codificadora da proteína recMcCHD por recombinação *in vivo* foi confirmada através de PCR de colônia, utilizando iniciadores específicos do vetor pGEX-TEV. O resultado obtido na clonagem foi de 1 colônia recombinante no total de 60 colônias transformantes (Figuras 7).

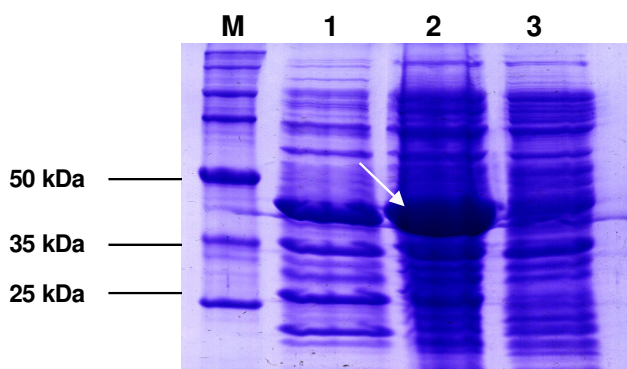


**Figura 7- PCR de colônia da seqüência recMcCHD.** Gel de agarose 1,5% corado com GelRed dos produtos de amplificação obtidos a partir da clonagem em pGEX-TEV. (1-49 e 51-59) colônias não-recombinantes, (50) a colônia contendo o plasmídeo recombinante (seta), (60) o controle positivo, (61) controle negativo da PCR (sem adição de DNA), (M)- marcador de tamanho dos fragmentos de DNA.

### 3.3 Expressão da proteína recMcCHD em *E. coli*

O vetor recombinante foi utilizado para expressão da proteína-alvo em fusão com a GST em células de *E. coli* BL21 *Codon Plus* RIL. A melhor

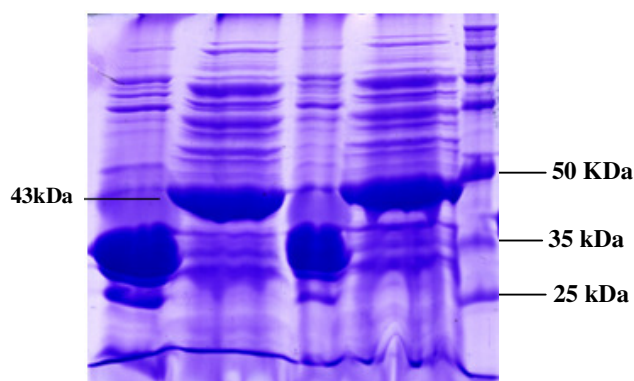
condição de expressão para a proteína recMcCHD foi de indução com 0,1 mM de IPTG por 3h a 37°C. A proteína de fusão apresentou a massa molecular de 43 kDa conforme mostra a figura 8 (seta).



**Figura 8- Análise eletroforética de extratos proteicos de células de *E. coli* BL21 *Codon Plus RIL* expressando a proteína recMcCHD.** (1) cultura não-induzida com IPTG; (2) cultura induzida com 3 h a 37°C na concentração 0,1mM IPTG (43 kDa) seta, (3) cultura induzida 16-18h a 37°C na concentração 0,1mM IPTG. As culturas foram submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida-SDS 12% e a proteína expressa visualizada por coloração com *Coomassie blue*. A mobilidade do marcador de peso molecular está assinalada.

### 3.3.1 Solubilização da proteína recMcCHD

A proteína recombinante foi observada principalmente na fração insolúvel e somente após o tratamento com o detergente sarcosil esta se tornou solúvel. A melhor condição de solubilização escolhida para a proteína recMcCHD foi de 0,5% de sarcosil (Figura 9).

