

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

**Estudo da expressão das proteínas cromodomínio-helicase e SET/TAF- β
durante o processo de estrobilização de *Mesocestoides corti***

Dissertação de Mestrado

Caroline Borges Costa

Porto Alegre, abril de 2013.

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

Estudo da expressão das proteínas cromodomínio-helicase e SET/TAF-1β durante o processo de estrobilização de *Mesocestoides corti*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Caroline Borges Costa

Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira
Coorientadora: Dr^a. Karina Mariante Monteiro

Porto Alegre, abril de 2013.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia da UFRGS e no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, sendo financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos

Agradeço ao professor Henrique B. Ferreira pela orientação desde o período em que eu era iniciação científica, pelo seu apoio, confiança e incentivos dedicados durante a realização deste trabalho.

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

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

Aos professores Dr. Rogério Margis e Dr. Diego Bonatto, por participarem da minha comissão de acompanhamento, pelas sugestões e pelo auxílios dedicados.

As professoras Dra. Vera Lúcia da Silva Valente Gaiesky e Dra. Marilise Brittes Rott e aos professores Dr. Rogério Margis e Dr. Charley Staats (membro suplente) por aceitarem fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

As minhas eternas amigas, Daiani e Edileuza, obrigada por me estarem sempre ao meu lado, por me ouvir, por partilhar e compartilhar muitos momentos de alegrias. Obrigada por fazerem parte da minha vida e a tornarem ela tão agradável e valiosa.

A todos os colegas dos laboratórios 204, 206, 210 pela amizade e apoio e aos colegas que não estão mais no lab, Alice (minha primeira mãe científica), 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.

Aos professores do PPGBCM pelos ensinamentos e aprendizagens que foram transmitidos.

Aos secretários do PPGBCM Sílvia e Luciano, pela parceria e auxílio.

Sumário

Agradecimentos	4
Lista de Abreviaturas.....	7
Lista de figuras.....	8
Resumo	10
1 Introdução.....	12
1.1 <i>Mesocestoides corti</i> : modelo de estudo para o desenvolvimento de cestódeos	12
1.2 Marcadores de desenvolvimento em cestódeos	15
1.3 Genes e proteínas de <i>M. corti</i> como potenciais marcadores moleculares do desenvolvimento de cestódeos.....	16
1.4 Uma cromodomínio-helicase e uma SET/TAF-I β como potenciais proteínas marcadoras de desenvolvimento de <i>M. corti</i>	17
2 Justificativas e objetivos.....	21
3 Materiais e métodos.....	23
3.1.1 Manutenção de estoques de tetratirídeos <i>in vivo</i>	23
3.1.2 Cultivo <i>in vitro</i> de tetratirídeos	23
3.1.3 Indução da estrobilização de tetratirídeos	24
3.1.4 Preparação de extratos proteicos de <i>M. corti</i>	24
3.2 Análise eletroforética de DNA e RNA em géis de agarose	25
3.3 Análise eletroforética de proteínas em géis de poliacrilamida-SDS	25
3.4 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	26
3.5 Amplificação de sequências de cDNA e clonagem em vetor de expressão	26
3.6 Expressão e solubilização das proteínas recombinantes recMcCHD	28
e recMcSET/TAF	28
coloração com <i>coomassie blue</i>	28
3.7 Purificação das proteínas recombinantes recMcCHD e recMcSET/TAF.....	28
3.8 Produção de antissoros policlonais monoespecíficos.....	29
3.9 Imunoblots	29
3.10 Imunofluorescência.....	30
3.11 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	31
4 Resultados.....	34

4.1 Extrações de RNA, amplificação das sequências-alvo e clonagem em vetor de expressão	34
4.2 Expressão e solubilização das proteínas recombinantes recMcCHD	37
e recMcSET/TAF	37
4.3 Purificação das proteínas recMcCHD e recMcSET/TAF e produção de antissoros policlonais.....	39
4.4 Análise da expressão das proteínas McCHD e McSET/TAF em extratos proteicos de <i>M. corti</i>	41
4.5 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	45
5 Discussão	50
6 Conclusões	63
7 Perspectivas	64
8 Referências.....	65
Curriculum Vitae resumido	78

Lista de Abreviaturas

- BAEE:** 10⁵ unidades de benzoilarginina-etil-éter
- cDNA:** DNA complementar
- 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
- McCHD:** proteína cromodomínio-helicase de *Mesocestoides corti*
- McSET/TAF:** proteína SET/TAF de *Mesocestoides corti*
- 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 *M. corti*
- recMcSET/TAF:** proteína SET/TAF recombinante de *M. 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 fusão dos iniciadores
- UV:** luz ultravioleta

Lista de figuras

Figura 1: Representação do ciclo vital provável de <i>Mesocestoides corti</i>	13
Figura 2: Representação esquemática da estrutura básica das proteínas CHDs.....	18
Figura 3: Representação esquemática da estrutura básica de uma proteína SET/TAF-I β	20
Figura 4: Extrações de RNA de <i>M. corti</i>	34
Figura 5: Representação esquemática da sequência parcial codificadora da proteína McCHD e análises eletroforéticas de amplicons da sequência codificadora da recMcCHD com os iniciadores primários e secundários	35
Figura 6: Representação esquemática da sequência parcial codificadora da proteína McSET/TAF e análises eletroforéticas de amplicons da sequência codificadora da recMcSET/TAF com os iniciadores primários e secundários..	36
Figura 7: Análise eletroforética dos produtos de amplificação de PCRs de colônia das clonagens das sequências da recMcCHD e recMcSET/TAF	37
Figura 8: Análise eletroforética de extratos protéicos de células de <i>E. coli</i> BL21 Códon Plus RIL expressando a proteína recMcCHD e após tratamento com sarcosil e separação das frações solúveis e insolúveis, sobrenadante e pellet respectivamente por centrifugação.	38
Figura 9: Análise eletroforética de extratos protéicos de células de <i>E. coli</i> BL21 Códon Plus RIL expressando a proteína recMcSET/TAF e após tratamento com sarcosil e separação das frações solúveis e insolúveis, sobrenadante e pellet respectivamente por centrifugação.	38
Figura 10: Análise eletroforética de extratos proteicos de recMcCHD após purificação por cromatografia de afinidade com a resina Gluathione Sepharose 4B e clivagem com a protease TEV para liberação da porção GST	40
Figura 11: Análise eletroforética de extratos proteicos de recMcSET/TAF após purificação por cromatografia de afinidade com a resina Gluathione Sepharose 4B e clivagem com a protease TEV para liberação da porção GST	40
Figura 12: Análise da expressão das proteínas McCHD e McSET/TAF ao longo do desenvolvimento de <i>M. corti</i>	41

Figura 13: Controles da análise do padrão de expressão das proteínas McCHD e McSET/TAF em secções longitudinais de TT, 24h-Ind, 72h-PI e VE de <i>M. corti</i> , utilizando microscopia confocal	42
Figura 14: Análise do padrão de expressão da proteína McCHD em secções longitudinais de TT, 24h-Ind, 72h-PI e VE de <i>M. corti</i> , utilizando microscopia confocal	43
Figura 15: Análise do padrão de expressão da proteína McSET/TAF em secções longitudinais de TT, 24h-Ind, 72h-PI e VE de <i>M. corti</i> , utilizando microscopia confocal.....	44
Figura 16: Análise eletroforética dos amplicons obtidos por RT-PCR dos genes escolhidos para genes de referência.....	45
Figura 17: Análise eletroforética dos amplicons obtidos por RT-PCR dos genes McCHD e McSET/TAF utilizados em RT-qPCR.....	45
Figura 18: Análise da estabilidade de expressão dos genes potenciais de referência pelo programa geNorm.....	46
Figura 19: Determinação do número ótimo de genes a serem utilizados como controles na normalização dos dados de expressão gênica nos diferentes estágios de desenvolvimento de <i>M. corti</i>	47
Figura 20: Quantificação dos níveis de expressão de <i>McCHD</i>	48
Figura 21: Quantificação dos níveis de expressão de <i>McSET/TAF</i>	49

Resumo

A cromodomínio-helicase (CHD) e a SET/TAF-I β (chaperona de histonas) são proteínas conhecidas por estarem envolvidas em processos de remodelagem de cromatina e controle da expressão gênica. Em organismos como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, camundongo e o homem, estas proteínas estão associadas ao controle de vários processos de desenvolvimento. Em *Mesocestoides corti*, um modelo de parasito cestódeo, sequências relacionadas à CHD e à SET/TAF-I β foram identificadas em uma seleção de genes diferencialmente expressos em larvas e vermes estrobilizados. Visando à identificação de marcadores moleculares de processos e estágios de desenvolvimento da Classe Cestoda, os padrões de expressão de ortólogos das proteínas CHD e SET/TAF-I β (McCHD e McSET/TAF) em *M. corti* foram investigados. Inicialmente as sequências codificadoras da McCHD e McSET/TAF foram amplificadas por RT-PCR, clonadas em vetor de expressão modificado (pGEX-TEV) e expressas em *Escherichia coli* para produção de proteínas recombinantes. Análises por imunoblot e imuno-histoquímica foram realizadas utilizando anticorpos gerados contra versões recombinantes das proteínas-alvo do estudo. Foram analisados quatro estágios de desenvolvimento de *M. corti*: larvas (tetratirídeos, TT), TT após 24h de indução ao processo de estrobilização (o qual confere o desenvolvimento da larva em adulto) (24h-Ind), TT após 72h de indução (72h-PI) e vermes estrobilizados (VE). Em imunoblots, a McCHD apresentou altos níveis de expressão em três estágios de desenvolvimento de *M. corti*: TT, 72h-PI e VE, sendo detectado um menor nível de expressão no estágio 24h-Ind quando comparado aos demais. Já a McSET/TAF apresentou um aumento gradual no seu nível de expressão após a indução (nos estágios de 24h-Ind, 72h-PI e VE), não sendo detectada em TT. Em secções longitudinais foram observados um maior nível de expressão da McCHD em estágios iniciais de desenvolvimento (TT e 24-Ind) enquanto que McSET/TAF foi observado um maior nível de expressão nos estágios intermediários e no final do desenvolvimento de *M. corti*. Para ambas as proteínas a localização foi citoplasmática e não houve diferenças de distribuição nos tecidos analisados. Para compreender melhor as diferenças encontradas nos níveis de expressão das proteínas, análises por PCR em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas para quantificação dos níveis de transcritos dos genes *McCHD* e *McSET/TAF*. Foram encontradas diferenças significativas nos níveis de expressão gênica de *McCHD* e *McSET/TAF* somente em dois estágios: o inicial (TT) e o adulto (VE), conforme análises pelo teste de Duncan. Níveis maiores de expressão gênica de ambos os genes foram encontrados no último estágio de desenvolvimento (VE) de *M. corti*. A caracterização de genes e proteínas envolvidas no processo de estrobilização de platelmintos da classe Cestoda contribuirá para o melhor entendimento de rotas do desenvolvimento de cestódeos, podendo auxiliar também na determinação de novos alvos terapêuticos para o tratamento de cestodíases.

Palavras-chave: McCHD, McSET/TAF, estrobilização, *Mesocestoides corti*, proteínas diferencialmente expressas.

Abstract

Chromodomain-helicase (CHD) and the SET/TAF-I β histone chaperone are proteins known to be implicated in processes of chromatin remodeling and regulation of gene expression associated with the control of developmental processes in different organisms, such as *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, mouse and human. In *Mesocestoides corti*, a model cestode parasite, CHD and SET/TAF-I β related sequences were isolated in a screening for genes differentially expressed in larvae (tetrathyridia) and adult worms. Aiming at identifying molecular markers of processes and stages of development of Class Cestoda, the expression patterns of *M. corti* CHD and SET/TAF-I β orthologous proteins (McCHD and McSET/TAF) were investigated. Initially, the coding sequences of McCHD and McSET/TAF were amplified by RT-PCR, cloned into a modified expression vector (pGEX-TEV) and expressed in *Escherichia coli* for recombinant proteins production. Analysis by immunoblotting and immunohistochemistry was performed using antibodies raised against recombinant versions of the proteins target the study. We analyzed four developmental stages of *M. corti*: bona fide tetrathyridia (TT), tetrathyridia 24 h after strobilation induction (24h-Ind), strobilating worms 72 h after induction (72h-PI), and fully strobilated worms (VE). Immunoblots showed high levels of expression McCHD in three developmental stages of *M. corti*: TT, 72h-PI e VE, and detected a lower level of expression in stage 24-Ind in comparison to others. The McSET/TAF showed a gradual increase in their level of expression after induction (stages of 24h-Ind, 72h-PI e VE) was not detected in TT. In longitudinal sections were observed an increased level of expression of McCHD in early stages of development (TT and 24-Ind) while McSET/TAF there was a higher level of expression in the intermediate and late stages of development of *M. corti*. Both McCHD and McSET/TAF showed a cytoplasmic location and a uniform pattern of immunostaining, no differences in distribution between the tissues. For a better understanding the differences in levels of protein expression, analysis by real-time PCR (RT-qPCR) was performed to quantify the transcript levels of genes *McCHD* and *McSET/TAF*. There were significant differences in levels of gene expression *McCHD* and *McSET/TAF* only in two stages: the initial (TT) and adult (VE), as analysis by Duncan test. Higher levels of gene expression of both genes were found in the last stage of development (VE) of *M. corti*. The characterization of genes and proteins involved in the process of strobilation flatworms of the class Cestoda contribute to a better understanding of the development of cestodes routes and may also assist in the determination of new therapeutic targets for the treatment of cestodiasis.

Key-words: McCHD, McSET/TAF, strobilation, *Mesocestoides corti*, differentially expressed protein.

1 Introdução

1.1 *Mesocestoides corti*: modelo de estudo para o desenvolvimento de cestódeos

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* pertence à ordem Cyclophyllidae, a qual é composta principalmente por parasitos de aves e mamíferos, raramente ocorrendo em répteis e anfíbios. É característica dos componentes dessa ordem a presença de 4 ventosas semi-esféricas posicionadas simetricamente em volta de uma cabeça (escólex) arredondada, que pode ser guarnecida por ganchos. *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, um 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 tetratirídeo é capaz de desenvolver-se no verme adulto, por meio do processo de estrobilização. O tetratirídeo tem tamanho de 0,5 a 2 mm de comprimento, é opaco, irregularmente pregueado e, na sua região anterior, possui um escólex bem desenvolvido, sem rostelo ou ganchos, mas com quatro ventosas elípticas. Já o verme adulto, totalmente estrobilizado, tem o tamanho de 0,5 a 1cm de comprimento, possui as proglótides nas quais devem ocorrer a maturação sexual.

O ciclo inicia-se com a ingestão de uma proglótide grávida, pelo seu primeiro hospedeiro intermediário, a qual eclodiria e levaria ao desenvolvimento do estágio larval denominado de procercóide. Em seu segundo hospedeiro intermediário ocorreria o desenvolvimento do procercóide em tetratirídeo, 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 tetratirídeo 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 estrobilar deste verme, bem como dos processos moleculares que levam à passagem da fase larval ao organismo adulto.

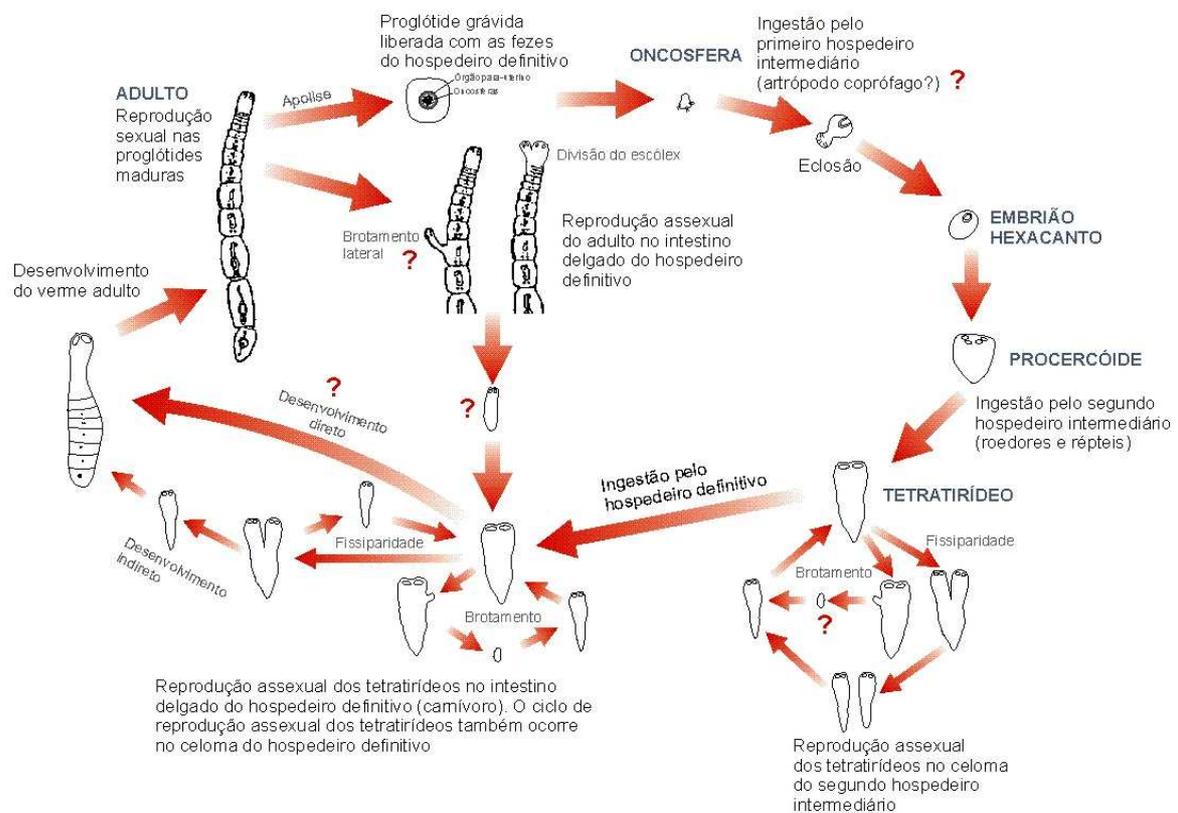


Figura 1: Representação do ciclo vital provável de *Mesocestoides corti*. O ciclo vital de *M. corti* é complexo, incluindo dois hospedeiros intermediários e um hospedeiro definitivo. O primeiro hospedeiro intermediário é um artrópode que ingere uma proglótide grávida contendo oncosferas, que eclodem e dão origem ao primeiro estágio larval. No segundo hospedeiro intermediário ocorre o desenvolvimento da fase larval de tetratirídeo, capaz de reprodução assexuada por fissionamento e brotamento. No hospedeiro definitivo, os tetratirídeos 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 H. B. Ferreira).

Espécies do gênero *Mesocestoides* apresentam uma distribuição cosmopolita, e têm 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 *et al.*, 2011; Bružinskaitė-Schmidhalter *et al.*, 2011, Zalešný & Hildebrand, 2011, Hrčková *et al.*, 2011). Na América do Sul, especificamente no Brasil, recentemente foi relatada a identificação de espécies do gênero *Mesocestoides* parasitando quatro espécies de felinos selvagens (Gallas & Silveira, 2011). Embora espécies do gênero *Mesocestoides* tenham uma ampla distribuição, infecções em seres humanos são incomuns e geralmente, facilmente 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; Mishra & Teale, 2012, 2013). 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; Garcia & Bruckner, 1997, Fuentes *et al.*, 2003).