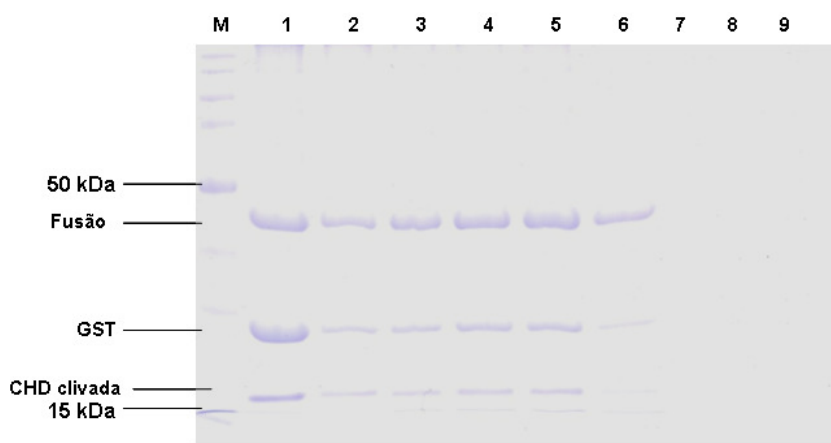


**Figura 9- Análise eletroforética de extratos celulares da proteína recMcCHD após tratamento com sarcosil e separação das frações solúveis e insolúveis, sobrenadante e pellet respectivamente por centrifugação.** (1-2) extrato das células tratadas com 0,5% de sarcosil, pellet e sobrenadante, (3-4) extrato células tratadas com 1% de sarcosil, pellet e sobrenadante. Os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida-SDS 12% e visualizados por coloração com *coomassie blue*. A mobilidade do marcador de peso molecular está assinalada.

### 3.3.2 Purificação da proteína recMcCHD

A proteína recMcCHD em fusão com a GST foi purificada por cromatografia de afinidade conforme descrito no item 2.3.2. A purificação da proteína CHD apresentou um rendimento de aproximadamente 2 mg da proteína de fusão por litro de cultura. A eficiência da clivagem para as condições estabelecidas foi parcial, conforme a análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. (Figura 10).

Devido à eficiência da clivagem com a protease TEV ter sido parcial, porções de gel contendo a proteína CHD livre (~17 kDa) da porção GST foram excisadas e processadas para a imunização de um coelho e produção do anti-soro específico conforme descrito no item 2.4.

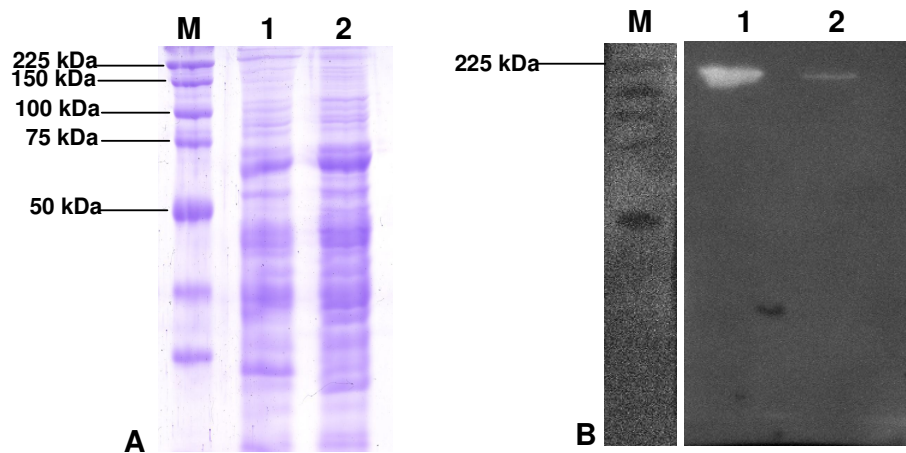


**Figura 10- Análise eletroforética de extratos proteicos de recMcCHD após purificação por cromatografia de afinidade com a resina *Gluathione Sepharose 4B* (GE Healthcare) e clivagem com a protease TEV para liberação da porção GST.** (1-6) extratos da proteína cromodomínio-helicase (proteína de fusão: 43 kDa; recMcCHD clivada: 17 kDa). (7-9) PBS após as eluições. Os extratos proteicos foram submetidos à SDS-PAGE12% e visualizados por coloração com *coomassie blue*. A mobilidade do marcador de peso molecular está assinalada.