Apesar de estudos realizados em diversos âmbitos da biologia de cestódeos (Espinoza *et al.*, 2005, Brehm K., 2010; Koziol *et al.*, 2010, 2011; Parkinson *et al.*, 2012), 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, bibliotecas de cDNA subtraídas (uma enriquecida com sequências expressas por tetratirídeos e outra enriquecida com sequências expressas por vermes adultos) foram construídas para *M. corti*, e, através de macroarranjo de DNA, foi possível identificar genes relacionados ao desenvolvimento do parasito 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 tetratídeos submetidos ou não à indução da estrobilização por tratamento com tripsina, também foi possível identificar várias proteínas diferencialmente expressas (Laschuk *et al.*, 2011).

1.2 Marcadores de desenvolvimento em cestódeos

Helmintos parasitas, assim como outros organismos multicelulares apresentam seus mecanismos de desenvolvimento evolutivamente conservados, desde invertebrados até vertebrados. Alguns destes mecanismos já estão bem caracterizados em filos mais basais, como em cnidários e esponjas. Nestes, já estão descritas as ferramentas básicas que controlam o seu desenvolvimento, que incluem hormônios peptídicos como, insulina, fatores de crescimento (IGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF) e moléculas relacionadas (Brehm *et al.*, 2010).

O estudo da biologia cestódeos e outros parasitos que apresentam ciclos vitais complexos é dificultado tanto por características intrínsecas destes organismos, como pelos potenciais riscos de contaminação para seres humanos. Contudo, muitos estudos têm sido realizados na tentativa de identificar marcadores moleculares do desenvolvimento de cestódeos. Entre estes está o estudo de Konrad *et al.*, (2003), no qual foi descrito, pela primeira vez em helmintos parasitas, a caracterização de uma tirosino-quinase receptora da família do receptor de insulina, o EmIR de *Echinococcus multilocularis*, o qual é expresso na fase larval do parasito durante a infecção do hospedeiro intermediário. Spiliotis *et al.*, (2005, 2006) caracterizaram os genes *emmpk1*, *emrad*, *emraf*, também de *E. multilocularis*, envolvidos em cascatas de sinalização celular, possivelmente controlando o crescimento e desenvolvimento deste parasito. Em *M. corti*, Lalane *et al.*, (2004) isolaram o gene *MvLim*, o qual codifica um fator de transcrição do tipo *LIM-homeobox*, cujos ortólogos de *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabdits elegans* e vertebrados contribuem para a determinação do destino celular de subtipos neuronais. Zavala-Góngora *et al.*, (2006, 2008), identificaram os genes *emtr1* e

emSmad também de *E. multilocularis*, codificadores de fatores de crescimento, ambos envolvidos em rotas de sinalização celular durante o processo de infecção do hospedeiro intermediário.

Brehm *et al.*, (2006) salientaram a importância de estudos sobre o desenvolvimento de cestódeos para a obtenção de 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.

1.3 Genes e proteínas de *M. corti* como potenciais marcadores moleculares do desenvolvimento de cestódeos

O estudo 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*, forneceu as primeiras informações mais abrangentes sobre diferenças moleculares de tetratirídeos e vermes estrobilizados. Neste trabalho vários fatores de transcrição e reguladores da estrutura da cromatina, foram descritos pela primeira vez para uma espécie de platelminto. Os fragmentos de cDNA sequenciados e analisados codificam proteínas relacionadas a componentes de maquinarias moleculares muito antigas, como o complexo SWI/SNF, com ortólogos presentes em leveduras, seres humanos e *Drosophila*. Os transcritomas analisados também apresentam sequências que codificam proteínas 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 no táxon monofilético dos neodermatas. Koziol *et al.*, (2011), também identificaram genes codificadores de diferentes isoformas de tropomiosina (TPM) em *M. corti* e descreveram uma das isoformas como marcador do desenvolvimento muscular durante a diferenciação final dos primórdios genitais de *M. corti*. Os autores também especularam a idéia de que os genes TPM e as isoformas encontradas em *M. corti*, estariam conservados em outras espécies de neodermatas.

As relações filogenéticas do filo Platyhelminthes ainda não são muito claras. Como exemplo, pode-se citar a segmentação corporal de platelmintos, na qual a ideia clássica de que esta seria uma segmentação metamérica ou secundária está sendo contestada. Tem sido proposto que esta segmentação seria uma segmentação primária ou verdadeira, a qual compartilharia uma origem monofilética com a de animais celomados, como artrópodes, anelídeos e cordados (Peel & Akam, 2003; Minelli & Fusco, 2004; Olson & Tkach, 2005). Neste contexto, a caracterização de genes e proteínas envolvidos 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 supafiléticas existentes entre platelmintos e outros grupos de metazoários.

1.4 Uma cromodomínio-helicase e uma SET/TAF-I β como potenciais proteínas marcadoras de desenvolvimento de *M. corti*

1.4.1 Cromodomínio-helicases

Cromodomínio-helicases (CHDs, de *chromodomain-helicase-DNA-binding-protein*) fazem parte de uma família diversa de proteínas, apresentam em média massas moleculares acima de 200 kDa e compartilham uma certa homologia estrutural (Hall & Georgel, 2007). A estrutura básica das CHDs é

constituída por dois cromodomínios truncados na região N-terminal, um domínio de ATPase/helicase central e um domínio de ligação ao DNA na região C-terminal (Figura 2).

CHDs estão envolvidas principalmente em processos de remodelagem de cromatina e podem estar associadas a grandes complexos enzimáticos, como o complexo SWI/SNF ou o complexo NURD, sendo descritas como ativadoras ou repressoras transcricionais (Shimono *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Smeenk *et al.*, 2010).

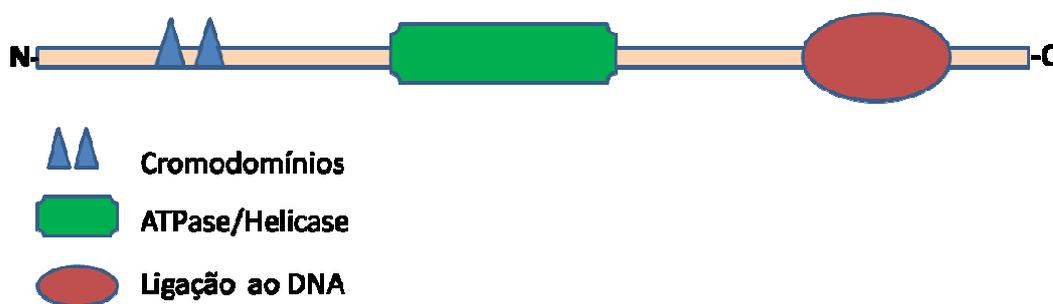


Figura 2: Representação esquemática da estrutura básica das proteínas CHDs. A sequência está representada de N-terminal para C-terminal, incluindo a distribuição dos seus domínios funcionais básicos: dois cromodomínios (triângulos) truncados na região N-terminal, um domínio ATPase/helicase central (retângulo),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

O primeiro membro da família CHD foi descoberto e caracterizado em camundongos como um regulador de promotores de genes de imunoglobulinas (Delmas *et al.*, 1993). Atualmente a família das CHDs compreende 9 membros em mamíferos, 4 membros em *D. melanogaster* e 1 único membro em *Saccharomyces cerevisiae* (Hall & Georgel, 2007; Kunert & Brehm, 2009).

Com base na estrutura básica das proteínas CHDs e em diferenças estruturais, além dos 3 domínios principais, as CHDs 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 & Georgel, 2007). Cada subfamília apresenta características estruturais específicas, o que torna possível estudar suas interações com o DNA e tentar identificar suas funções, bem como o seu envolvimento na

regulação transcricional (Köhler *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011, Sims & Wade, 2011).

1.4.2 SET/TAF-I β

A proteína SET/TAF-I β é uma chaperona de histonas, uma molécula multifuncional envolvida em processos de remodelagem da cromatina (Kato *et al.*, 2007, Gamble *et al.*, 2007) e controle de ciclo celular (Kim *et al.*, 2010, 2012; Adler *et al.*, 1997). Esta chaperona de histonas é codificada pelo gene SET, o qual também é conhecido como fator de ativação I β (TAF-I β) (Karetsou *et al.*, 2005, Seo *et al.*, 2001). O gene SET foi descrito inicialmente como um gene translocado em um caso de leucemia aguda indiferenciada humana (von Lindern *et al.*, 1992), e, posteriormente, foi demonstrado o envolvimento da proteína SET/TAF-I β em alterações da estrutura de cromatina (Kawase *et al.*, 1996).

A SET/TAF-I β pertence à família de proteínas envolvida na montagem dos nucleossomos (NAPs, *de nuclear assembly protein*) (Shikama *et al.*, 2000). Sua estrutura básica (Figura 3) consiste de um domínio NAP, o qual é conservado na família de proteínas NAP, uma extremidade N-terminal curta (24 resíduos) e uma longa cauda ácida C-terminal (Xu *et al.*, 2010). Estudos anteriores, em adenovírus, indicam o envolvimento deste domínio ácido C-terminal com as funções de alteração da cromatina (Kawase *et al.*, 1996) e de replicação do DNA (Nagata *et al.*, 1995) e, em humanos, de ligação a histonas (Muto *et al.*, 2007). Além destas funções, a SET/TAF-I β apresenta-se envolvida na indução de apoptose em estudos com células HeLa (Fan *et al.*, 2003) e na inibição da atividade da oncoproteína p53 em *D. melanogaster* (Kim *et al.*, 2012).



Figura 3: Representação esquemática da estrutura básica de uma proteína SET/TAF-I β . Está representado a sequência N-terminal para C-terminal, incluindo a distribuição dos seus domínios funcionais básicos: domínio NAP (elipse) na região N-terminal, e um domínio ácido na região C-terminal (hexágono).

As proteínas CHD e SET/TAF-I β abordadas neste estudo foram identificadas a partir de suas sequências codificadoras parciais, inicialmente evidenciadas por Bizarro *et al.*, (2005) como diferencialmente expressas em tetratirídeos e vermes estrobilizados. A sequência relacionada à CHD faz parte da biblioteca de cDNA de tetratirídeos (dp2reverse, Bizarro *et al.*, 2005), enquanto que a sequência relacionada a SET/TAF-I β faz parte da biblioteca de cDNA de vermes estrobilizados (dp2forward, Bizarro *et al.*, 2005). As sequências parciais de cDNA e as sequências parciais de aminoácidos delas derivadas estão disponíveis no banco de dados do NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/>) e seus números de acesso são CX864995.1(McCHD) e CX863520.1(McSET/TAF). A McCHD e a McSET/TAF possuem ortólogas identificadas em espécies-modelo eucarióticas, como *D. melanogaster* e *S. cerevisiae* (Bizarro *et al.*, 2005), e, em cestódeos do gênero *Echinococcus* (*E. granulosis* e *E. multilocularis*, análises sendo realizadas). Devido ao envolvimento de proteínas CHD e SET/TAF em processos de desenvolvimento e diferenciação celular em diferentes organismos (Jacobs-McDaniels & Albertson, 2011; Karetsov *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Polo *et al.*, 2010; Tsukiyama 2002; Urquhart *et al.*, 2011), estas proteínas foram escolhidas como alvos para investigação dos seus potenciais envolvimento com o processo de desenvolvimento de *M. corti*.

2 Justificativas e objetivos

Mesocestoides corti corresponde a 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). Esta espécie não apresenta algumas das principais limitações encontradas para a manipulação experimental de outras espécies de tênias, como disponibilidade restrita de material biológico, falta de sistemas de cultivo *in vitro* bem estabelecidos e maiores exigências de segurança para a manipulação de organismos potencialmente infecciosos para seres humanos.

Vários estudos têm sido realizados para caracterizar genes e proteínas envolvidos em processos de sinalização celular e interação parasito-hospedeiro de helmintos (Spiliotis *et al.*, 2006, Brehm, 2010, Monteiro *et al.*, 2010, Lorenzatto *et al.*, 2012). Entretanto, pouco ainda é conhecido sobre a biologia molecular do processo de estrobilização, o qual confere aos cestódeos a diferenciação da fase larval na de adulto.

As proteínas CHD e SET/TAF-I β apresentam-se como potenciais participantes de rotas de desenvolvimento de *M. corti* e, portanto, seus estudos neste modelo experimental podem 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 (Koziol *et al.*, 2009). Devido à conservação evolutiva, os resultados destes estudos 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 também definir marcadores moleculares de processos e estágios de desenvolvimento de *M. corti* e outros cestódeos e auxiliar na determinação de possíveis novos alvos quimioterápicos para o tratamento de cestodíases.

Sendo assim, os objetivos deste estudo estão descritos a seguir:

2.1 Objetivo geral:

O objetivo geral deste estudo é estudar os genes e as proteínas CHD e SET/TAF-I β , diferencialmente expressas durante o desenvolvimento de *M. corti*, visando à sua associação como possíveis marcadores moleculares de processos e estágios de desenvolvimento de cestódeos.

2.2 Objetivos específicos:

- (i) Clonar e expressar em *Escherichia coli* as sequências codificadoras parciais das proteínas cromodomínio-helicase (CHD) e SET/TAF-I β de *M. corti* para a produção das proteínas recombinantes correspondentes;
- (ii) Produzir antissoros específicos contra as proteínas recombinantes (recMcCHD e recMcSET/TAF), para utilização como ferramenta de análise do padrão de expressão das proteínas nativas correspondentes;
- (iii) Caracterizar o padrão de expressão espaço-temporal das proteínas McCHD e McSET/TAF durante processo de estrobilização de *M. corti*;
- (iv) Determinar genes de referência de expressão constitutiva em *M. corti* e quantificar os níveis de transcrição dos genes *McCHD* e *McSET/TAF* ao longo do desenvolvimento de *M. corti*.

3 Materiais e métodos

3.1 Manutenção *in vivo* e cultivo *in vitro* de *M. corti*

3.1.1 Manutenção de estoques de tetratirídeos *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 CO₂ e lavados em etanol 70% durante 5 min. A cavidade abdominal de cada animal foi aberta em capela de fluxo laminar vertical, com material cirúrgico esterilizado. Os tetratirídeos foram 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 proteicos conforme descritos nos itens abaixo.

Todos os procedimentos com camundongos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS e realizados de acordo com as normas estabelecidas (projeto: Estudo de Aspectos Moleculares da Biologia de platelmintos parasitas da classe Cestoda, nº 21625).

3.1.2 Cultivo *in vitro* de tetratirídeos

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, NaHCO₃, 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 gamicina

(Schering-Plough). O cultivo foi realizado em frascos de cultivo horizontal (Corning) pequenos (75 cm²) contendo 10 ml de meio. A incubação foi realizada a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂ em incubadora (Sanyo, modelo COM 175). Os tetratirídeos recém-extraídos foram cultivados por 24 h em meio-zero, e após, o meio foi substituído por McRPMI suplementado com 20% de SFB. As trocas de meio foram realizadas a cada dois dias de cultivo até atingir o estágio estrobilizado.

3.1.3 Indução da estrobilização de tetratirídeos

A indução da estrobilização de tetratirídeos *in vitro* foi realizada conforme descrito por Markoski *et al.*, (2003). Os tetratirídeos (aproximadamente 50 larvas por poço (placas de 6 poços)/3 ml de meio de cultivo por poço) eram pré-incubados em meio de cultivo com tripsina (10⁵ 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 estrobilização) os vermes completamente estrobilizados foram selecionados em estereomicroscópio. A eficiência de estrobilização foi de aproximadamente 60%.

3.1.4 Preparação de extratos proteicos de *M. corti*

Foram preparados extratos protéicos de quatro estágios de desenvolvimento de *M. corti*: tetratirídeos (TT), tetratirídeos após 24 h de indução ao processo de estrobilização (24h-Ind), vermes com 72 h após o tratamento de indução (72h-PI) e vermes estrobilizados (VE). Todas as amostras foram lavadas 10 vezes em tampão Tris-HCl 40 mM pH 7,2 antes de serem homogeneizadas em um homogeneizador de vidro, em um banho de gelo. Após, os homogeneizados foram centrifugados a 15.000 x g por 30 min a 4°C, para a separação das frações solúvel e insolúvel. O conteúdo proteico da fase solúvel foi quantificado por fluorimetria utilizando o sistema Qubit (*Quant-iT Protein Assay Kit*, Invitrogen) e analisado em SDS-PAGE 12%. Após a

quantificação, as amostras (fase solúvel) foram congeladas e armazenadas a -20°C.

3.2 Análise eletroforética de DNA e RNA em géis de agarose

Para a visualização de DNA e RNA utilizou-se a eletroforese em gel de agarose 1% e 1,5% 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 pUC18 clivado com a endonuclease de restrição *Hinf*I (Promega), segundo as instruções do fabricante.

3.3 Análise eletroforética de proteínas em géis de poliacrilamida-SDS

As análises eletroforéticas para resolução de extratos proteicos, solubilização e purificação de proteínas utilizou-se o sistema de SDS-PAGE (Laemmli, 1970) nas concentrações de 12% e de 15%. 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 β -mercaptoetanol (625 mM Tris-Cl; 0,2% azul de bromofenol; 2,3% SDS; 10% glicerol; 5% β -mercaptoetanol), para eletroforese em condições redutoras.

As estimativas de massa molecular das proteínas eram feitas por comparação com o marcador comercial *Broad Range Protein Molecular Markers* (Promega) aplicado 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.

3.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total dos quatro estágios de desenvolvimento de *M. corti* (TT, 24h-PI, 72h-PI e VE) foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Os RNAs obtidos foram tratados com DNase I livre de RNase (Fermentas), segundo as instruções do fabricante, e, depois, utilizados para a síntese da primeira fita de cDNA utilizando-se a enzima *M-MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas) e o iniciador *Oligo(dT)₁₈ primer* (Fermentas), conforme as instruções do fabricante.

3.5 Amplificação de sequências de cDNA e clonagem em vetor de expressão

A amplificação das sequências codificadoras parciais das proteínas McCHD e McSET/TAF foi realizada por RT-PCR, a partir de cDNA de *M. corti* sintetizado conforme descrito na Seção 3.4. Os cDNAs foram amplificados por PCR utilizando-se iniciadores específicos para a sequência da McCHD e da SET/TAF, cada um deles contendo também 25 nt de homólogos ao vetor de expressão (Tabela 1, iniciadores primários – recCHD e recSET/TAF). 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, recII). As PCR foram realizadas utilizando-se o *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas), seguindo as instruções do fabricante. A Tabela 1 apresenta os iniciadores utilizados para clonagem por recombinação *in vivo*.