### 3.4 Análise da expressão da proteína McCHD em extratos proteicos de *M. corti*

A análise da expressão diferencial da proteína McCHD em extratos de tetratrídeos e vermes estrobilizados foi realizado por imunoblot conforme descrito no item 2.5. O soro anti-McCHD obtido permitiu a confirmação da expressão diferencial da proteína CHD, a qual estaria representada pela massa molecular acima de 200 kDa, conforme o esperado para proteínas da família

CHD nativas, em extrato de tetratrídeos, comparado com um baixo nível de expressão no extrato de vermes estrobilizados (Figura 11).



**Figura 11- Análise da expressão diferencial da proteína McCHD em extratos de tetratrídeos e vermes estrobilizados de *M. corti*.** Em A, SDS-PAGE12% e visualização dos extratos proteicos de *M. corti* por coloração com *coomassie blue*. Em B, *western blot* mostrando a expressão diferencial da proteína McCHD (~200 kDa) nos extratos de *M. corti*. Em 1 e 2, extrato de tetratrídeos e de vermes estrobilizados, respectivamente. A mobilidade do marcador de peso molecular está assinalada.



## 4 Discussão

A caracterização de proteínas diferencialmente expressas durante o desenvolvimento de *M. corti* é uma importante etapa para a melhor compreensão, desde aspectos biológicos básicos do parasito, até mecanismos moleculares utilizados para o desenvolvimento deste. O estabelecimento de um modelo celular de platelmintos parasitas é de grande importância para os estudos em nível celular da ação de drogas anti-helmínticas, dos processos fisiológicos do desenvolvimento e de aspectos moleculares, como rotas de sinalização, regulação da expressão gênica e interações com o sistema imune hospedeiro. Visto que *M. corti* é um bom modelo para o estudo destes diversos aspectos da biologia de cestódeos, o uso deste organismo torna-se interessante e aplicável (Markoski *et al.*, 2003; Saldana *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2010; Mishra *et al.*, 2011).

A proteína McCHD analisada neste estudo está potencialmente envolvida no processo desenvolvimento de *M. corti*, e faz parte de uma lista extensa de proteínas que apresentaram expressão diferencial e que teve sua origem na construção de bibliotecas de cDNAs subtraídas de *M. corti* (Bizarro *et al.*, 2005). O número de acesso no NCBI referente à sequência parcial de cDNA é CX864854. A seleção do alvo escolhido foi baseada na função conservada do mesmo e no seu envolvimento em rotas de controle de ciclos e proliferação celular.

Proteínas CHDs nativas apresentam altas massas moleculares, em média acima de 200 kDa sendo constituídas de moléculas de DNA maiores que 6 kb. A amplificação do segmento completo codificador desta proteína é dificilmente obtida com sucesso, devido a dificuldades de purificação e manipulação de grandes moléculas DNAs. A amplificação de um segmento parcial de cDNA de correspondente à 440 pb, referente à sequência N-terminal nativa, foi obtida com sucesso. Este segmento corresponde a 147 aminoácidos da região N-terminal de uma proteína CHD nativa, e a partir de uma análise utilizando a ferramenta *Search for Conserved Domain*, disponível *on line* em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, foi possível identificar que a sequência parcial McCHD utilizada neste estudo possui a região com os dois

cromodomínios. Devido à sequência utilizada neste estudo conter somente a região com os cromodomínios, o qual é conservado entre a família das proteínas CHDs (Hall *et al.*, 2007), não foi possível caracterizar a qual subfamília a proteína McCHD pertence. Para tal caracterização, seriam necessárias outras abordagens metodológicas as quais estão em perspectiva para a continuidade deste estudo.