As clonagens dos produtos de amplificação em vetor plasmidial de expressão foram feitas por recombinação *in vivo*, segundo o protocolo descrito por Parrish *et al.*, (2004). O vetor utilizado para clonagem foi o pGEX-TEV, derivado do vetor pGEX-4T-1 (Invitrogen) no qual foi inserida a sequência codificadora do sítio de clivagem para a protease TEV (Vargas *et al.*, 2009). O

DNA do vetor, replicado em células de *E. coli* XL1-*blue* (Invitrogen), foi extraído utilizando o Plasmidial Maxi Kit (Quiagen), seguindo as instruções do fabricante, e a sua quantificação foi realizada utilizando o sistema Qubit (*Quant-iT dsDNA Assay Kit*, Invitrogen). O vetor pGEX-TEV (aproximadamente 2 µg) foi linearizado por clivagem com a endonuclease de restrição *XhoI* (Promega) e defosforilado com a enzima fosfatase alcalina do camarão (SAP, GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. O pGEX-TEV clivado foi separado eletroforéticamente e purificado a partir de gel de agarose utilizando o kit de purificação de DNA GFX (GE Healthcare). Para a clonagem no pGEX-TEV foram utilizadas células de *E. coli* KC8. As células bacterianas foram transformadas com 50 ng de vetor linearizado e 50 ng dos produtos de PCR a serem clonados, em 25 µl de tampão KCM 2X (200 mM KCl, 60 mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂). Após choque térmico, as células transformadas foram incubadas em 1 ml de meio Luria Bertani (LB) a 37°C por 1 h e semeadas em meio seletivo com antibióticos. A identificação de clones recombinantes foi realizada por PCR de colônia utilizando iniciadores específicos do vetor pGEX-TEV (Tabela 1- pGEX-Alt). A extração de DNA plasmidial das colônias recombinantes foi realizada por lise alcalina (Sambrook & Russel 2001). Os plasmídeos recombinantes utilizados para posterior expressão foram sequenciados utilizando o *Kit Dyenamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences), em sequenciador automático MEGABACE 1000, conforme manual do fabricante. O clone correspondente à McSET/TAF já se encontrava disponível no laboratório sendo que as etapas de obtenção do fragmento e clonagem deste foram realizadas da mesma forma descrita acima. Ambas as sequências codificadoras parciais da McCHD e McSET/TAF foram analisadas com a ferramenta Search for *Conserved Domain*, disponível *on line* em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, para detecção de domínios funcionais das proteínas McCHD e McSET/TAF.

Tabela 1: Iniciadores utilizados para amplificação das sequências de *M. corti* e clonagem.

Oligos	Sequências *	Tm(°C)
recCHD	D: 5'-TATTTTCAGGGAGAATTCCCAGGGTACAGAACTCCAAGTGG-3'	52
	R: 5'-GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCAAACAGATTGGCACTGAACG-3'	
recSET/TAF	D: 5'-TATTTTCAGGGAGAATTCCCAGGGTATCTTGGAGAGCGTGGACT-3;	52

	R: 5' GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCAG CCAGACGTAATATCTTCG -3'	
recII	D: 5'-GACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAA-3'	60
	R: 5'-GTTCCGCGTGGATCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGAGAATTCCCGG GT-3'	
pGEX-Alt	D: 5'-CCT GGA TGC GTT CCC AAA A-3'	54
	R: 5'-CGA CAC CCG CCA ACA CC-3'	

*(D): iniciador direto; (R): iniciador reverso. As sequências nucleotídicas específicas às sequências-alvo estão demonstradas em negrito enquanto as sequências nucleotídicas idênticas ao vetor estão demonstradas em letras maiúsculas sem negrito.

3.6 Expressão e solubilização das proteínas recombinantes recMcCHD e recMcSET/TAF

Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células de *E. coli* BL21 *Codon Plus* RIL (Stratagene). As células transformadas foram multiplicadas em meio Circlegrow (MP Biomedicals) e a expressão das proteínas recombinantes recMcCHD e recMcSET/TAF, em fusão com a glutathione-S-transferase (GST) foi induzida com IPTG (Invitrogen) na concentração final de 0,1 mM, a 37°C por 3h e por 16-18 h. Após a indução, as células bacterianas foram rompidas por sonicação (sonicador VC601 Sonic and Materials Inc.) em banho de gelo (6 pulsos de 30 s, com amplitude 60) e os lisados foram centrifugados a 13.000 g por 30 min, a 4°C, para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado). A solubilidade das proteínas recombinantes foi avaliada utilizando-se 0,5% e 1% de sarcosil (N-laurilsarcosina, Serva) segundo Frangioni *et al.* (1993). Os extratos celulares, depois de tratados com sarcosil, foram novamente submetidos à centrifugação para separação das frações solúveis e insolúveis. As análises da expressão e da solubilidade das proteínas recombinantes nos extratos proteicos e nas frações solúveis e insolúveis foi feita por SDS-PAGE 12% e as proteínas visualizadas por coloração com *coomassie blue*.

3.7 Purificação das proteínas recombinantes recMcCHD e recMcSET/TAF

As frações solúveis das proteínas recombinantes fusionadas com a GST foram purificadas por cromatografia de afinidade, utilizando-se a resina *Glutathione Sepharose* 4B (GE Healthcare), conforme descrito por Smith & Johnson (1988). Para a recuperação das proteínas recombinantes livres de

GST, as proteínas de fusão foram clivadas com a protease TEV, na proporção de 0,01 mg da protease para 0,1 mg da proteína de fusão, em tampão contendo Tris-Cl 50 mM pH 8,0, EDTA 0,5 mM e DTT 1 mM, a 34°C por 16 h. Após a clivagem, as proteínas foram dialisadas contra PBS 1X em uma membrana de ultrafiltração com poro de 3.000 Da (Amicon Ultra, Millipore), a 3.000 x g, e incubadas novamente com a resina de glutationa-Sepharose. As proteínas foram quantificadas utilizando o sistema Qubit (*Quant-iT Protein Assay Kit*, Invitrogen) e armazenadas em PBS 1X, a - 20°C. A eficiência da clivagem e a recuperação das proteínas recombinantes foram avaliadas por SDS-PAGE 15% e as proteínas visualizadas por coloração *com coomassie blue*.

3.8 Produção de antissoros policlonais monoespecíficos

Para a obtenção de soros policlonais específicos contra a McCHD e contra a McSET/TAF, as proteínas recombinantes correspondentes foram utilizadas como antígenos para a imunização de coelhos. A recMcCHD e a recMcSET/TAF, livres da GST, foram emulsificadas em adjuvante completo de Freund (Sigma) para primeira imunização de um coelho, e em adjuvante incompleto nas imunizações de reforço subsequentes. Aproximadamente 100 µg de antígeno por dose foram utilizadas para imunização de coelhos por via subcutânea. Foram realizadas ao todo três imunizações, com intervalos de 15 dias entre elas, colhendo-se amostras de sangue e separando-se os soros uma semana após a última imunização. Os antissoros policlonais obtidos foram purificados em colunas de proteína G HP HiTrap™ (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante.

3.9 Immunoblots

Extratos proteicos dos quatro estágios de desenvolvimento de *M. corti* foram obtidos conforme descrito na seção 3.1.4. Aproximadamente 20 µg de cada um dos extratos proteicos foram resolvidos por SDS-PAGE 12% e transferidos para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) por 1 h e 30

min a 70 V (Towbin *et al.*, 1992). Todas as etapas seguintes foram realizadas à temperatura ambiente. As membranas foram bloqueadas por 1 h com 5% de leite desnatado em solução de PBS-T (PBS 1X contendo 0,1% Tween-20). As lavagens das membranas foram feitas com PBS-T (3 lavagens de 5 min cada e 1 lavagem de 15 min). Como anticorpos primários foram utilizados os antissoros específicos contra as proteínas recombinantes nas diluições 1:5000 e 1:20 000 para McCHD e McSET/TAF respectivamente. Os anticorpos primários foram incubados por 1h 30 min. Como anticorpo secundário, foi utilizado um conjugado marcado com peroxidase anti-IgG de coelho (ECL™, GE Healthcare) diluído 1:9.000 em solução bloqueadora 5%, por 1 h. Os blots foram revelados com o kit de detecção ECL Plus *Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) e a quimioluminescência foi detectada usando o sistema de imagem *VersaDoc* (Bio-Rad).

3.10 Imunofluorescência

Foram utilizados os quatro estágios de desenvolvimento de *M. corti*: TT, 24h-PI, 72h-PI e VE para análise do padrão de expressão das proteínas McCHD e McSET/TAF. Amostras de cada um dos estágios foram coletadas dos cultivos correspondentes e imediatamente fixadas em paraformaldeído 4% (p/v) em PBS até o uso. Os parasitos foram lavados 3X em PBS, desidratados em série etanólica e incluídos em parafina conforme Koziol *et al.*, (2010). Os blocos foram cortados no micrótomo (Leica) e seções de 8 µm foram obtidas e montadas. Após a remoção da parafina e reidratação, as seções foram bloqueadas por 1 h a 37°C com a solução bloqueadora: BSA 1% diluído em PBS-T (PBS 1X contendo 0,05% Tween-20) e então incubadas a 4°C por 16 h com os anticorpos primários diluídos em solução bloqueadora. Os antissoros produzidos conforme na seção 3.7 foram utilizados como anticorpos primários. As seções foram lavadas 6X de 20 min cada em PBS 1X e então incubadas em câmara úmida por 1 h a 37°C com um anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com Alexa Fluor 488 (verde) diluído 1:500 em solução bloqueadora. Depois de repetidas lavagens em PBS, as seções foram incubadas com o fluoróforo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole (Molecular Probes, Invitrogen) por 20 min a

37°C, lavadas 3X de 15 min cada e então montadas em solução de montagem Fluoromount (Sigma). As seções foram observadas em microscópio confocal (Olympus FluoView™ 1000), disponível no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS). As imagens foram capturadas digitalmente com o software FluoView- F1000.

3.11 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

3.11.1 Genes de referência

Baseado nos estudos de Bizarro *et al.*, (2005) e Koziol *et al.*, (2010), 9 genes foram selecionados para análise de normalizadores dos níveis de transcrição para espécie *M. corti*. Os iniciadores utilizados na amplificação dos genes selecionados (Tabela 2) encontravam-se disponíveis em nosso laboratório, sendo que um deles foi gentilmente cedido pela Dra. Estela Castillo (Universidad de la Republica, Montevideu. Uruguai). Para os genes alvos *McCHD* e *McSET/TAF* os iniciadores foram projetados com o software *Vector NTI Advance v.10*. A Tabela 3 apresenta as características destes iniciadores.

Tabela 2: Genes selecionados e características dos oligonucleotídeos iniciadores.

GENE*	SEQUÊNCIA	Tm (°C)	PRODUTO (pb)
ARME-8	FW 5'- AGGATATTGCTCCCGGTGTA -3'	59,31	148
	REV 5'- ACAGTCTCCTGACTTTTCG-3'	58,95	
LBA	FW 5'- CCGAACCGGTTGTTCTACTC -3'	59,59	140
	REV 5'- AGACTGCCAGGTCGTAGTC -3'	59,33	
CRME-8	FW 5'- ACAGCCAGTGGTGTGAAGA -3'	59,41	147
	REV 5'- CCGCATGTCTGTAGCAAGT -3'	59,60	
SR6	FW 5'- ACCTGTCGTCTCGCTTAGT -3'	59,94	145
	REV 5'- TCAATGGCAGTTTCATGTC -3'	59,81	
SBF1	FW 5'- TCTACCAAGTTTTCTGCAA-3'	59,41	148
	REV 5'- TCCGAGTCGTGTTGAAGTC -3'	58,85	
OSA	FW 5'- AAAGTGTGTGTGTGCGATTG -3'	58,17	148
	REV 5'- AGCTGAGGACTTCGCACTC -3'	59,75	
CHOREIN	FW 5'- CGGGCATTCAAATCCAGTAT -3'	59,78	130
	REV 5'- GACTGTGGAAAAGGTGCAAAC -3'	59,63	
PDCD4	FW 5'- GTTCTATCGAGCTGCCTTG -3'	59,98	147
	REV 5'- TTGCTCATGTCCTTCTGGAG -3'	58,96	
PABP	FW 5'- GGGATGCTTATTGGAATGGA -3'	59,72	131
	REV 5'- ACGGAACCATTTGGAGGAT -3'	59,20	
TROPO	FW 5'- CTGAAGCTGAAGTTGCAGCCATGA -3'	60,00	247
	VER 5'- TCGTACTTACGTTTCAGCATCTCC -3'	60,00	

* **ARME-8 e CRME-8:** Receptor-mediated endocytosis-8 gene; **LBA:** lipopolysaccharide (LPS)-responsive and beige-like Anchor gene; **SR6:** Splicing factor, arginine/serine-rich 6; **SBF1:** Suvar3-complex gene; **OSA:** Eyelid/OSA brahma complex gene; **CHOREIN:** Chorea-acanthocytosis gene; **PDCD4:** Programmed cell death 4 gene; **PABP:** Poly (A)-binding protein gene; **TROPO:** Tropomyosin.

Tabela 3: Sequências dos oligonucleotídeos para os genes alvos de estudo, tamanho dos produtos de amplificação e T_m utilizados nas RT-qPCRs.

Oligos	Sequências	T _m (°C)	Produto (pb)
McCHD	D: 5'-CGTTTGTGCCGAGGGAAGGAGT3'	60	146
	R:5'-TTGAAGAGACCACGCATGAGCTTG-3		
McSET/TAF	D:5'-GGAGAGCGTGGACTCTGTCCAA-3'	60	136
	R:5'-GCCAACAGTTCGGCACGAT-3'		

3.11.2 RT-qPCRs

Os cDNAs dos estágios TT, 24h-PI, 72h-PI e VE foram obtidos conforme descrito na Seção 3.4. As reações de RT-qPCR foram realizadas sob as seguintes condições: os cDNAs foram diluídos 1:100 e para cada reação foram utilizados 10 µl de cada uma das amostras diluídas. Foram adicionados 0,4 µl de iniciadores senso e anti-senso (0,5 µM); 0,8 µl de dNTPs (5 mM); 2 µl de tampão de reação 10X; 1,2 µl de MgCl₂ (50 mM), 4 µl de SYBR Green (1X); 0,05 µl de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, 0,24U) e 1,55 µl de água milli-Q autoclavada, resultando no volume final de 20 µl de reação. As RT-qPCRs foram realizadas no equipamento 7500 *Real Time System* (Applied Biosystems), tendo uma etapa inicial de 95°C por 5 min, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 10 s e 72°C por 15 s. Todas as reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicatas biológicas e quadruplicatas técnicas.

3.11.3 Análise dos dados

Os parâmetros de análises dos dados do qPCR foram determinados utilizando o programa 7500 *Real Time PCR SDS v. 2.1*. Para a determinação de genes de referência foi utilizado o software *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002), o qual é uma aplicação Básica Visual (VBA) para Microsoft Excel que calcula automaticamente uma medida (M) da estabilidade de expressão para cada gene controle em um dado grupo de amostras. Para esta análise, os valores Ct (*Cycle threshold*) foram convertidos em quantidades relativas utilizando a amostra com o menor valor Ct de cada gene como calibrador e levando em consideração a eficiência média de amplificação de cada par de

oligonucleotídeos iniciadores na respectiva amostra, a partir da fórmula $Eff^{-\Delta Ct}$ (Hellemans *et al.*, 2007), onde Eff = eficiência média de amplificação e ΔCt = diferença entre o Ct da amostra e o menor Ct . As eficiências de amplificação foram calculadas manualmente utilizando o Microsoft Excel. A normalização dos resultados de expressão foi feita em relação aos níveis de expressão dos genes alvos no estágio TT. Os cálculos de expressão relativa de cada gene foram feitos pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). A significância estatística foi obtida com a análise de ANOVA, um fator, com o teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software SPSS 20 (IBM corp).

4 Resultados

4.1 Extrações de RNA, amplificação das sequências-alvo e clonagem em vetor de expressão

4.1.1 Extrações de RNA de *M. corti*

As extrações de RNA dos quatro estágios de desenvolvimento de *M. corti* apresentaram um rendimento de aproximadamente 1400 ng a cada 50 µl de vermes. A Figura 4 apresenta resultados representativos de extrações de RNA de cada estágio de desenvolvimento: TT, 24h-Ind, 72h-PI e VE. Ao todo foram realizadas 16 extrações de RNA total (4 estágios em quadruplicatas biológicas). Apenas uma banda referente ao RNA ribossômico 18S é visualizada na análise eletroforética, indicando a integridade do RNA isolado.

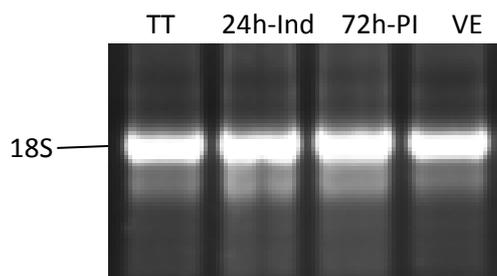


Figura 4: Extrações de RNA de *M. corti*. Gel de agarose 1% corado com GelRed, extrações realizadas com Trizol, obtendo-se rendimento de aproximadamente 1400 ng a cada 50 µl de vermes.

4.1.2 Amplificação das sequências recMcCHD e recMcSET/TAF

As sequências codificadoras das proteínas recMcCHD e recMcSET/TAF foram obtidas por RT-PCR e tiveram suas identidades confirmadas por sequenciamento automático de DNA. O segmento clonado referente à recMcCHD possui 440 pb e codifica 147 aminoácidos próximo da extremidade N-terminal de uma proteína CHD nativa de outros organismos (Figura 5A). Já o segmento clonado correspondente à recMcSET/TAF possui 273 pb e codifica 91 aminoácidos próximo da extremidade N-terminal de uma proteína SET/TAF nativa de outros organismos (Figura 6A). Utilizando a ferramenta *Search for*

Conserved Domain foi possível a identificação de dois cromodomínios na recMcCHD e de um domínio NAP na recMcSET/TAF.

Após a confirmação do sequenciamento, as sequências codificadoras das proteínas recMcCHD e recMcSET/TAF foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores primários, gerando o produto de 490 pb (Figura 5B) e 323 pb (Figura 6B), respectivamente. 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, para a recMcCHD (Figura 5C), e de 373 pb, para a recMcSET/TAF (Figura 6C).

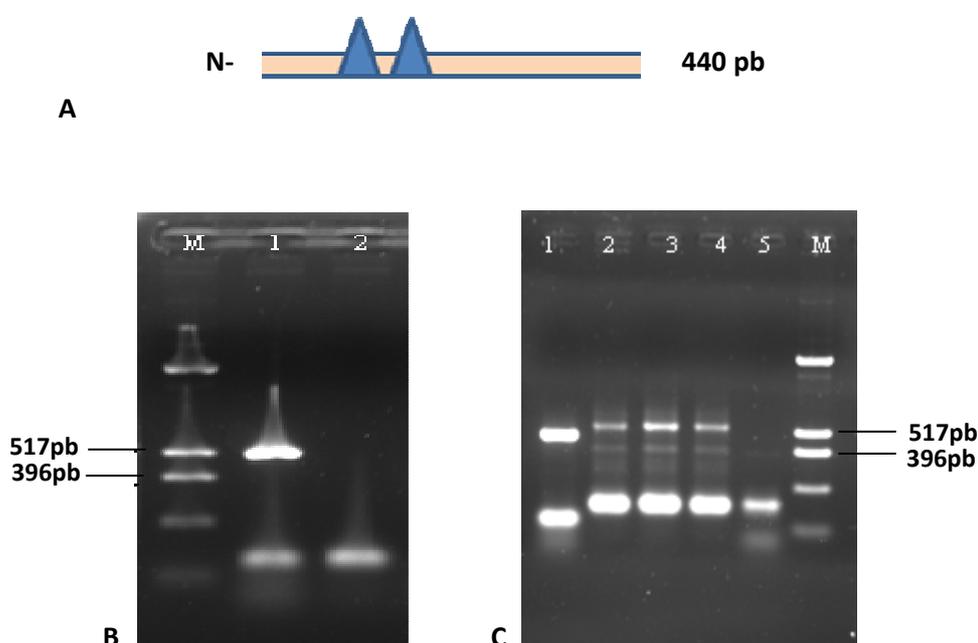


Figura 5: Representação esquemática da sequência parcial codificadora da proteína McCHD e análises eletroforéticas de amplicons da sequência codificadora da recMcCHD com os iniciadores primários e secundários. (A) desenho esquemático representando o segmento parcial correspondente a 440 pb próximo da 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 490 pb (B-1), (B-2) controle negativo da reação. Em (C) amplificação com os iniciadores secundários gerou um produto de 540 pb (C-2-3-4), em C-1 amplificação com o iniciador primário (490 pb), 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.

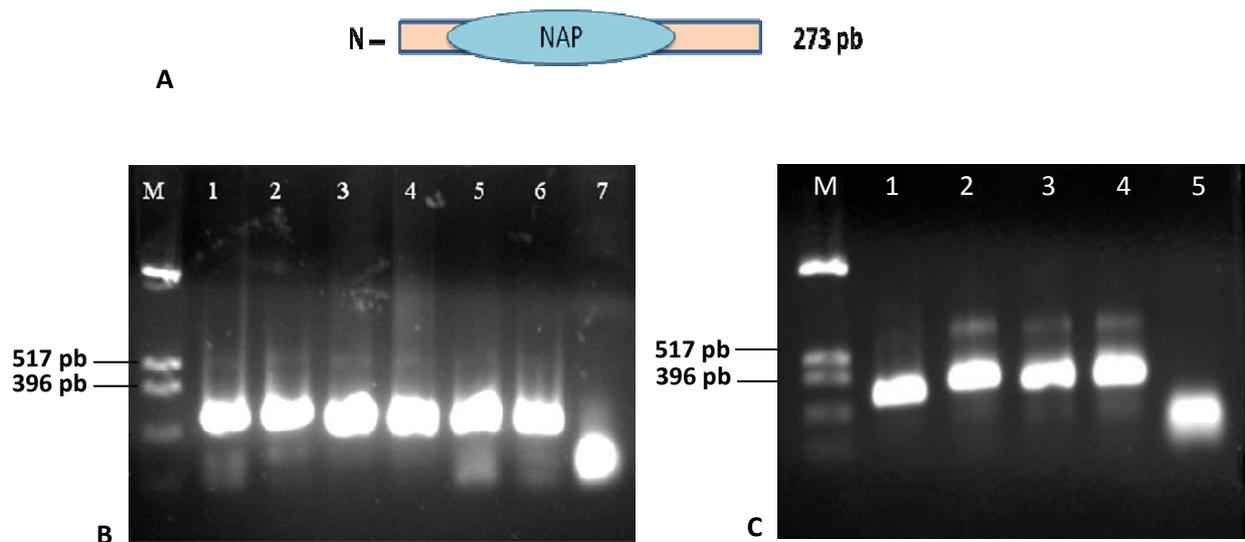


Figura 6: Representação esquemática da sequência parcial codificadora da proteína McSET/TAF e análises eletroforéticas de amplicons da sequência codificadora da recMcSET/TAF com os iniciadores primários e secundários. (A) desenho esquemático representando o segmento parcial correspondente a 273 pb próximo da região N- terminal da proteína McSET/TAF, incluindo o domínio NAP (elipse). Em (B) amplificação da sequência codificadora da recMcSET/TAF com os iniciadores primários gerou produto de 323 pb (B-1 a 6), em (B-7) controle negativo da reação de PCR. Em (C) amplificação com os iniciadores secundários gerou um produto de 373 pb (C-1 a 4), em C-5 amplificação com o iniciador primário (323 pb). M- marcador de tamanho dos fragmentos de DNA. Géis de agarose 1,5% corados com GelRed. (Imagens dos amplicons cedidas por André N. D. Benitz).

4.1.3 Clonagem das sequências codificadoras da recMcCHD e da recMcSET/TAF por recombinação *in vivo*

A clonagem das sequências codificadoras das proteínas recMcCHD e recMcSET/TAF foi realizada utilizando os produtos da PCR gerados com os iniciadores secundários. As colônias recombinantes foram identificadas através da análise dos produtos de amplificação da PCR de colônia utilizando iniciadores específicos do vetor pGEX-TEV. Foram obtidos um clone recombinante do total de 100 colônias transformantes analisadas, para a recMcCHD, e 13 clones recombinantes do total de 94 colônias transformantes analisadas para a recMcSET/TAF (Figura 7).

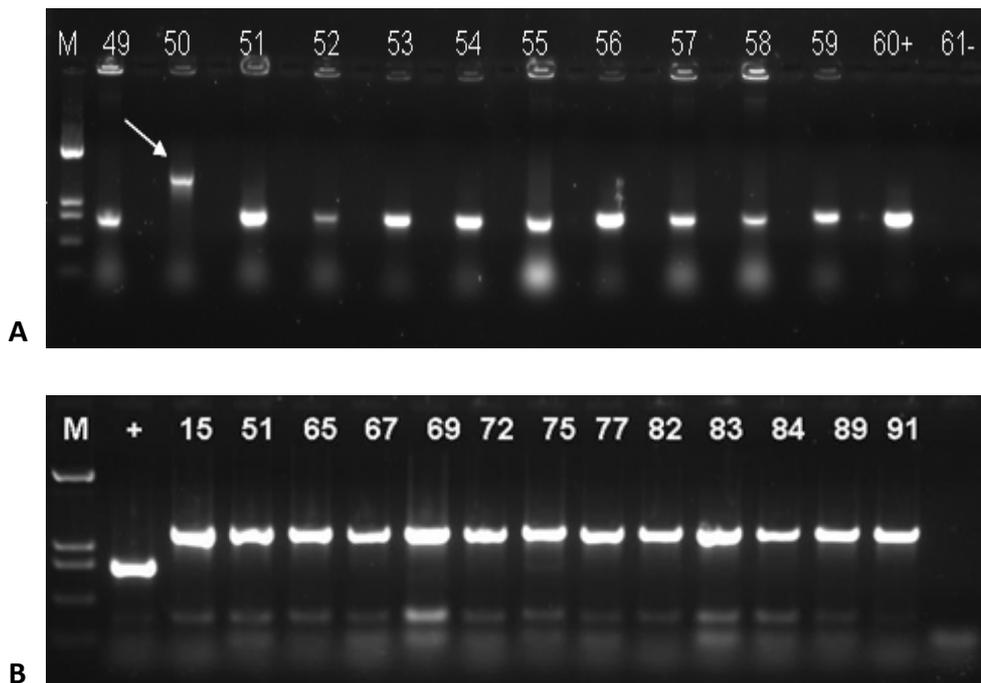


Figura 7: Análise eletroforética dos produtos de amplificação de PCRs de colônia das clonagens das sequências da recMcCHD (A) e recMcSET/TAF (B). Em A (49 e 51-59) colônias não-recombinantes, (50) a colônia contendo o plasmídeo recombinante (seta), (60) o controle positivo, amplicon de 393 pb correspondente ao vetor pGEX-TEV.(61) controle negativo da PCR. Em B somente as colônias contendo o plasmídeo recombinante (M) marcador de tamanho dos fragmentos de DNA. Géis de agarose 1,5% corado com GelRed.*B (imagem cedida por André N. D. Benitz)

4.2 Expressão e solubilização das proteínas recombinantes recMcCHD e recMcSET/TAF

Os plasmídeos gerados a partir da clonagem no vetor pGEX-TEV foram utilizados para expressão das proteínas- recombinantes em fusão com a GST em células de *E. coli* BL21 *Codon Plus* RIL. A melhor condição de expressão para ambas as proteínas recMcCHD e recMcSET/TAF foi a indução com 0,1 mM de IPTG por 3h a 37°C. As proteínas de fusão apresentaram massas moleculares de 43 kDa e 37 kDa para recMcCHD e recMcSET/TAF, respectivamente (Figuras 8A e 9A). Ambas as proteínas recombinantes foram observadas principalmente na fração insolúvel, tendo sido solubilizadas por

tratamento com o detergente sarcosil. A melhor condição de solubilização escolhida para ambas foi o tratamento com 0,5% de sarcosil (Figuras 8B e 9B).

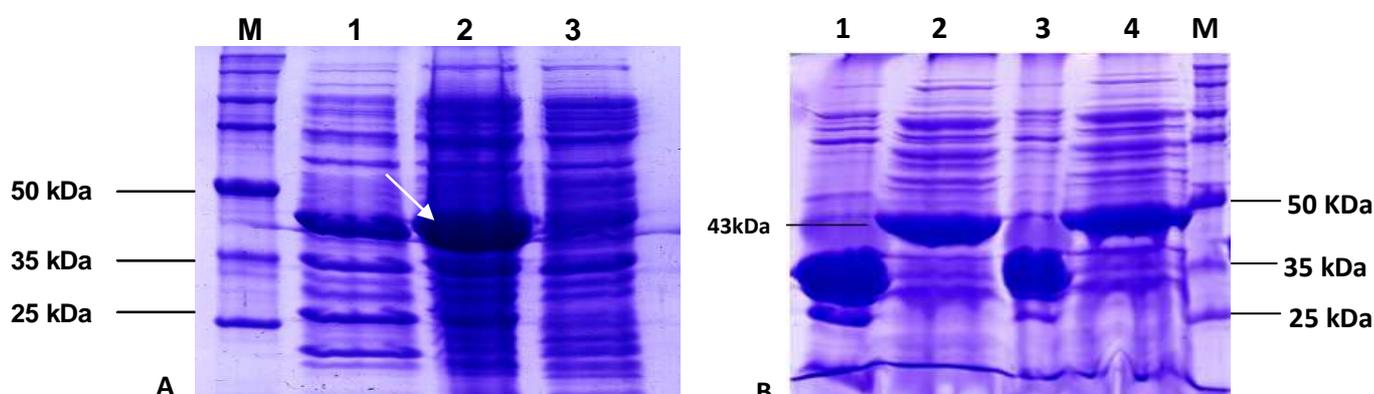


Figura 8: Análise eletroforética de extratos protéicos de células de *E. coli* BL21 Códon Plus RIL expressando a proteína recMcCHD e após tratamento com sarcosil e separação das frações solúveis e insolúveis, sobrenadante e *pellet* respectivamente por centrifugação. Em A (1) cultura não-induzida com 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. Em B (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 poliacrilamida-SDS 12% e visualizados por coloração com *Coomassie blue*. A mobilidade do marcador de peso molecular está assinalada.

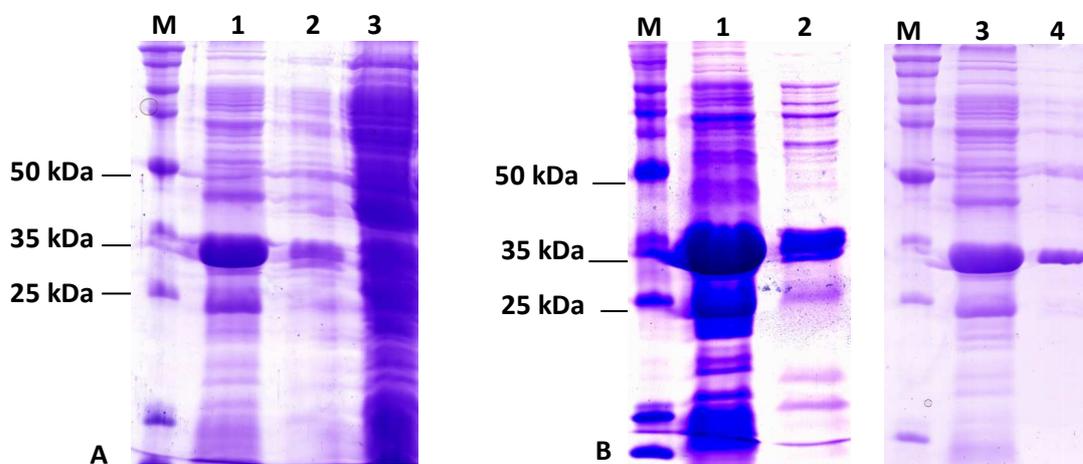


Figura 9: Análise eletroforética de extratos protéicos de células de *E. coli* BL21 Códon Plus RIL expressando a proteína recMcSET/TAF e após tratamento com sarcosil e separação das frações solúveis e insolúveis, sobrenadante e *pellet* respectivamente por centrifugação. Em A (1) cultura induzida com 3 h a 37°C na concentração 0,1mM IPTG (37 kDa); (2) cultura não-induzida com IPTG, (3) cultura induzida 16-18h a 37°C na concentração 0,1 mM IPTG. Em B (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 poliacrilamida-SDS 12% e visualizados por coloração com *Coomassie blue*. A mobilidade do marcador de peso molecular está assinalada.

4.3 Purificação das proteínas recMcCHD e recMcSET/TAF e produção de antissoros policlonais

As proteínas recMcCHD e recMcSET/TAF em fusão com a GST foram purificadas por cromatografia de afinidade conforme descrito no item 3.7. A purificação da proteína recMcCHD apresentou um rendimento de aproximadamente 2 mg da proteína de fusão por litro de cultura, enquanto que a proteína recMcSET/TAF apresentou um rendimento de aproximadamente 6 mg de proteína de fusão por litro de cultura.

A eficiência da clivagem para as condições estabelecidas foi parcial para a proteína recMcCHD, e foi de 99% para a proteína recMcSET/TAF. Após a clivagem das proteínas recombinantes foi realizada a recuperação das proteínas recombinantes livres da porção GST. Após incubação com a resina de afinidade, a proteína recMcCHD clivada ligou-se de forma inespecífica na resina de *Glutathione Sepharose 4B*, sendo necessário o uso de agentes desnaturantes para poder eluí-la da resina e, desse modo, a GST e parte da proteína de fusão também foram eluídas (Figura 10). Já a proteína recMcSET/TAF foi recuperada da resina sem o uso de agentes desnaturantes, mas apresentou em suas eluições pequenas quantidades da porção GST (Figura 11). Em virtude disso, uma nova incubação com a resina foi realizada para recuperação somente da proteína recMcSET/TAF livre da porção GST.

Devido à eficiência da clivagem com a protease TEV ter sido parcial para a proteína recMcCHD e suas dificuldades de recuperação livre da porção GST, porções de gel de poliacrilamida contendo a proteína CHD livre (~17 kDa) da porção GST foram excisadas, maceradas e processadas para a imunização de um coelho e assim, obter a produção do antissoro específico conforme descrito no item 3.8. A proteína recMcSET/TAF livre da porção GST (~11 kDa) foi utilizada na imunização de um coelho sem a necessidade de excisar porções de gel de poliacrilamida.

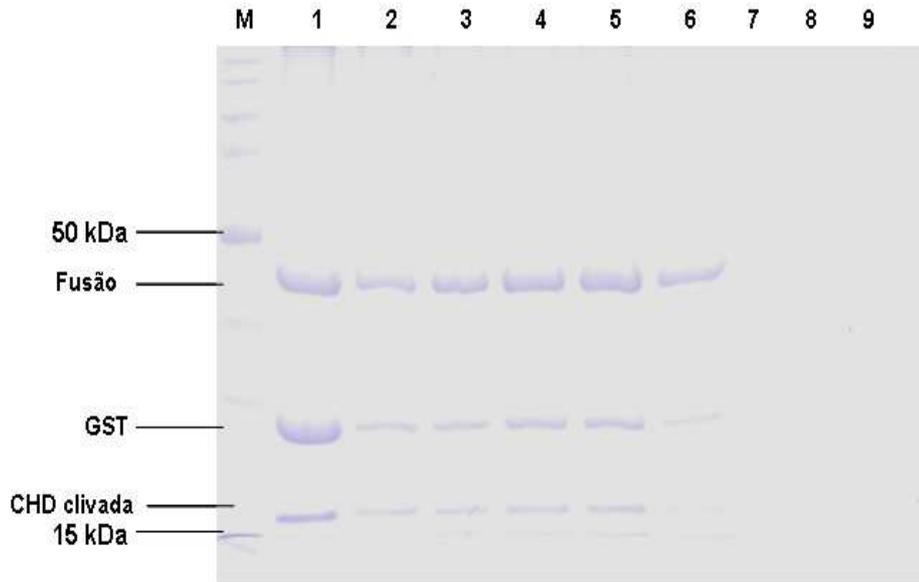


Figura 10: Análise eletroforética de extratos proteicos de recMcCCHD após purificação por cromatografia de afinidade com a resina *Gluthione Sepharose 4B* (GE Healthcare) e clivagem com a protease TEV para liberação da porção GST. (1-6) extratos da proteína cromodomínio-helicase (proteína de fusão: 43 kDa; recMcCCHD clivada: 17 kDa). (7-9) PBS após as eluições. Os extratos proteicos foram submetidos à SDS-PAGE 15% e visualizados por coloração com *coomassie blue*. A mobilidade do marcador de peso molecular está assinalada.

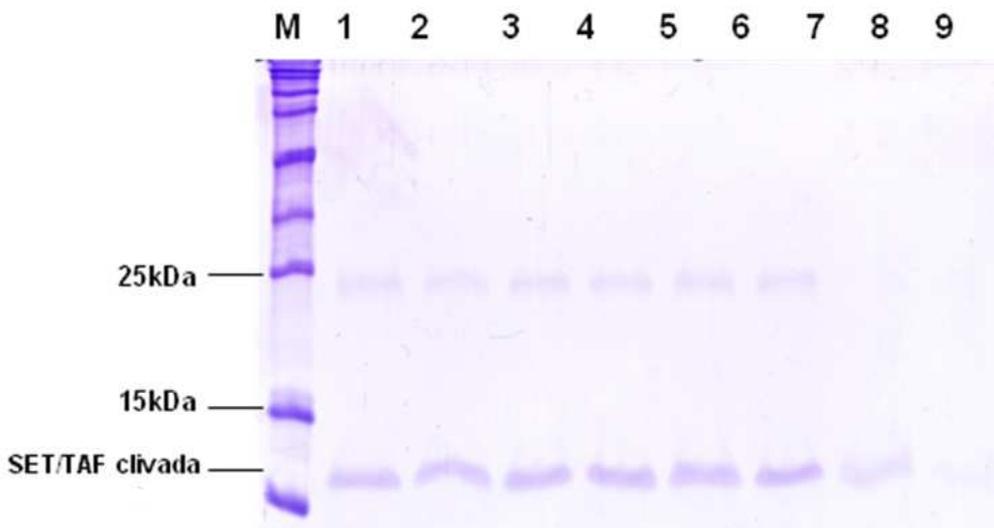


Figura 11: Análise eletroforética de extratos proteicos de recMcSET/TAF após purificação por cromatografia de afinidade com a resina *Gluthione Sepharose 4B* (GE Healthcare) e clivagem com a protease TEV para liberação da porção GST. (1-8) extratos da proteína recMcSET/TAF (clivada: 11 kDa, GST: 26 kDa). (9) PBS após as eluições. Os extratos proteicos foram submetidos à SDS-PAGE 15% e visualizados por coloração com *coomassie blue*. A mobilidade do marcador de peso molecular está assinalada.

4.4 Análise da expressão das proteínas McCHD e McSET/TAF em extratos proteicos de *M. corti*

Para detecção da expressão das proteínas McCHD e McSET/TAF nos diferentes estágios de desenvolvimento de *M. corti* foram realizados experimentos de imunofluorescência e imunoblot, utilizando os anticorpos anti-McCHD e anti-McSET/TAF. Em imunoblot, foi possível demonstrar que McCHD está presente em todos os estágios de desenvolvimento analisados (Figura 12), apresentando um nível de expressão pouco variável entre os diferentes estágios. A proteína McSET/TAF não foi detectada em extratos proteicos de TT, e nos demais estágios analisados ela apresenta um aumento gradual no seu nível de expressão conforme o desenvolvimento do parasito até o estágio estrobilizado (Figura 12). Como controle dos níveis de expressão foi utilizado um antissoro contra a proteína tropomiosina.