A clonagem da sequência codificadora parcial da proteína recMcCHD foi realizada por recombinação homóloga *in vivo*. Essa metodologia foi utilizada devido a sua eficiência e praticidade, sem a necessidade de subclonagem dos fragmentos em diferentes plasmídeos. Além disso, a obtenção de clones com produtos corretos e com boa eficiência é obtida com sucesso com a utilização de apenas 25 nucleotídeos de homologia com o vetor, os quais são adicionados em cada extremidade dos fragmentos clonados. (Parrish *et al.*, 2004). A sequência alvo desse estudo teve oligonucleotídeos projetados com 50 nucleotídeos de homologia com o vetor, os quais permitiram o sucesso da clonagem desta sequência no vetor de expressão pGEX-TEV modificado em nosso laboratório. Esse vetor possui um promotor forte (*tac*) que permite um elevado nível de transcrição da sequência clonada e ser fortemente regulado para minimizar cargas metabólicas durante a multiplicação da célula hospedeira (Weickert *et al.*, 1996). Além disso, a expressão da proteína de interesse em fusão com a GST de *Schistosoma japonicum* (Smith *et al.*, 1988), torna possível a sua purificação a partir de extratos de *E. coli*. Este vetor foi modificado inserindo-se o sítio de clivagem da protease TEV (Vargas *et al.*, 2009), o que viabiliza a liberação da proteína de interesse expressa como fusão com GST por clivagem com a protease TEV, em substituição a protease trombina, reduzindo os custos da produção de proteínas recombinantes, pois a TEV é produzida em nosso laboratório, utilizando vetor pRK 508 TEV (Kapust & Waugh, 1999) que contém sua sequência codificadora clonada.

A expressão da proteína recombinante foi realizada em células de *E. coli* BL21 *Codon Plus* RIL, as quais foram capazes de induzir a expressão da proteína deste estudo em quantidades satisfatórias. Essa linhagem foi utilizada por conter um plasmídeo que possui cópias extras de genes de tRNAs argU, ileY, e leuW que reconhecem códons AGA/AGG, AUA E CUA, respectivamente (Carstens *et al.*, 2001). A disponibilidade destes tRNAs, que frequentemente

limitam a tradução de proteínas heterólogas, permitiu a eficiência da expressão da proteína recombinante nesta linhagem.

A superexpressão de proteínas em um sistema heterólogo conduz a um problema comum: a formação de corpos de inclusão e, conseqüentemente, a insolubilidade de certas proteínas. A proteína recombinante deste estudo mostrou-se insolúvel após a lise das células. A insolubilidade pode ter sido gerada por inúmeros fatores, como a auto-agregação de intermediários conformacionais e a agregação com os componentes da membrana plasmática durante ou após a lise da célula (Frankel *et al.*, 1991). Em vista disso, foi utilizado o detergente iônico sarcosil, que ajuda a solubilizar as proteínas através de uma desnaturação parcial e que tem sido amplamente utilizado para a solubilização de proteínas fusionadas a GST (Frangioni *et al.*, 1993; Tao *et al.*, 2010; Park DW *et al.*, 2011).

Utilizando o pGEX-TEV foi possível a produção e purificação da proteína recMcCHD com o rendimento de aproximadamente 2 mg de proteína recombinante por litro de cultura. O baixo rendimento da purificação foi devido à ineficiência da clivagem da proteína de fusão com a protease TEV, e porque a proteína recMcCHD clivada se ligou diretamente à resina *glutathione-sepharose* 4B, sendo necessário o uso de agentes desnaturantes para poder eluí-la da resina. Em virtude deste baixo rendimento, bandas contendo a proteína recMcCHD livre da porção GST foram excisadas do gel de poliacrilamida após SDS-PAGE, emulsionadas com adjuvante de Freund para imunização do coelho. A imunização do coelho mostrou a capacidade desta proteína induzir resposta imunológica humoral, produzindo anti-soro específico.