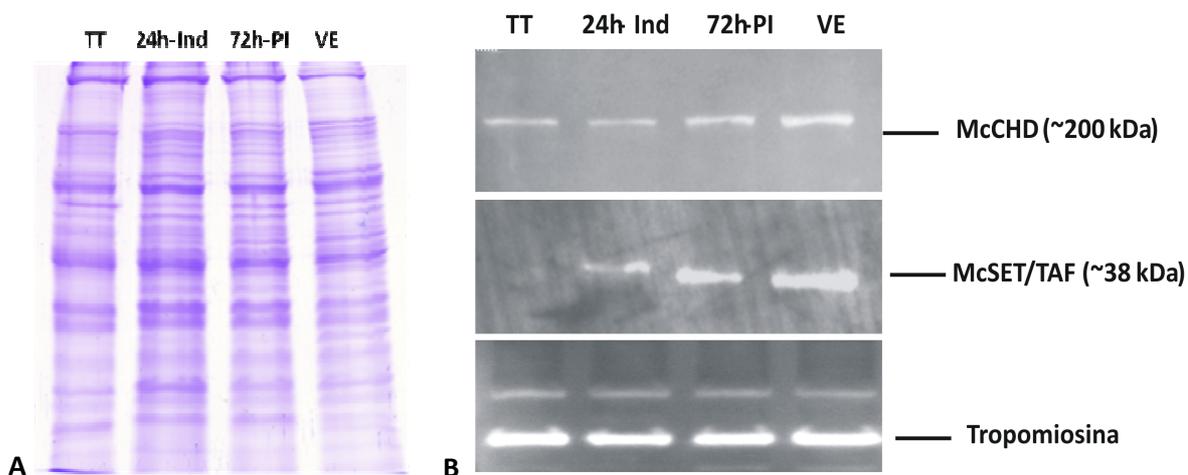


Figura 12: Análise da expressão das proteínas McCHD e McSET/TAF ao longo do desenvolvimento de *M. corti*. (A) SDS-PAGE 12% dos extratos proteicos de diferentes estágios de desenvolvimento de *M. corti* corados com *coomassie blue*. (B) Imunoblots mostrando os níveis de expressão das proteínas McCHD e McSET/TAF nos estágios de desenvolvimento de *M. corti*: TT, 24h-Ind, 72h-PI e VE. Anticorpos anti-McCHD (1:5000) e o anti-McSET/TAF (1:20000) foram utilizados como anticorpos primários. Como anticorpo secundário foi utilizado anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase. A revelação foi feita com o reagente de detecção ECL. Como controle dos níveis de expressão foi utilizado o antissoro contra a proteína tropomiosina.

Nos experimentos de imunofluorescência em secções longitudinais de TT, 24h-Ind, 72h-PI e VE foi possível observar a expressão de McCHD e McSET/TAF em todos os estágios de desenvolvimento. Como controles foram utilizados antissoro pré-imune (Figura 13). Além disso, a proteína McCHD apresentou um nível de expressão mais evidenciado nos estágio TT e 24h-Ind, quando comparado com os demais estágios (Figura 14), enquanto que a proteína McSET/TAF apresentou um nível de expressão mais evidenciado nos estágios 24h-Ind, 72h-Ind e VE (Figura 15). Ambas as proteínas demonstraram uma localização citoplasmática e um padrão uniforme de distribuição nos tecidos.

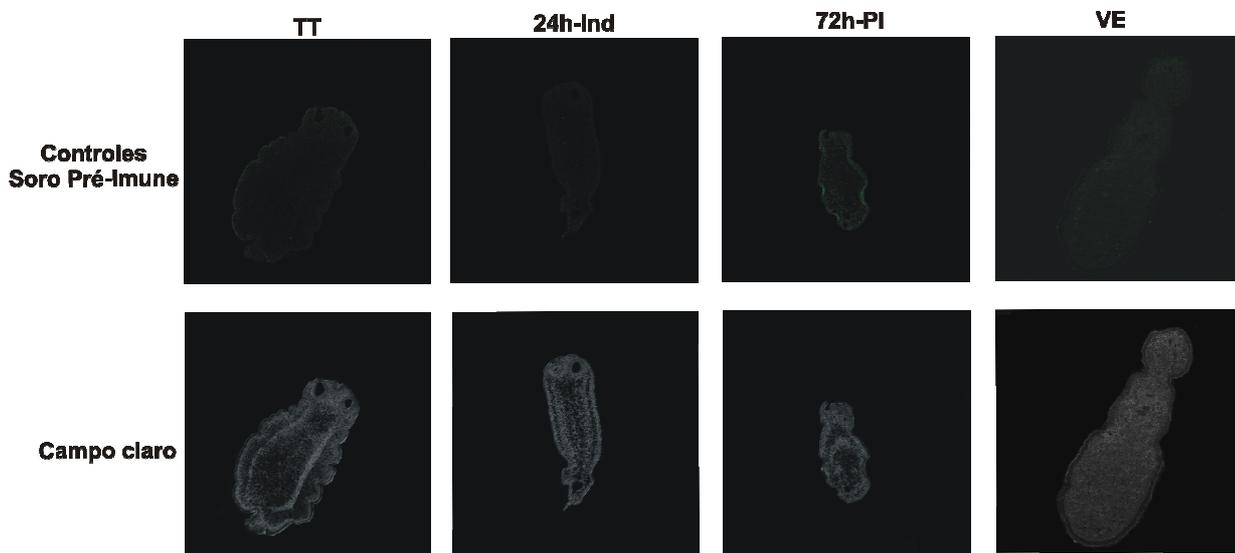


Figura 13: Controles da análise do padrão de expressão das proteínas McCHD e McSET/TAF em secções longitudinais de TT, 24h-Ind, 72h-PI e VE de *M. corti*, utilizando microscopia confocal. Seções longitudinais incubadas com antissoro pré-imunização e anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa488. Imagens de TT registradas com o aumento 40X, demais imagens 10X.

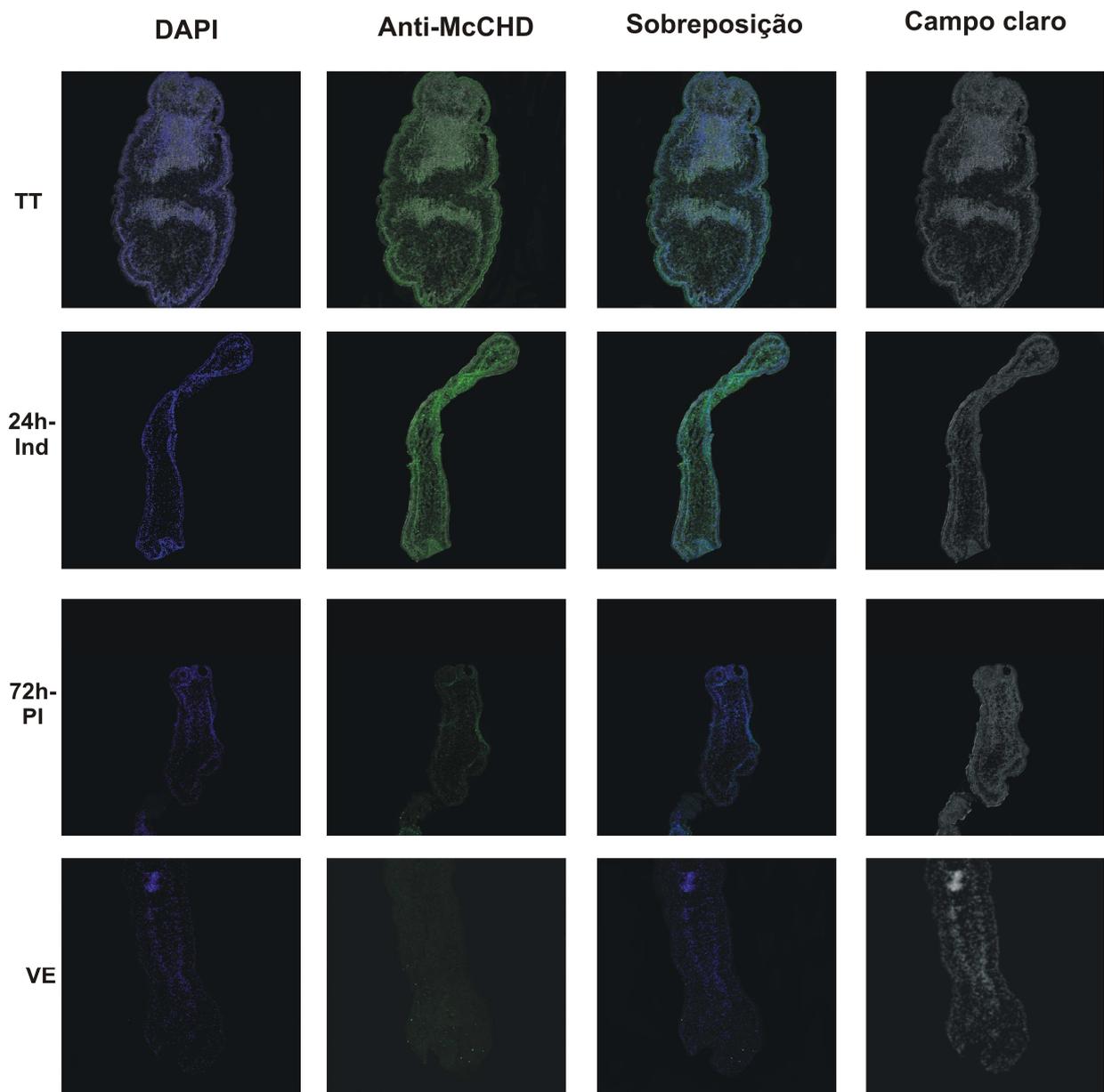


Figura 14: Análise do padrão de expressão da proteína McCHD em secções longitudinais de TT, 24h-Ind, 72h-PI e VE de *M. corti*, utilizando microscopia confocal. Seções longitudinais incubadas com antissoro anti-McCHD. Coluna à esquerda, coloração com DAPI (marcação de núcleos); colunas centrais proteína McCHD nativa detectada por anticorpos anti-McCHD e anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa488, e sobreposição das marcações de núcleo e da proteína McCHD; Coluna da direita contraste de fase. Imagens de TT registradas com o aumento 40X, demais imagens 10X.

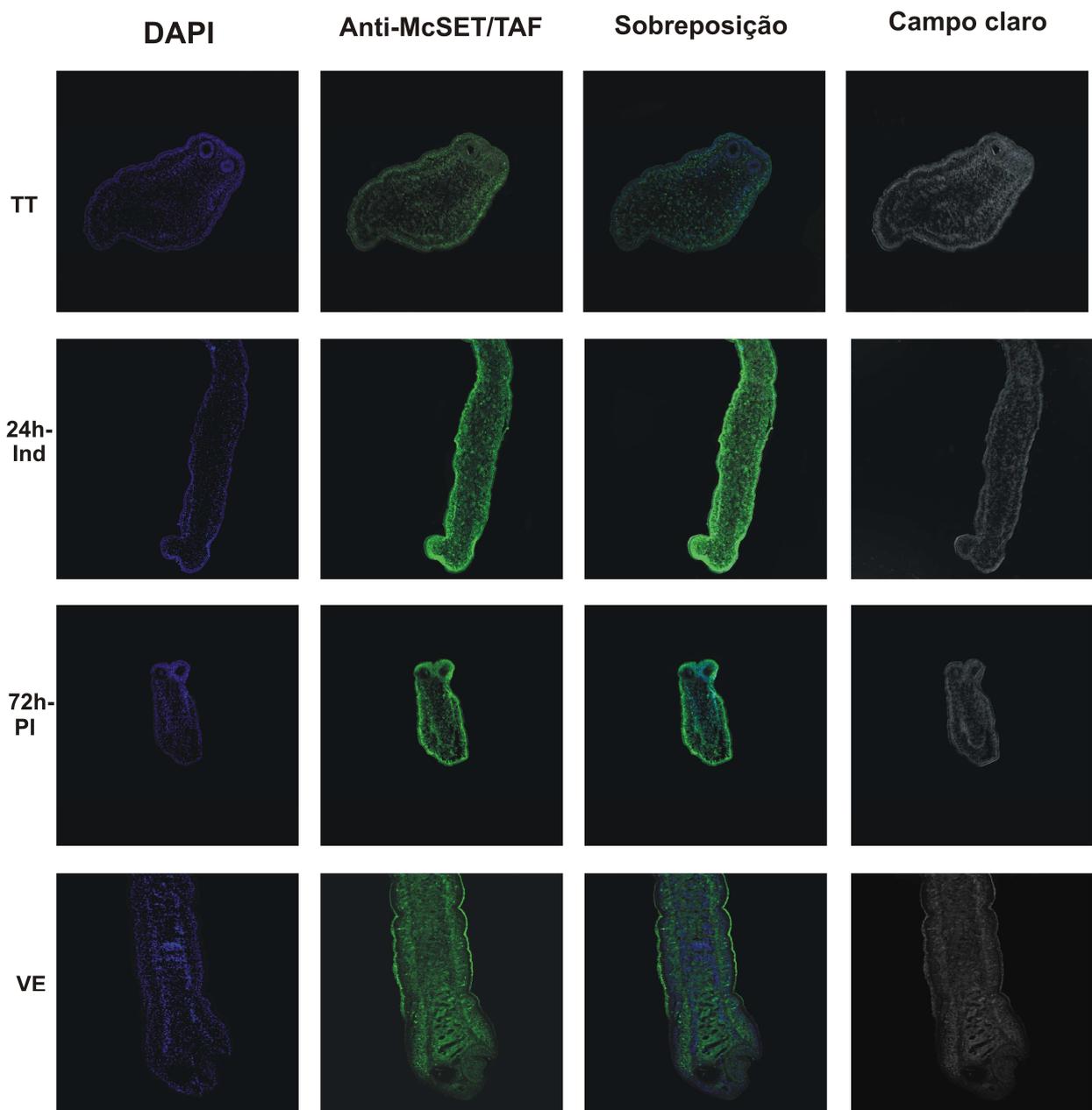


Figura 15: Análise do padrão de expressão da proteína McSET/TAF em secções longitudinais de TT, 24h-Ind, 72h-PI e VE de *M. corti*, utilizando microscopia confocal. Seções longitudinais incubadas com antissoro anti-McSET/TAF. Coluna à esquerda, coloração com DAPI (marcação de núcleos); colunas centrais proteína McSET/TAF nativa detectada por anti-corpos anti-McSET/TAF e anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa488, e sobreposição das marcações de núcleo e da proteína McCHD; Coluna da direita contraste de fase. Imagens de TT registradas com o aumento 40X, demais imagens 10X.

4.5 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

4.5.1 Avaliação de potenciais genes de referência

Os genes selecionados como candidatos a normalizadores para espécie de *M. corti* estão listados na tabela 2. Estes genes foram previamente identificados nos estudos de Bizarro *et al.*, (2005) e Koziol *et al.*, (2010) e, devido à disponibilidade de suas sequências e suas funções foram utilizados na tentativa de encontrar os genes de referência para a espécie *M. corti*.

A especificidade de cada sequência para cada um dos genes escolhidos foi avaliada por RT-PCR, utilizando o cDNA de TT. Todos os produtos de amplificações conferiram o tamanho esperado (Figura 16, tabela 2). A especificidade das sequências referentes aos genes *McCHD* e *McSET/TAF* também foi verificada por RT-PCR (Figura 17), apresentando produtos de amplificação no tamanho esperado.



Figura 16: Análise eletroforética dos amplicons obtidos por RT-PCR dos genes escolhidos para genes de referência. Os genes selecionados apresentaram amplicons no tamanho esperado, demonstrando especificidade para cada sequência. (M) marcador de peso molecular.

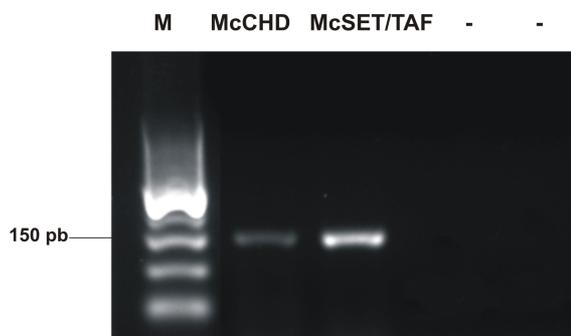


Figura 17: Análise eletroforética dos amplicons obtidos por RT-PCR dos genes *McCHD* e *McSET/TAF* utilizados em RT-qPCR. Os genes selecionados apresentaram amplicons no tamanho esperado, *McCHD* (146 pb), e *McSET/TAF* (136 pb), demonstrando especificidade para cada sequência. (-) Controles negativos. (M) marcador de peso molecular.

4.5.2 Análise da estabilidade dos genes selecionados

Utilizando o *software* geNorm, os genes selecionados e genes de referência tiveram sua estabilidade de expressão (M) analisada. Este *software* calcula a média geométrica da expressão de cada amostra analisada (estágios de desenvolvimento de *M. corti*), resultando em um valor de estabilidade de expressão média (M) para cada gene analisado. Os valores M de cada um dos genes analisados estão demonstrados na figura 18. O gene com o menor valor M é considerado o mais estável, enquanto que aquele que apresentar um valor maior é considerado como tendo uma maior variabilidade de sua expressão nas condições analisadas. Dentre os genes analisados, os que apresentam os menores valores M são *PDCD4* (M=0,5) e *PAPB* (M= 0,53), *SR6* (M=0,57) seguido de *CHOREIN* (M=0,72) e *TROPO* (M=0,8). O gene considerado menos estável foi o *LBA* (M= 1,40) Figura 18.

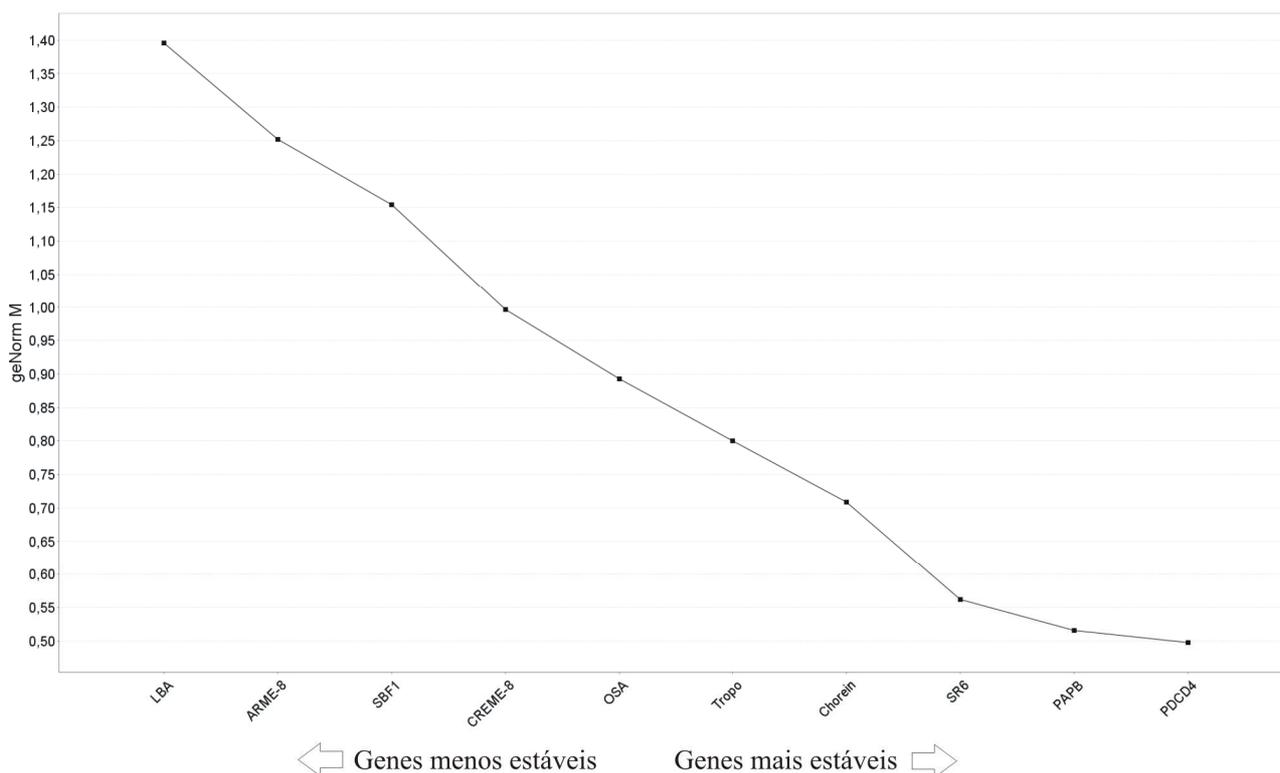


Figura 18: Análise da estabilidade de expressão dos potenciais genes de referência pelo programa geNorm. Valores M obtidos para cada um dos genes analisados estão indicados na figura.

Com o software geNorm também é possível determinar o número mínimo de genes necessários para ser utilizados como genes de referência para normalização de dados de expressão gênica. Neste caso, o valor 0,15 é recomendado como valor de exclusão para cada par de genes, ou seja, se os dois genes considerados mais estáveis apresentarem um valor acima de 0,15 é necessário à adição de mais genes para utilização na normalização dos dados de expressão. Entre os genes analisados, não foi possível encontrar qualquer combinação que estivesse abaixo do valor mínimo recomendado (Figura 19), nem mesmo com a utilização de todos os genes.

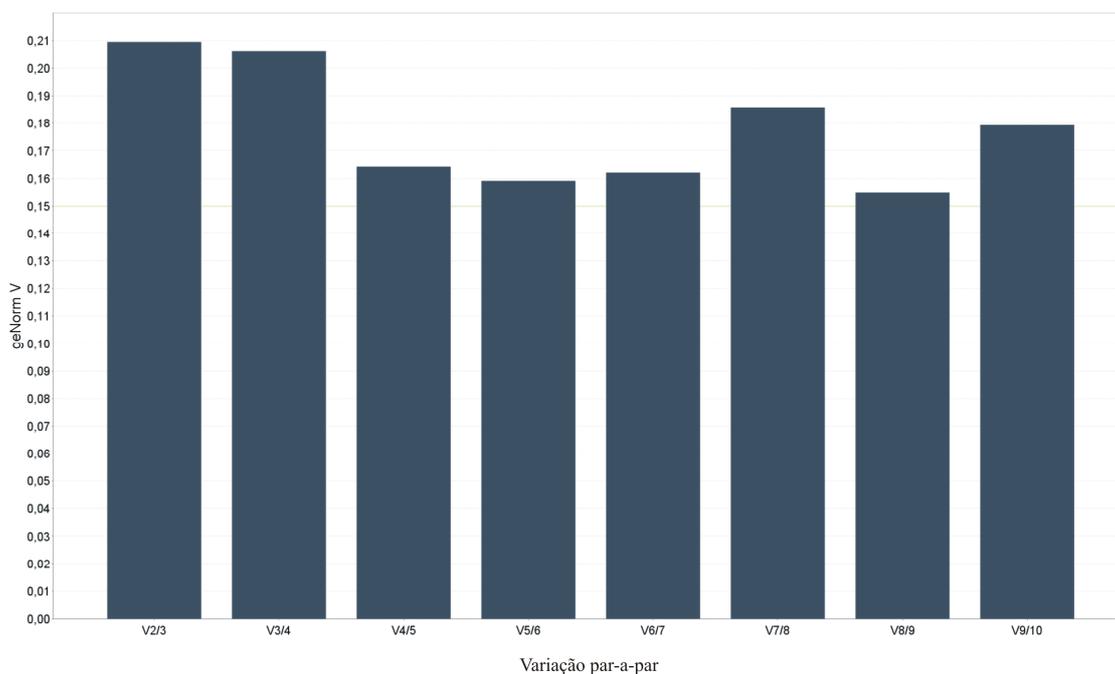


Figura 19: Determinação do número ótimo de genes a serem utilizados como controles na normalização dos dados de expressão gênica nos diferentes estágios de desenvolvimento de *M. corti* (TT, 24h-Ind, 72h-PI e VE). Cut-off recomendado <0,15 pelo programa geNorm. Valores obtidos estão indicados na figura.

Mesmo não sendo considerados como genes de referência ideais, os genes *PDCD4*, *PAPB*, *SR6*, *CHOREIN* e *TROPO* foram utilizados para normalização dos dados de expressão gênica dos genes *McCHD* e *McSET/TAF*. Dentre os 4 estágios de desenvolvimento de *M. corti* (TT, 24h-Ind, 72h-PI e VE) analisados, foram encontradas diferenças significativas nos níves

de expressão gênica de *McCHD* (Figura 20) e *McSET/TAF* (Figura 21) somente em dois estágios: o inicial (TT) e o adulto (VE), conforme análises pelo teste de Duncan. Níveis maiores de expressão gênica de ambos os genes são encontrados no último estágio de desenvolvimento (VE) de *M. corti* (Figuras 20 e 21).

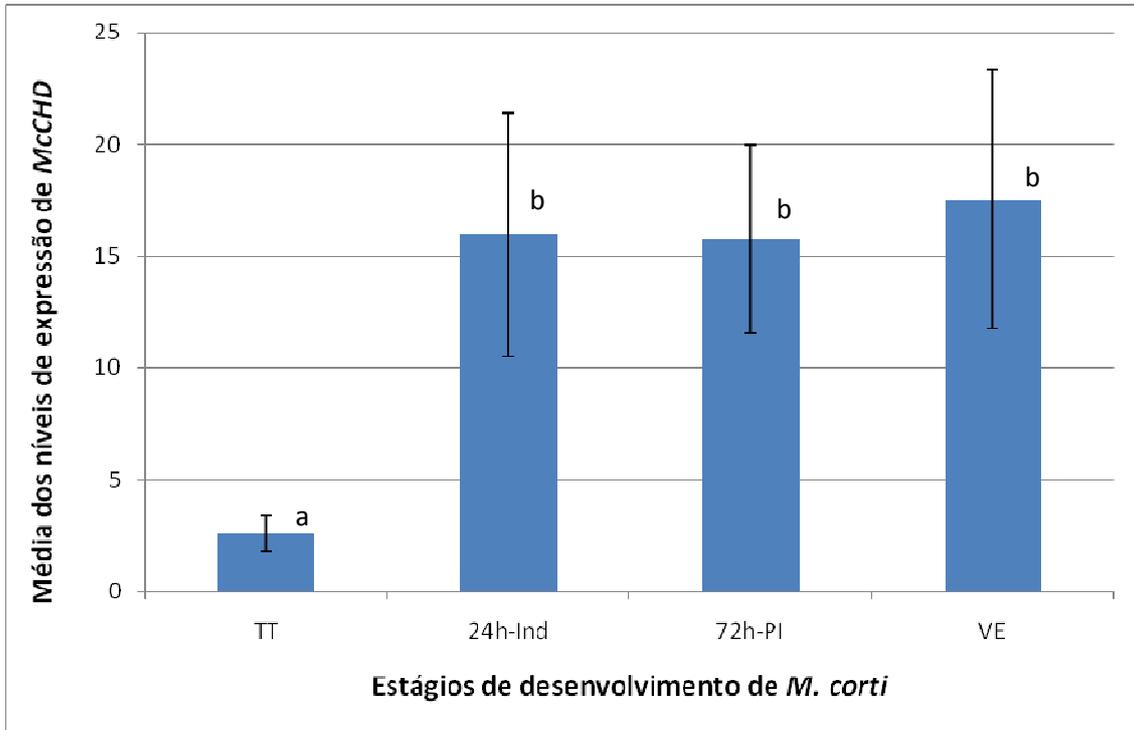


Figura 20: Média dos níveis de expressão de *McCHD*. O nível de expressão de *McCHD* foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *PDCD4*, *PAPB*, *SR6*, *CHOREIN* e *TROPO*. Dados que diferem com significância 5% pelo teste de Duncan foram indicados com diferentes letras. As barras indicam desvio-padrão.

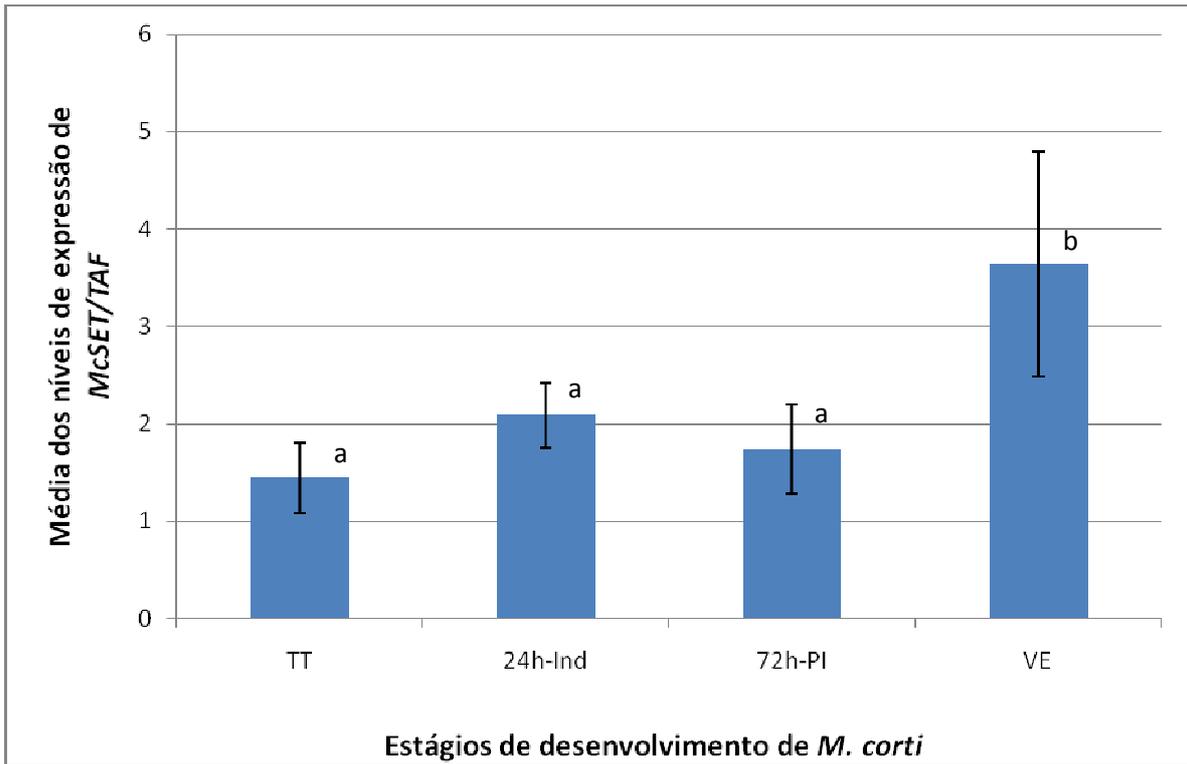


Figura 21: Média dos níveis de expressão de *McSET/TAF*. O nível de expressão de *McSET/TAF* foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *PDCD4*, *PAPB*, *SR6*, *CHOREIN* e *TROPO*. Dados que diferem com significância 5% pelo teste de Duncan foram indicados com diferentes letras. As barras indicam desvio-padrão.

5 Discussão

A caracterização de proteínas diferencialmente expressas durante o desenvolvimento de *M. corti* é importante para um melhor entendimento e compreensão tanto de aspectos biológicos básicos do parasito, como dos mecanismos moleculares envolvidos durante o seu processo de desenvolvimento. O desenvolvimento de cestódeos envolve mudanças morfológicas e fisiológicas complexas, que podem ou não estar associadas com mudanças de espécies hospedeiras (Littlewood, 2008). O processo de estrobilização, apesar de bem caracterizado do ponto de vista morfológico em várias espécies de tênias (Olson & Tkach, 2005), é ainda praticamente desconhecido do ponto de vista molecular. Estudos em organismos da Classe Cestoda visando à compreensão da biologia do desenvolvimento destes parasitos ainda são escassos. Até o momento, têm-se descrito a caracterização de genes ortólogos de proteino-quinases: Ras, de Raf, de MPK1 (Spiliotis *et al.*, 2005, 2006), do fator de transcrição *Mvlim* (Lalane *et al.*, 2004), os quais estão envolvidos principalmente em processos de proliferação e diferenciação celular. O potencial envolvimento desses genes no controle do desenvolvimento de cestódeos é sugerido, mas estudos adicionais são necessários para comprová-lo. Dentro deste contexto, as proteínas CHD e SET/TAF-I β apresentam-se como potenciais marcadores de desenvolvimento, uma vez que apresentam funções conservadas, principalmente envolvidas em rotas de desenvolvimento e com ortólogos em vários organismos eucarióticos.

CHDs estão subdivididas em 3 subfamílias, de acordo com a presença ou ausência de domínios adicionais, além da sua estrutura básica. (Hall & Georgel, 2007). A subfamília I compreende os membros CHD1 e CHD2, sendo conservada em humanos e leveduras. Entre suas principais funções descritas, está sua interação com regiões ricas em A-T no DNA, atuando com regulador transcricional (Ho & Crabtree, 2010). Em leveduras, CHD1 regula a fase de alongamento da transcrição interagindo com outras proteínas do complexo *Paf1* (Sims & Wade, 2011). Em seres humanos, CHD1 liga-se diretamente à histona H3 e associa-se ao complexo do spliceossomo, além de ser um fator ativo da remodelagem da cromatina (Flanagan *et al.*, 2005; Sims & Wade,

2011). Em *D. melanogaster*, a CHD1 tem um importante papel durante a gametogênese, pois a ausência desta proteína acarreta infertilidade (McDaniel *et al.*, 2008). Estudos em camundongos demonstraram o envolvimento da CHD1 murina na manutenção de células-tronco embrionárias (Gaspar-Maia *et al.*, 2009). Já a CHD2 está envolvida principalmente no desenvolvimento, reposta a danos no DNA e supressão tumoral em mamíferos (Kulkarni *et al.*, 2008; Sims & Wade, 2011; Rajagopalan *et al.*, 2012).

A subfamília II compreende os membros CHD3 e CHD4, os quais se diferenciam das demais subfamílias por apresentarem dois domínios de dedo-de-zinco (PHD, *plant homeodomain*), e por não terem o domínio de ligação ao DNA (Hall *et al.*, 2007). Além disso, em mamíferos, os membros dessa subfamília são subunidades do complexo NuRD (*nucleosome-remodelling and histone deacetylase*) e têm como principal função repressão transcricional (Ho & Crabtree, 2010). Em *D. melanogaster*, essa subfamília é conhecida como Mi-2, possuindo dois transcritos (Mi-2a para CHD3 e Mi-2b para CHD4). Estes membros podem atuar de forma independente do complexo NuRD, e independente da desacetilação das histonas para efetuar a repressão da transcrição (Kunert & Brehm, 2009.). Além disso, Mi-2 também pode interagir com outras proteínas, como PcG (Polycomb group) e hunchback (Hall & Georgel, 2007; Köhler & Aichinger, 2010). Outras funções relacionadas a essa subfamília incluem sinalização em resposta a danos no DNA e regulação do ciclo celular em seres humanos (Larsen *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2012).

A subfamília III compreende os membros CHD5-CHD9, e diferencia-se das demais subfamílias por apresentar os domínios adicionais como BRK (*Brahma and Kismet domains*), o SANT (*switching-defective protein 3, adaptor 2 nuclear receptor co-repressor, transcription factor IIIB*), e o domínio de ligação ao DNA (Marfella & Imbalzano, 2007). Em *D. melanogaster*, os membros dessa subfamília são homólogos de um único membro do grupo de proteínas Trithorax, o Kismet, envolvidos na regulação dos genes *Hox*, na segmentação corporal, na expressão, e na fase de alongamento da transcrição. (Sims & Wade, 2011). Em mamíferos, os membros dessa subfamília desempenham funções relacionadas à supressão tumoral (Paul *et al.*, 2013), regulação da transcrição (Lutz *et al.*, 2006), desenvolvimento normal de tecidos

(Layman *et al.*, 2010; Shanks *et al.*, 2012) e diferenciação celular (Hall & Georgel, 2007; Shur & Benayahu, 2005; Shur *et al.*, 2006; Layman *et al.*, 2010).

A proteína SET/TAF-1 β é uma chaperona de histonas envolvida numa diversidade de processos biológicos, especialmente no controle da transcrição e na replicação do DNA. Esta proteína faz parte do complexo INHAT (complexo inibidor da acetilação de histonas) e atua principalmente inibindo a transcrição de genes em organismos eucarióticos (Kutney *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2001). Em *D. melanogaster*, esta proteína tem um papel ativo na diferenciação de células neuronais, atuando como regulador da transcrição de genes envolvidos neste processo (Kim *et al.*, 2011). Estudos funcionais em mamíferos mostram que a SET/TAF-1 β , além de inibir a acetilação de histonas, interage com outras proteínas, como, por exemplo, ciclinas (Estanyol *et al.*, 1999; Qu *et al.*, 2002; Canela *et al.*, 2003) e a proteíno-fosfatase tipo 2A (PP2a) (Karetsou *et al.*, 2005; Li *et al.*, 1996), regulando o ciclo celular. A SET/TAF-1 β também atua regulando processos de replicação (Matsumoto *et al.*, 1993), silenciamento gênico (Cervoni *et al.*, 2002) e apoptose (Fan *et al.*, 2003) em estudos com células de mamíferos.

Com o intuito de caracterizar os padrões de expressão das proteínas CHD e SET/TAF-1 β durante o processo de desenvolvimento estrobilar de *M. corti* e de avaliar seus potenciais como marcadores moleculares, suas sequências parciais identificadas em *M. corti* foram obtidas por RT-PCR. Após o cultivo e indução ao processo de estrobilização, os diferentes estágios de desenvolvimento de *M. corti* (TT, 24h-PI, 72h-PI e VE) foram coletados e submetidos à extração de RNA total. Como se pode ver na figura 4, as extrações apresentam um alto rendimento (1400 ng a cada 50 μ l vermes), pouca degradação e sem diferenças na quantidade de RNA extraído dos diferentes estágios. Também se pode observar a detecção de apenas uma banda do RNA ribossômico, a qual corresponde à banda do RNA ribossômico 18S. Esta detecção de apenas uma banda é comum em organismos pertencentes ao filo platelmintos (van Keulen *et al.*, 1985), pois, assim como em outros invertebrados (insetos), existe um pequeno *gap* na molécula de RNA ribossômico 28S. Este *gap* faz com que o RNA se dissocie em dois fragmentos de aproximadamente mesmo tamanho, que podem se unir por

pontes de hidrogênio, resultando no aparecimento de apenas uma banda detectável, próxima àquela do 18S em uma análise eletroforética (van Keulen *et al.*, 1985).