A reatividade de uma proteína de aproximadamente 200 kDa nos experimentos de imunoblot é compatível com o tamanho estimado para a proteínas CHDs nativas (Hall *et al.*, 2007; Yoshimura *et al.*, 2010). A caracterização preliminar do padrão de expressão mostrou que a proteína McCHD apresenta expressão diferencial em larvas e vermes adultos de *M. corti*, sendo mais elevada em tetratirídeos. A expressão elevada desta proteína neste estágio de desenvolvimento era esperada, visto que vários estudos têm demonstrado o envolvimento das proteínas CHDs em uma variedade de processos celulares, incluindo montagem da cromatina (Smith & Petterson, 2005; Marfella *et al.*, 2007), regulação da transcrição (Belden *et al.*, 2011),

reparo do DNA (Larsen *et al.*, 2010; Smeenk *et al.*, 2010), replicação do DNA, desenvolvimento e diferenciação celular (Jacobs-McDaniels & Albertson, 2011; Polo *et al.*, 2010; Tsukiyama 2002; Urquhart *et al.*, 2011), além de confirmar os dados da hibridização subtrativa (Bizarro *et al.*, 2005). Estes dados assinalam o possível envolvimento da McCHD durante o processo de estrobilização de *M. corti*.

A determinação do padrão de expressão espaço-temporal da proteína McCHD através de experimentos de imunolocalização nos estágios larvais e adulto de *M. corti* está em perspectiva, assim como uma análise do nível transcricional desta utilizando para isso PCR em tempo real (RT-qPCR). Outra abordagem em perspectiva para o estudo da McCHD é a sua caracterização funcional. Para realizar os ensaios de caracterização funcional da McCHD, será utilizada uma metodologia de purificação da proteína nativa a partir de extratos protéicos de tetratídeos. A proteína será purificada por imunoafinidade em colunas com o anticorpo específico imobilizado. Posteriormente, pretende-se testar a atividade ATPásica *in vitro*, a qual é descrita para todas as proteínas CHD (Hall *et al.*, 2007), e também seqüenciar a proteína McCHD por espectrometria de massas, visando identificar a qual subfamília a proteína McCHD é pertencente, e deste modo, poder então realizar ensaios funcionais específicos.

A caracterização de outros genes e proteínas diferencialmente expressos em *M. corti*, também será realizada, a fim de identificar e caracterizar tanto a McCHD como outras proteínas como marcadores moleculares de desenvolvimento de *M. corti*. Com a identificação de marcadores moleculares de desenvolvimento de *M. corti* espera-se obter informações sobre os mecanismos moleculares determinantes da estrobilização que, devido à conservação evolutiva (Koziol *et al.*, 2009), deverão ser válidos não só para *M. corti*, mas também para as tênias em geral. Tais marcadores poderão também constituir alvos interessantes para o futuro desenvolvimento de drogas anti-helmínticas mais eficazes contra parasitos cestódeos.

## 5 Referências bibliográficas

Abdybekova AM, Torgerson PR (2011) Frequency distributions of helminths of wolves in Kazakhstan. *Vet Parasitol*, doi:10.1016/j.vetpar.2011.09.004

Alvarez JI, Mishra BB, Gundra UM, Mishra PK, Teale JM (2010) *Mesocestoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology* **137**: 359-372

Barrett NJ, Smyth JD, Ong SJ (1982) Spontaneous sexual differentiation of *Mesocestoides corti* tetrathyridia in vitro. *Int J Parasitol* **12**: 315-322

Belden WJ, Lewis ZA, Selker EU, Loros JJ, Dunlap JC (2011) CHD1 remodels chromatin and influences transient DNA methylation at the clock gene frequency. *PLoS Genet* **7**: e1002166

Bizarro CV, Bengtson MH, Ricachenevsky FK, Zaha A, Sogayar MC, Ferreira HB (2005) Differentially expressed sequences from a cestode parasite reveals conserved developmental genes in platyhelminthes. *Mol Biochem Parasitol* **144**: 114-118