Analisando os segmentos parciais das proteínas McCHD e McSET/TAF foi possível identificar que ambas apresentam os domínios conservados preditos para suas estruturas (Hall *et al.*, 2007 e Xu *et al.*, 2010). A sequência parcial McCHD utilizada neste estudo possui somente a região com os dois cromodomínios. Contudo, por conter somente esta região não foi possível caracterizar a qual subfamília a proteína McCHD de *M. corti* pode pertencer ou se existe mais de uma de proteína CHD em *M. corti*.

Para a sequência parcial McSET/TAF foi possível identificar somente o domínio NAP, o qual é característico de uma proteína SET/TAF nativa (Gamble *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2007), permitindo assegurar a natureza da proteína McSET/TAF utilizada neste estudo. Outros domínios funcionais não foram encontrados provavelmente devido ao tamanho reduzido do segmento referente à McSET/TAF. Análises adicionais estão sendo realizadas para se obter informações mais específicas para as sequências McCHD e McSET/TAF, uma vez que, recentemente, foi publicado o genoma de quatro parasitos cestódeos: *Echinococcus multilocularis*, *E. granulosus*, *Taenia solium* e *Hymenolepis microstoma* (Tsai *et al.*, 2013).

Depois de obtidas as sequências estas foram clonadas no vetor de expressão heteróloga pGEX-TEV e versões recombinantes destas proteínas foram produzidas em células de *E. coli*. Este 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, o vetor pGEX foi modificado em nosso laboratório inserindo-se o sítio de clivagem da protease TEV (Vargas *et al.*, 2009), o que viabilizou a liberação da proteína de interesse expressa como fusão com GST por clivagem com a protease TEV. Utilizando esta protease em substituição a protease trombina, reduz-se os custos da produção de proteínas recombinantes, pois a TEV é produzida em nosso laboratório, utilizando o vetor pRK 508 TEV (Kapust & Waugh, 1999) que contém sua sequência codificadora clonada. A otimização da expressão das

proteínas recombinantes foi realizada em células de *E. coli* BL21 *Codon Plus* RIL, as quais foram capazes de induzir a expressão das proteínas 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, considerados raros e que frequentemente limitam a tradução de proteínas heterólogas, permitiu a eficiência da expressão das proteína recombinantes nesta linhagem, pois ambas as proteínas McCHD e McSET/TAF apresentam cerca de 20% e 25% de suas composições aminoacídicas codificadas por esses códons raros.

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 (Burgess, 2009). As proteínas recombinantes recMcCHD e recMcSET/TAF mostraram-se insolúveis 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 (Frangioni *et al.*, 1993) 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 (Tao *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011).

Utilizando o pGEX-TEV foi possível a produção e purificação das proteínas recMcCHD e recMcSET/TAF. O baixo rendimento da purificação da proteína recMcCHD foi devido à ineficiência da clivagem da proteína de fusão com a protease TEV, e porque após a clivagem, a proteína recMcCHD acabou se ligando diretamente à resina de 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 (Figura 10), emulsionadas com adjuvante de Freund para serem utilizadas na imunização do coelho. A purificação da proteína recMcSET/TAF não apresentou tantos fatores limitantes, permitindo que uma maior quantidade de proteína (~6 mg) fosse recuperada após a clivagem e incubação com a resina glutathione-

sepharose 4B (Figura 11). Além disso, para a imunização do coelho foi utilizada somente a proteína livre da porção GST e o adjuvante de Freund, o que facilitou a obtenção do antissoro específico. Apenas um coelho foi imunizado com cada proteína para obtenção dos antissoros policlonais específicos, os quais foram utilizados para avaliar o padrão de expressão das proteínas nativas McCHD e McSET/TAF em diferentes estágios de desenvolvimento de *M. corti*.

Padrões de expressão de proteínas CHDs têm sido investigados em cada uma de suas subfamílias, podendo variar tanto na distribuição em células e tecidos específicos como durante o período de desenvolvimento. Durante o desenvolvimento de *C. elegans*, proteínas CHD apresentaram expressão no núcleo de muitas células, incluindo células do cordão nervoso, da região da cabeça e da cauda (von Zelewsky *et al.*, 2000). Em tecidos neonatal de camundongos, proteínas CHDs são altamente expressas no timo, em áreas específicas do cérebro, em folículos de pelo e na mucosa epitelial (Kim *et al.*, 1999). Em seres humanos, a subfamília I de proteínas CHD apresenta um padrão global de expressão (Woodage *et al.*, 1997). Nos experimentos de imunoblots, foi possível detectar a presença da proteína McCHD em todos os estágios de desenvolvimento de *M. corti*. Esta detecção sugere que esta proteína possui um papel ativo durante o desenvolvimento estrobilar de *M. corti*. Apesar de parecer não ter diferença nos níveis de expressão proteica de McCHD entre os estágios analisados (Figura 12), McCHD parece estar sendo recrutada ao longo do desenvolvimento, e é provável que variações sutis nos níveis proteicos desta proteína não sejam detectados em imunoblot, necessitando de outras abordagens metodológicas para poder inferir se existem diferenças nos níveis de expressão de McCHD ao longo do desenvolvimento de *M. corti*.

Nos experimentos de imunofluorescência em cortes histológicos dos mesmos estágios analisados por imunoblot, podemos verificar variações no padrão de expressão da proteína McCHD entre os estágios analisados. Pode-se notar que McCHD está sendo mais evidenciada nos estágios TT e 24h-Ind (Figura 13). Os estágios TT e 24h-Ind são os primeiros estágios de desenvolvimento de *M. corti*. Após as 24h do processo indução dos

tetratirídeos, mudanças morfológicas são visíveis (Cabrera *et al.*, 2010) e consequentemente mudanças nos níveis de expressão de genes proteínas envolvidos no desenvolvimento deste parasita também devem ocorrer. Uma vez que vários estudos demonstram o envolvimento de proteínas CHDs em processos de diferenciação celular e desenvolvimento (Tsukiyama, 2002; Polo *et al.*, 2010, Jacobs-McDaniels & Albertson 2011), encontrar um maior nível de expressão desta proteína nos estágios TT e 24h-Ind, sugere o envolvimento mais ativo de McCHD nos estágios iniciais de desenvolvimento de *M. corti*. Em *D. melanogaster*, proteínas CHD pertencentes à subfamília II, são abundantemente expressas nas primeiras 8 h de embriogênese e têm seus níveis de expressão reduzidos gradualmente até o estágio adulto (Khattak *et al.*, 2002). No estudo de Bizarro *et al.*, (2005), McCHD apresentou um padrão de expressão diferencial entre o estágio TT (inicial) e o VE (adulto), sendo mais expressa no estágio TT. Outros estágios intermediários que ocorrem ao longo do desenvolvimento do parasito não foram analisados neste estudo. Comparando estes dados de expressão diferencial juntamente com os resultados obtidos para McCHD em imunofluorescência pode-se dizer que a proteína McCHD parece ter um papel importante no desenvolvimento estrobilar de *M. corti*. Mesmo não sendo uma proteína específica para determinados estágios de desenvolvimento, uma vez que ela é detectada em todos, seu recrutamento e níveis de expressão parecem ser necessários para que ocorra o desenvolvimento estrobilar do parasito.

Proteínas CHD demonstram ser essenciais para o desenvolvimento normal de organismos eucarióticos. Como uma de suas principais funções descritas está à remodelagem da estrutura de cromatina, e como os efeitos desta alteração, assim como a interação com outras proteínas e/ou complexos enzimáticos podem influenciar a ativação ou repressão da transcrição de outros genes (Belden *et al.*, 2011; Ho & Crabtree 2010). Por estarem envolvidas em variedade de processos biológicos, quaisquer alterações que possam acontecer em sua estrutura, ou no seu nível de expressão trazem consequências maléficas para o organismo em que ocorrem (Ho & Crabtree 2010). Em outros organismos, principalmente em seres humanos, mutações que ocorrem em proteínas CHD levam ao desenvolvimento de doenças graves,

como, por exemplo, a síndrome de CHARGE, que acarreta no desenvolvimento anormal de múltiplos tecidos que envolvem o sistema nervoso central, os olhos, os ouvidos, o nariz e órgãos do mediastino (Janssen *et al.*, 2012). Kim *et al.* (2010) apontam para o envolvimento de proteínas CHD no desenvolvimento de câncer em seres humanos, uma vez que mutações nos genes que codificam estas proteínas causam alterações nos níveis de expressão de outros genes e proteínas.

Nos experimentos de imunoblot utilizando os anticorpos anti-McSET/TAF foi possível detectar a presença desta proteína em 3 dos quatro estágios de desenvolvimento analisados (Figura 12). No primeiro estágio de desenvolvimento de *M. corti* (TT), não houve detecção, o que é sugestivo de que McSET/TAF apresenta níveis muito baixos de expressão neste estágio e/ou não está sendo requerida durante este estágio. Uma vez que estudos demonstram que a proteína SET/TAF-I β atua como inibidora da transcrição de genes, controlando o ciclo celular, baixos níveis de detecção durante este estágio inicial de desenvolvimento era esperado, já que o organismo está prestes a entrar na sua fase de desenvolvimento estrobilar, após o processo de indução com tripsina. Nos demais estágios de desenvolvimento de *M. corti*, pode-se notar que ocorre um aumento gradual nos níveis de expressão da proteína McSET/TAF, sugerindo que a partir do processo de indução da estrobilização de *M. corti*, McSET/TAF possui um papel ativo durante o desenvolvimento estrobilar. Além disso, no último estágio de desenvolvimento analisado VE, demonstra ser o que apresenta um maior nível de expressão, o que corroboraria com o fato de que ao atingir o estágio VE, o parasita inicia um processo de necrose, que acarreta na sua morte em um ou dois dias após chegar a este estágio, e, portanto, rotas de sinalização para apoptose estariam ativadas. Fan *et al.*, (2003) demonstraram o envolvimento da proteína SET/TAF-I β na indução de morte celular via linfócitos T citotóxicos, portanto, regulando o processo apoptótico. A relevância biológica da associação de SET/TAF-I β com a apoptose deve ser investigada futuramente para uma melhor compreensão desta associação.

Nos experimentos de imunofluorescência, McSET/TAF apresentou um padrão de expressão semelhante ao encontrado no imunoblot. Apesar da

detecção no estágio TT, ser encontrada, ela é de maneira muito sutil, e nos estágios após a indução estrobilar de *M. corti*, a detecção de McSET/TAF é muito mais evidenciada, sugerindo que os níveis mais altos de expressão desta proteína ocorrem após ativação do desenvolvimento estrobilar de *M. corti*, e, portanto, a maquinaria celular que atua regulando o crescimento, diferenciação e morte celular está ativada e sendo regulada. Como já descrito em outros estudos, a proteína SET/TAF-I β atua regulando vários desses processos, uma vez que age como um potente inibidor da acetilação de histonas (Kutney *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2011), controlando os níveis de expressão gênica durante a replicação e a transcrição. Além disso, SET/TAF-I β é um potente inibidor da proteína PP2a, uma enzima envolvida na regulação do ciclo celular (Li *et al.*, 1996). O padrão de expressão encontrado para proteínas SET/TAF-I β em diferentes tipos de células de organismos eucarióticos, tais como células de levedura, de camundongo e de insetos é ubíquo, podendo ser encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma das células (Adachi *et al.*, 1994; Nagata *et al.*, 1998), o que corrobora com padrão encontrado nos experimentos de imunofluorescência, uniforme e ubíquo. Em experimentos de cultura de células sincronizadas, os níveis de expressão de SET/TAF-I β após a entrada no ciclo celular estão aumentados (Nagata *et al.*, 1998), corroborando com os níveis de expressão encontrados para McSET/TAF após a indução ao desenvolvimento estrobilar de *M. corti*. Outra evidência que confirma os dados obtidos em imunoblot e imunofluorescência, é que nos estudos nos estudos de Bizarro *et al.*, (2005), McSET/TAF apresentou expressão diferencial entre os estágios TT e VE, sendo mais expressa no estágio VE.

Buscando-se compreender melhor as diferenças encontradas nos níveis de expressão espaço-temporal das proteínas McCHD e McSET/TAF, experimentos de RT-qPCR foram realizados na tentativa de quantificar os níveis de transcrição dos genes *McCHD* e *McSET/TAF* durante o desenvolvimento de *M. corti*. Para uma correta quantificação do nível de transcrição dos genes de estudo é necessário ter genes de referência para poder interpretar os dados obtidos. Genes de referência são considerados aqueles que apresentam um perfil de expressão uniforme, independente dos diferentes tipos de amostras, tratamentos ou tecidos analisados (Remans *et al.*,

2008). Muitos dos genes que têm sido utilizados como referência são os genes constitutivos considerados *housekeeping*, como gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) (Komatsu *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2005), β -actina (Lédée-Baitelle *et al.*, 2005), rRNAs 18S (Granfar *et al.*, 2005), proteína de ligação ao TATA Box (TBP) (Specht *et al.*, 2004), entre outros. Entretanto, vários estudos têm demonstrado que esses genes amplamente utilizados como referências podem ser altamente regulados em diferentes circunstâncias e sistemas experimentais, destacando-se GAPDH (Zhong & Simons, 1999; Glare *et al.*, 2002; Expósito-Rodrigues *et al.*, 2008). Portanto, torna-se necessário validar genes de referência para cada modelo experimental estudado. A espécie *M. corti* não possui genes de referência descritos até o momento. Em virtude disso, foram selecionados vários genes para tentar encontrar os genes de referência para este modelo de estudo e quantificar os níveis de expressão dos genes *McCHD* e *McSET/TAF*. Os genes de referência clássicos como rRNA 18S e 28S, GAPDH e β -actina não foram utilizados, pois não há evidências de que apresentam estabilidade de expressão em *M. corti*.

Os genes candidatos a genes de referência tiveram suas sequências analisadas pro RT-PCR para verificar sua especificidade, obtendo-se produtos de amplificação no tamanho esperado, sem a presença de contaminantes inespecíficos. A estabilidade de expressão gênica destes genes candidatos a genes de referência em 4 estágios de desenvolvimento de *M. corti* foi analisada com o programa geNorm. Esta análise revelou os genes *PDCD4*, *PAPB*, *SR6*, *CHOREIN* e *TROPO* como os mais estáveis, apresentando os menores valores M entre os estágios analisados. Entretanto, a determinação do número mínimo de genes a serem utilizados como referência para normalização dos dados obtidos, não foi obtida com sucesso, uma vez que, quaisquer combinação dos genes mais estáveis ficou acima do valor *Cut-off* desejável (<0,15) obtido pela análise do programa. Determinar genes de referência que possam ser utilizados em diferentes etapas do desenvolvimento de um organismo, não é uma tarefa fácil. Durante o desenvolvimento de um organismo, mudanças nos níveis de expressão gênica ocorrem, o que contribui para dificultar a escolha e determinação destes genes. Recentemente, Pouchkina-Stantcheva *et al.*, (2011), analisaram genes candidatos a genes de referência para a espécie

Hymenolepis microstoma, tanto espacialmente em regiões do verme adulto, quanto temporalmente durante a metamorfose da larva e encontraram diferenças nos níveis de expressão entre as regiões analisadas. Além disso, entre os genes analisados, os autores propõem que somente dois genes podem ser utilizados para uma quantificação confiável em RT-qPCR, pois os demais genes apresentaram muitas variações durante o desenvolvimento do verme. Outros trabalhos, principalmente em plantas, demonstram a necessidade de validar genes de referência para cada espécie, pois um gene referência para uma espécie pode não apresentar a mesma estabilidade em outra (Bruner *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2008; Guénin *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2012).

Uma correta validação dos genes de referência para cada modelo de estudo é vital para evitar interpretações errôneas e inconsistentes dos dados de expressão gênica (Vandsompele *et al.*, 2002; Bustin *et al.*, 2009; Reiter *et al.*, 2011). Em *M. corti*, apesar dos genes *PDCD4*, *PAPB*, *SR6*, *CHOREIN* e *TROPO* não serem os genes de referência “ideais”, estes foram utilizados para normalização dos dados de expressão gênica dos genes *McCHD* e *McSET/TAF*. Após análise estatística, podemos inferir diferenças nos níveis de expressão gênica foram encontradas somente entre os estágios TT (inicial) e VE (final) sendo encontrado para ambos os genes um maior nível de expressão no estágio VE.

Comparando estes resultados com os obtidos em imunoblot e imunofluorescência para *McCHD* podemos dizer que os resultados são contrastantes. Em imunoblot, *McCHD* possui níveis de expressão semelhantes entre todos os estágios de desenvolvimento de *M. corti*, e em imunofluorescência apresenta um padrão de expressão diferencial entre os primeiros estágios, no qual estaria mais expressa (TT e 24h-Ind) e os últimos (72h-PI e VE). No estudo de Bizarro *et al.*, (2005), *McCHD* também foi encontrada mais expressa no estágio TT, discordando com o resultado obtido por RT-qPCR. Uma explicação para esta incoerência dos resultados seria a possível ocorrência de formas parálogas de CHDs em *M. corti*. A sequência codificadora da *McCHD* utilizada neste estudo é parcial e apresenta uma região conservada entre as proteínas CHDs descritas de outros organismos (Marfela

& Imbalzano, 2007). A presença de transcritos e proteínas parálogas conservados nas regiões-alvo amplificadas ou reconhecida pelo antissoro explicaria a falta de especificidade dos *primers* ou do antissoro utilizado resultando na amplificação e reatividade cruzadas em experimentos de RT-qPCR e/ou imunoblot. Apenas podemos concluir que McCHD está presente ao longo do desenvolvimento de *M. corti*, e que parece ter um papel ativo durante o desenvolvimento estrobilar de *M. corti*. CHDs são conhecidas por atuarem em processos de desenvolvimento, uma vez que atuam no processo de remodelagem da cromatina e interação com diversas proteínas (Hall & Georgel, 2007), de acordo com sua estrutura podem desempenhar funções que atuam tanto em processos iniciais de desenvolvimento quanto em processos tardios de desenvolvimento (Ho & Crabtree 2010; Sims & Wade 2011; Urquhart *et al.*, 2011). Investigações futuras são necessárias para identificar qual CHD foi encontrada em *M. corti* e assim, compreender melhor seu papel no desenvolvimento deste parasito.

Quando comparamos os resultados obtidos em imunoblot, imunofluorescência e RT-qPCR para McSET/TAF podemos inferir que estes são concordantes. No estágio VE, McSET/TAF apresentou sempre seu maior envolvimento, seu maior nível de expressão proteica e gênica, o que nos permite sugerir McSET/TAF como marcador de desenvolvimento para o estágio estrobilizado de *M. corti*. Seu envolvimento com funções de regulação de ciclo celular (Canela *et al.*, 2003) e apoptose (Fan *et al.*, 2003) descritos em outros organismos, podem ser também suas principais funções desempenhadas neste organismo, já que neste último estágio de desenvolvimento os mecanismos moleculares envolvidos com o controle do ciclo celular e o processo de morte celular devem estar sendo altamente regulados e controlados. Investigações futuras são necessárias para estudar melhor a função desta proteína neste organismo e em outros da classe cestoda e assim, compreender melhor seu papel no desenvolvimento de cestódeos.