Boyce W, Shender L, Schultz L, Vickers W, Johnson C, Ziccardi M, Beckett L, Padgett K, Crosbie P, Sykes J (2011) Survival analysis of dogs diagnosed with canine peritoneal larval cestodiasis (*Mesocestoides* spp.). *Vet Parasitol* **180**: 256-261

Brehm K (2010) The role of evolutionarily conserved signalling systems in *Echinococcus multilocularis* development and host-parasite interaction. *Med Microbiol Immunol* **199**: 247-259

Brehm K, Spiliotis M, Zavala-Góngora R, Konrad C, Frosch M (2006) The molecular mechanisms of larval cestode development: first steps into an unknown world. *Parasitol Int* **55 Suppl**: S15-21

Britos L, Domínguez L, Ehrlich R, Marín M (2000) Effect of praziquantel on the strobilar development of *Mesocestoides corti* in vitro. *J Helminthol* **74**: 295-299

Bružinskaitė-Schmidhalter R, Sarkūnas M, Malakauskas A, Mathis A, Torgerson PR, Deplazes P (2011) Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in Lithuania. *Parasitology*: 1-8

Cabrera G, Espinoza I, Kemmerling U, Galanti N (2010) *Mesocestoides corti*: morphological features and glycogen mobilization during in vitro differentiation from larva to adult worm. *Parasitology* **137**: 373-384

Carstens P, Bonnardel J, Allen R, Waesche A (2001) High-level expression of heterologous proteins in *E. coli*. *Strategies* **14**: 50-52

Chandler AC. (1942) First record of a case of human infection with tapeworms

of the genus mesocestoides. *Am J Trop Med* **22**: 493-497

Delmas V, Stokes DG, Perry RP (1993) A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2414-2418

Espinoza I, Galindo M, Bizarro CV, Ferreira HB, Zaha A, Galanti N (2005) Early post-larval development of the endoparasitic platyhelminth *Mesocestoides corti*: trypsin provokes reversible tegumental damage leading to serum-induced cell proliferation and growth. *J Cell Physiol* **205**: 211-217

Etges FJ, Marinakis V (1991) Formation and excretion of calcareous bodies by the metacestode (*Tetrathyridium*) of *Mesocestoides vogae*. *J Parasitol* **77**: 595-602

Frangioni JV, Neel BG (1993) Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* **210**: 179-187

Frankel S, Sohn R, Leinwand L (1991) The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 1192-1196

Fuentes MV, Galán-Puchades MT, Malone JB (2003) Short report: a new case report of human *Mesocestoides* infection in the United States. *Am J Trop Med Hyg* **68**: 566-567

Gallas M, Silveira EF (2011) *Mesocestoides* sp. (Eucestoda, Mesocestoididae) parasitizing four species of wild felines in Southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* **20**: 168-170

Garcia LS, Bruckner DA (1997) *Diagnostic Medical Parasitology*. 3ed Washington, ASM Press

Gleason NN, Healy GR (1967) Report of a case of *Mesocestoides* (Cestoda) in a child in Missouri. *J Parasitol* **53**: 83-84

Gundra UM, Mishra BB, Wong K, Teale JM (2011) Increased disease severity of parasite infected TLR2<sup>-/-</sup> mice is correlated with decreased CNS inflammation and reduced numbers of cells with alternatively activated macrophage phenotypes in a murine model of neurocysticercosis. *Infect Immun* **79**: 2586-96

Hall JA, Georgel PT (2007) CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochem Cell Biol* **85**: 463-476

Hoeppli, R. J. C (1925) *Mesocestoides corti*, a new species of cestódeo from mouse. *J of Parasitol* **12**: 91-96

Jacobs-McDaniels NL, Albertson RC (2011) Chd7 plays a critical role in

controlling left-right symmetry during zebrafish somitogenesis. *Dev Dyn* **240**: 2272-2280

Kapust RB, Waugh DS (1999) Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* **8**: 1668-1674

Kawamoto F, Fujioka H, Kumada N (1986) Studies on the post-larval development of cestodes of the genus *Mesocestoides*: trypsin-induced development of *M. lineatus* in vitro. *Int J Parasitol* **16**: 333-340

Kemmerling U, Cabrera G, Campos EO, Inestrosa NC, Galanti N (2006) Localization, specific activity, and molecular forms of acetylcholinesterase in developmental stages of the cestode *Mesocestoides corti*. *J Cell Physiol* **206**: 503-509

Kozioł U, Costábile A, Domínguez MF, Iriarte A, Alvite G, Kun A, Castillo E (2011) Developmental expression of high molecular weight tropomyosin isoforms in *Mesocestoides corti*. *Mol Biochem Parasitol* **175**: 181-191

Kozioł U, Domínguez MF, Marín M, Kun A, Castillo E (2010) Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm. *Front Zool* **7**: 22

Kozioł U, Lalanne AI, Castillo E (2009) Hox genes in the parasitic platyhelminthes *Mesocestoides corti*, *Echinococcus multilocularis*, and *Schistosoma mansoni*: evidence for a reduced Hox complement. *Biochem Genet* **47**: 100-116

Köhler C, Aichinger E (2010) Antagonizing Polycomb group-mediated gene repression by chromatin remodelers. *Epigenetics* **5**: 20-23

Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **5259**: 680-5

Lalanne AI, Britos L, Ehrlich R, Castillo E (2004) *Mesocestoides corti*: a LIM-homeobox gene upregulated during strobilar development. *Exp Parasitol* **108**: 169-175

Larsen DH, Poinsignon C, Gudjonsson T, Dinant C, Payne MR, Hari FJ, Danielsen JM, Menard P, Sand JC, Stucki M, Lukas C, Bartek J, Andersen JS, Lukas J (2010) The chromatin-remodeling factor CHD4 coordinates signaling and repair after DNA damage. *J Cell Biol* **190**: 731-740

Laschuk A, Monteiro KM, Vidal NM, Pinto PM, Duran R, Cerveñanski C, Zaha A, Ferreira HB (2011) Proteomic survey of the cestode *Mesocestoides corti* during the first 24 hours of strobilar development. *Parasitol Res* **108**: 645-656

Li B, Carey M, Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**: 707-719

- Lin JJ, Lehmann LW, Bonora G, Sridharan R, Vashisht AA, Tran N, Plath K, Wohlschlegel JA, Carey M (2011) Mediator coordinates PIC assembly with recruitment of CHD1. *Genes Dev*, doi:10.1101/gad.17554711
- Loos-Frank B (1991) One or two intermediate hosts in the life cycle of Mesocestoides (Cyclophyllidea, Mesocestoididae)? *Parasitol Res* **77**: 726-728
- Marfella CG, Imbalzano AN (2007) The Chd family of chromatin remodelers. *Mutat Res* **618**: 30-40
- Markoski MM, Bizarro CV, Farias S, Espinoza I, Galanti N, Zaha A, Ferreira HB (2003) In vitro segmentation induction of Mesocestoides corti (Cestoda) tetrathyridia. *J Parasitol* **89**: 27-34
- Markoski MM, Trindade ES, Cabrera G, Laschuk A, Galanti N, Zaha A, Nader HB, Ferreira HB (2006) Praziquantel and albendazole damaging action on in vitro developing Mesocestoides corti (Platyhelminthes: Cestoda). *Parasitol Int* **55**: 51-61
- Minelli A, Fusco G (2004) Evo-devo perspectives on segmentation: model organisms, and beyond. *Trends Ecol Evol* **19**: 423-429
- Mishra BB, Gundra UM, Teale JM (2011) STAT6<sup>-/-</sup> mice exhibit decreased cells with alternatively activated macrophage phenotypes and enhanced disease severity in murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol* **232**: 26-34
- Novak M (1972) Gonadectomy and the development of polycephalic tetrathyridia of Mesocestoides corti (Cestoda: Cyclophyllidea) in rodents. *Canadian Journal of Parasitology*, **7**: 44-50
- Olson PD, Littlewood DT, Bray RA, Mariaux J (2001) Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Mol Phylogenet Evol* **19**: 443-467
- Olson PD, Tkach VV (2005) Advances and trends in the molecular systematics of the parasitic Platyhelminthes. *Adv Parasitol* **60**: 165-243
- Ong SJ, Smyth JD (1986) Effects of some culture factors on sexual differentiation of Mesocestoides corti grown from tetrathyridia in vitro. *Int J Parasitol* **16**: 361-368
- Park DW, Kim SS, Nam MK, Kim GY, Kim J, Rhim H (2011) Improved recovery of active GST-fusion proteins from insoluble aggregates: solubilization and purification conditions using PKM2 and HtrA2 as model proteins. *BMB Rep* **44**: 279-284
- Parrish JR, Limjindaporn T, Hines JA, Liu J, Liu G, Finley RL (2004) High-throughput cloning of Campylobacter jejuni ORFs by in vivo recombination in Escherichia coli. *J Proteome Res* **3**: 582-586



- Peel A, Akam M (2003) Evolution of segmentation: rolling back the clock. *Curr Biol* **13**: R708-710
- Polo SE, Kaidi A, Baskcomb L, Galanty Y, Jackson SP (2010) Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *EMBO J* **29**: 3130-3139
- Saldana J, Marin M, Fernandez C, Dominguez L (2003) The toxicity of praziquantel against *Mesocestoides vogae* (syn. *M. corti*) tetrathyridia can be assessed using a novel in vitro system. *Parasitol Res*; **89**: 467–72
- Shimono Y, Murakami H, Kawai K, Wade PA, Shimokata K, Takahashi M (2003) Mi-2 beta associates with BRG1 and RET finger protein at the distinct regions with transcriptional activating and repressing abilities. *J Biol Chem* **278**: 51638-51645
- Smeenk G, Wiegant WW, Vrolijk H, Solari AP, Pastink A, van Attikum H (2010) The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage. *J Cell Biol* **190**: 741-749
- Smith CL, Peterson CL (2005) ATP-dependent chromatin remodeling. *Curr Top Dev Biol* **65**: 115-148
- Smith DB, Johnson KS (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40
- Soldatova AP (1944) A Contribution to the study of the development cycle in the cestode *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1982). *Annals di Facoltà di Medicina Veterinaria*. Pisa, **19**: 325-339
- Soulsby E JL (1965) Textbook of Veterinary Clinical Parasitology. Vol 1. Helminths Philadelphia, F.A. Davis Company
- Tao H, Liu W, Simmons BN, Harris HK, Cox TC, Massiah MA (2010) Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *Biotechniques* **48**: 61-64
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.1979. *Biotechnology* **24**: 145-149
- Tsukiyama T (2002) The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 422-429
- Urquhart AJ, Gatei M, Richard DJ, Khanna KK (2011) ATM mediated phosphorylation of CHD4 contributes to genome maintenance. *Genome Integr* **2**: 1
- Vargas, DM, Monteiro, KM, Teichmann, A, Zaha, A, Ferreira, HB (2009)

Characterization of 14-3-3 zeta2 Isoform from *Echinococcus granulosus* Larval Stage. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2009, Águas de Lindóia. Livros de Resumos da XXXVIII Reunião Anual da SBBq, 2009.

Weickert MJ, Doeherty DH, Best EA, Olins PO (1996) Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, **7**: 494-499

Yoshimura S, Yoshimi T, Ohkawa Y, Azuma M, Tachibana T (2010) A rat monoclonal antibody against the chromatin remodeling factor CHD5. *Hybridoma (Larchmt)* **29**: 63-66

Zaleśny G, Hildebrand J (2011) Molecular identification of *Mesocestoides* spp. from intermediate hosts (rodents) in central Europe (Poland). *Parasitol Res*, DOI 10.1007/s00436-011-2598-7