Tanto McCHD quanto McSET/TAF parecem ter importantes papéis no desenvolvimento de *M. corti*. Ambas as proteínas estão relacionadas com a estrutura de cromatina e, de diferentes modos, parecem atuar durante o desenvolvimento de *M. corti*, conduzindo-o ao estágio adulto. Compreender os

mecanismos envolvidos durante esse processo envolve conhecer não só as funções que estas proteínas desempenham como também conhecer quem são seus alvos e com quem elas possam estar interagindo. Até o momento, pode-se dizer que estas proteínas estão presentes nos diferentes estágios de desenvolvimento de *M. corti*, e que McSET/TAF é um potencial marcador de desenvolvimento do estágio estrobilizado de *M. corti*. Estudos adicionais para caracterização de atividades funcionais e detecção alvos moleculares destas proteínas são interessantes para que se possa obter o conhecimento sobre o que ocorre dentro da maquinaria celular deste organismo, e que pode servir para elucidar outros mecanismos moleculares também envolvidos no desenvolvimento de cestódeos e tênias em geral. Uma das dificuldades limitantes de *M. corti* é não possuir o genoma sequenciado, limitando a busca por sequências de genes. Contudo, está em perspectiva o sequenciamento de seu genoma, e, além disso, recentemente, o genoma de outros parasitos cestódeos foi publicado (Tsai *et al.*, 2013), o que facilitará estudos futuros sobre genes e proteínas de cestódeos. Em nosso grupo de pesquisa também estão sendo desenvolvidas outras abordagens metodológicas como o RNA-seq e o RNAi para poder inferir informações mais detalhadas tanto sobre genes e proteínas quanto caracterização funcional de genes de cestódeos.

6 Conclusões

Os resultados deste trabalho forneceram as primeiras evidências do potencial envolvimento de proteínas da família CHDs e SET/TAF-I β na regulação do desenvolvimento cestódeos. Os diferentes níveis de expressão encontrados para McCHD e McSET/TAF ao longo do desenvolvimento de *M. corti*, relacionados às suas funções descritas em outros organismos, sugerem que estas proteínas desempenham papéis específicos em cada estágio analisado e são de grande importância para *M. corti* atingir o estágio adulto. Além disso, McSET/TAF demonstra ser um potencial marcador de desenvolvimento do estágio estrobilizado de *M. corti*. Investigações futuras são necessárias para caracterizar atividades funcionais destas proteínas, assim como seus alvos moleculares, além de identificar sua importância biológica para melhor compreender os mecanismos envolvidos na biologia do desenvolvimento de cestódeos e tênias em geral.

7 Perspectivas

- 1) Análise das sequências McCHD e McSET/TAF a partir das sequências genômicas disponíveis de cestódeos e outros helmintos;
- 2) Caracterização funcional das proteínas McCHD e McSET/TAF por experimentos de purificação das proteínas nativas por cromatografia de imunoafinidade e ensaios funcionais *in vitro*: atividade ATPásica, e interação com histonas, e indução de apoptose;
- 3) Identificação de alvos de interação das proteínas de estudo;
- 4) Avaliação da função destas proteínas no desenvolvimento de *M.corti* através do silenciamento gênico por RNAi;

8 Referências

Abdybekova, A.M., and Torgerson, P.R. (2011). Frequency distributions of helminths of wolves in Kazakhstan. *Vet Parasitol*, acesso: doi:10.1016/j.vetpar.2011.09.004

Adachi, Y., Pavlakis, G.N., and Copeland, T.D. (1994). Identification and characterization of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation break point in acute undifferentiated leukemia. *J Biol Chem* 269, 2258-2262.

Adler, H.T., Nallaseth, F.S., Walter, G., and Tkachuk, D.C. (1997). HRX leukemic fusion proteins form a heterocomplex with the leukemia-associated protein SET and protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 272, 28407-28414.

Alvarez, J.I., Mishra, B.B., Gundra, U.M., Mishra, P.K., and Teale, J.M. (2010). *Mesocestoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology* 137, 359-372.

Barrett, N.J., Smyth, J.D., and Ong, S.J. (1982). Spontaneous sexual differentiation of *Mesocestoides corti* tetrathyridia in vitro. *Int J Parasitol* 12, 315-322.

Belden, W.J., Lewis, Z.A., Selker, E.U., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2011). CHD1 remodels chromatin and influences transient DNA methylation at the clock gene frequency. *PLoS Genet* 7, e1002166.

Bizarro, C.V., Bengtson, M.H., Ricachenevsky, F.K., Zaha, A., Sogayar, M.C., and Ferreira, H.B. (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., and Sykes, J. (2011). Survival analysis of dogs diagnosed with canine peritoneal larval cestodiasis (*Mesocestoides* spp.). *Vet Parasitol* 180, 256-261.

Brehm, K. (2010a). *Echinococcus multilocularis* as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction. *Parasitology* 137, 537-555.

Brehm, K. (2010b). 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., and 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., and Marín, M. (2000). Effect of praziquantel on the strobilar development of *Mesocestoides corti* in vitro. *J Helminthol* 74, 295-299.

Brunner, A.M., Yakovlev, I.A., and Strauss, S.H. (2004). Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol* 4, 14.

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

Burgess, R.R. (2009). Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol* 463, 259-282.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., and Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55, 611-622.

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

Canela, N., Rodriguez-Vilarrupla, A., Estanyol, J.M., Diaz, C., Pujol, M.J., Agell, N., and Bachs, O. (2003). The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J Biol Chem* 278, 1158-1164.

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

Cervoni, N., Detich, N., Seo, S.B., Chakravarti, D., and Szyf, M. (2002). The oncoprotein Set/TAF-1beta, an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing. *J Biol Chem* 277, 25026-25031.

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, D.G., and Perry, R.P. (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, C.V., Ferreira, H.B., Zaha, A., and 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.

Estanyol, J.M., Jaumot, M., Casanovas, O., Rodriguez-Vilarrupla, A., Agell, N., and Bachs, O. (1999). The protein SET regulates the inhibitory effect of p21(Cip1) on cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 activity. *J Biol Chem* 274, 33161-33165.

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

Expósito-Rodríguez, M., Borges, A.A., Borges-Pérez, A., and Pérez, J.A. (2008). Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol* 8, 131.

Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D., and Lieberman, J. (2003). Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 112, 659-672.

Flanagan, J.F., Mi, L.Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., and Khorasanizadeh, S. (2005). Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* 438, 1181-1185.

Frangioni, J.V., and Neel, B.G. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* 210, 179-187.

Frankel, S., Sohn, R., and 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, M.V., Galán-Puchades, M.T., and Malone, J.B. (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., and Silveira, E.F. (2011). *Mesocestoides* sp. (Eucestoda, Mesocestoididae) parasitizing four species of wild felines in Southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 20, 168-170.

Gamble, M.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Freedman, L.P., and Fisher, R.P. (2005). The histone chaperone TAF-I/SET/INHAT is required for transcription in vitro of chromatin templates. *Mol Cell Biol* 25, 797-807.

Gamble, M.J., and Fisher, R.P. (2007). SET and PARP1 remove DEK from chromatin to permit access by the transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* 14, 548-555.

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

Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Polesso, F., Sridharan, R., Mason, M.J., Heidersbach, A., Ramalho-Santos, J., McManus, M.T., Plath, K., Meshorer, E., and Ramalho-Santos, M. (2009). Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 460, 863-868.

Glare, E.M., Divjak, M., Bailey, M.J., and Walters, E.H. (2002). beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* 57, 765-770.

Gleason, N.N., and Healy, G.R. (1967). Report of a case of *Mesocestoides* (Cestoda) in a child in Missouri. *J Parasitol* 53, 83-84.

Granfar, R.M., Day, C.J., Kim, M.S., and Morrison, N.A. (2005). Optimised real-time quantitative PCR assays for RANKL regulated genes. *Mol Cell Probes* 19, 119-126.

Gundra, U.M., Mishra, B.B., Wong, K., and Teale, J.M. (2011). Increased disease severity of parasite infected TLR2^{-/-} 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.* 7, 2586-2596.

Gutierrez, L., Mauriat, M., Guénin, S., Pelloux, J., Lefebvre, J.F., Louvet, R., Rusterucci, C., Moritz, T., Guerineau, F., Bellini, C., and Van Wuytswinkel, O. (2008). The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol J* 6, 609-618.

Guénin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., and Gutierrez, L. (2009). Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J Exp Bot* 60, 487-493.

Hall, J.A., and Georgel, P.T. (2007). CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochem Cell Biol* 85, 463-476.

Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8, R19.

Ho, L., and Crabtree, G.R. (2010). Chromatin remodelling during development. *Nature* 463, 474-484.

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

Hrčková, G., Miterpáková, M., O'Connor, A., Šnábel, V., and Olson, P.D. (2011). Molecular and morphological circumscription of *Mesocestoides*

tapeworms from red foxes (*Vulpes vulpes*) in central Europe. *Parasitology* 138, 638-647.

Jacobs-McDaniels, N.L., and Albertson, R.C. (2011). Chd7 plays a critical role in controlling left-right symmetry during zebrafish somitogenesis. *Dev Dyn* 240, 2272-2280.

Janssen, N., Bergman, J.E., Swertz, M.A., Tranebjaerg, L., Lodahl, M., Schoots, J., Hofstra, R.M., van Ravenswaaij-Arts, C.M., and Hoefsloot, L.H. (2012). Mutation update on the CHD7 gene involved in CHARGE syndrome. *Hum Mutat* 33, 1149-1160.

Kapust, R.B., and Waugh, D.S. (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.

Karetsou, Z., Emmanouilidou, A., Sanidas, I., Liokatis, S., Nikolakaki, E., Politou, A.S., and Papamarcaki, T. (2009). Identification of distinct SET/TAF-Ibeta domains required for core histone binding and quantitative characterisation of the interaction. *BMC Biochem* 10, 10.

Karetsou, Z., Martic, G., Sflomos, G., and Papamarcaki, T. (2005). The histone chaperone SET/TAF-Ibeta interacts functionally with the CREB-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 322-327.

Kato, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Okuwaki, M., and Nagata, K. (2007). Histone acetylation-independent transcription stimulation by a histone chaperone. *Nucleic Acids Res* 35, 705-715.

Kato, K., Okuwaki, M., and Nagata, K. (2011). Role of Template Activating Factor-I as a chaperone in linker histone dynamics. *J Cell Sci* 124, 3254-3265.

Kawamoto, F., Fujioka, H., and 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.

Kawase, H., Okuwaki, M., Miyaji, M., Ohba, R., Handa, H., Ishimi, Y., Fujii-Nakata, T., Kikuchi, A., and Nagata, K. (1996). NAP-I is a functional homologue of TAF-I that is required for replication and transcription of the adenovirus genome in a chromatin-like structure. *Genes Cells* 1, 1045-1056.

Kemmerling, U., Cabrera, G., Campos, E.O., Inestrosa, N.C., and 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.

Khattak, S., Lee, B.R., Cho, S.H., Ahnn, J., and Spoerel, N.A. (2002). Genetic characterization of *Drosophila* Mi-2 ATPase. *Gene* 293, 107-114.

Kim, D.W., Kim, K.B., Kim, J.Y., Lee, K.S., and Seo, S.B. (2010). Negative regulation of neuronal cell differentiation by INHAT subunit SET/TAF-I β . *Biochem Biophys Res Commun* 400, 419-425.

Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., Kingston, R., and Georgopoulos, K. (1999). Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* 10, 345-355.

Kim, J.Y., Kim, K.B., Son, H.J., Chae, Y.C., Oh, S.T., Kim, D.W., Pak, J.H., and Seo, S.B. (2012a). H3K27 methylation and H3S28 phosphorylation-dependent transcriptional regulation by INHAT subunit SET/TAF-I β . *FEBS Lett* 586, 3159-3165.

Kim, J.Y., Lee, K.S., Seol, J.E., Yu, K., Chakravarti, D., and Seo, S.B. (2012b). Inhibition of p53 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-I β represses p53 activity. *Nucleic Acids Res* 40, 75-87.

Kim, M.S., Chung, N.G., Kang, M.R., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2011). Genetic and expressional alterations of CHD genes in gastric and colorectal cancers. *Histopathology* 58, 660-668.

Komatsu, K., Nakanishi, Y., Nemoto, N., Hori, T., Sawada, T., and Kobayashi, M. (2004). Expression and quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas. *Brain Tumor Pathol* 21, 105-112.

Konrad, C., Kroner, A., Spiliotis, M., Zavala-Góngora, R., and Brehm, K. (2003). Identification and molecular characterisation of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*. *Int J Parasitol* 33, 301-312.

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

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

Koziol, U., Lalanne, A.I., and 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.

Kulkarni, S., Nagarajan, P., Wall, J., Donovan, D.J., Donnell, R.L., Ligon, A.H., Venkatachalam, S., and Quade, B.J. (2008). Disruption of chromodomain helicase DNA binding protein 2 (CHD2) causes scoliosis. *Am J Med Genet A* 146A, 1117-1127.

Kunert, N., and Brehm, A. (2009). Novel Mi-2 related ATP-dependent chromatin remodelers. *Epigenetics* 4, 209-211.

Kutney, S.N., Hong, R., Macfarlan, T., and Chakravarti, D. (2004). A signaling role of histone-binding proteins and INHAT subunits pp32 and Set/TAF-Ibeta in integrating chromatin hypoacetylation and transcriptional repression. *J Biol Chem* 279, 30850-30855.

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

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

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

Larsen, D.H., Poinsignon, C., Gudjonsson, T., Dinant, C., Payne, M.R., Hari, F.J., Danielsen, J.M., Menard, P., Sand, J.C., Stucki, M., Lukas, C., Bartek, J., Andersen, J.S., and Lukas, J. (2010). The chromatin-remodeling factor CHD4 coordinates signaling and repair after DNA damage. *J Cell Biol* 190, 731-740.

Laschuk, A., Monteiro, K.M., Vidal, N.M., Pinto, P.M., Duran, R., Cerveñanski, C., Zaha, A., and Ferreira, H.B. (2011). Proteomic survey of the cestode *Mesocestoides corti* during the first 24 hours of strobilar development. *Parasitol Res* 108, 645-656.

Layman, W.S., Hurd, E.A., and Martin, D.M. (2010). Chromodomain proteins in development: lessons from CHARGE syndrome. *Clin Genet* 78, 11-20.

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

Li, M., Makkinje, A., and Damuni, Z. (1996). The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 271, 11059-11062.

Lin, J.J., Lehmann, L.W., Bonora, G., Sridharan, R., Vashisht, A.A., Tran, N., Plath, K., Wohlschlegel, J.A., and Carey, M. (2011). Mediator coordinates PIC assembly with recruitment of CHD1. *Genes Dev*, doi:10.1101/gad.17554711.

Littlewood, D.T. (2008). Platyhelminth systematics and the emergence of new characters. *Parasite* 15, 333-341.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

Loos-Frank, B. (1991). One or two intermediate hosts in the life cycle of *Mesocestoides* (Cyclophyllidea, Mesocestoididae)? *Parasitol Res* 77, 726-728.

Lorenzatto, K.R., Monteiro, K.M., Paredes, R., Paludo, G.P., da Fonsêca, M.M., Galanti, N., Zaha, A., and Ferreira, H.B. (2012). Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from *Echinococcus granulosus*: genes, expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins. *Gene* 506, 76-84.

Lutz, T., Stöger, R., and Nieto, A. (2006). CHD6 is a DNA-dependent ATPase and localizes at nuclear sites of mRNA synthesis. *FEBS Lett* 580, 5851-5857.

Lédée-Bataille, N., Bonnet-Chea, K., Hosny, G., Dubanchet, S., Frydman, R., and Chaouat, G. (2005). Role of the endometrial tripod interleukin-18, -15, and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization-embryo transfer failure. *Fertil Steril* 83, 598-605.

Marfella, C.G., and Imbalzano, A.N. (2007). The Chd family of chromatin remodelers. *Mutat Res* 618, 30-40.

Markoski, M.M., Bizarro, C.V., Farias, S., Espinoza, I., Galanti, N., Zaha, A., and Ferreira, H.B. (2003). In vitro segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. *J Parasitol* 89, 27-34.

Markoski, M.M., Trindade, E.S., Cabrera, G., Laschuk, A., Galanti, N., Zaha, A., Nader, H.B., and Ferreira, H.B. (2006). Praziquantel and albendazole damaging action on in vitro developing *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes: Cestoda). *Parasitol Int* 55, 51-61.

Matsumoto, K., Nagata, K., Ui, M., and Hanaoka, F. (1993). Template activating factor I, a novel host factor required to stimulate the adenovirus core DNA replication. *J Biol Chem* 268, 10582-10587.

McDaniel, I.E., Lee, J.M., Berger, M.S., Hanagami, C.K., and Armstrong, J.A. (2008). Investigations of CHD1 function in transcription and development of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 178, 583-587.

Minelli, A., and Fusco, G. (2004). Evo-devo perspectives on segmentation: model organisms, and beyond. *Trends Ecol Evol* 19, 423-429.

Mishra, P.K., Morris, E.G., Garcia, J.A., Cardona, A.A., and Teale, J.M. (2013). Increased accumulation of regulatory granulocytic myeloid cells in mannose receptor C type 1 deficient mice correlates with protection in mouse model of NCC. *Infect Immun.* 4, 1052-1063.

Mishra, P.K., and Teale, J.M. (2012). Transcriptome analysis of the ependymal barrier during murine neurocysticercosis. *J Neuroinflammation* 9, 141.

Monteiro, K.M., de Carvalho, M.O., Zaha, A., and Ferreira, H.B. (2010).

Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics* 10, 1985-1999.

Muto, S., Senda, M., Akai, Y., Sato, L., Suzuki, T., Nagai, R., Senda, T., and Horikoshi, M. (2007). Relationship between the structure of SET/TAF-Ibeta/INHAT and its histone chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4285-4290.

Nagata, K., Kawase, H., Handa, H., Yano, K., Yamasaki, M., Ishimi, Y., Okuda, A., Kikuchi, A., and Matsumoto, K. (1995). Replication factor encoded by a putative oncogene, set, associated with myeloid leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4279-4283.

Nagata, K., Saito, S., Okuwaki, M., Kawase, H., Furuya, A., Kusano, A., Hanai, N., Okuda, A., and Kikuchi, A. (1998). Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types. *Exp Cell Res* 240, 274-281.

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, P.D., Littlewood, D.T., Bray, R.A., and Mariaux, J. (2001). Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Mol Phylogenet Evol* 19, 443-467.

Olson, P.D., and Tkach, V.V. (2005). Advances and trends in the molecular systematics of the parasitic Platyhelminthes. *Adv Parasitol* 60, 165-243.

Ong, S.J., and Smyth, J.D. (1986). Effects of some culture factors on sexual differentiation of *Mesocestoides corti* grown from tetrathyridia in vitro. *Int J Parasitol* 16, 361-368.

Pan, M.R., Hsieh, H.J., Dai, H., Hung, W.C., Li, K., Peng, G., and Lin, S.Y. (2012). Chromodomain helicase DNA-binding protein 4 (CHD4) regulates homologous recombination DNA repair, and its deficiency sensitizes cells to poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor treatment. *J Biol Chem* 287, 6764-6772.

Park, D.W., Kim, S.S., Nam, M.K., Kim, G.Y., Kim, J., and 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.

Parkinson, J., Wasmuth, J.D., Salinas, G., Bizarro, C.V., Sanford, C., Berriman, M., Ferreira, H.B., Zaha, A., Blaxter, M.L., Maizels, R.M., and Fernández, C. (2012). Correction: A Transcriptomic Analysis of *Echinococcus granulosus* Larval Stages: Implications for Parasite Biology and Host Adaptation. *PLoS Negl Trop Dis* 6.

Parrish, J.R., Limjindaporn, T., Hines, J.A., Liu, J., Liu, G., and Finley, R.L. (2004). High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *J Proteome Res* 3, 582-586.

Paul, S., Kuo, A., Schalch, T., Vogel, H., Joshua-Tor, L., McCombie, W.R., Gozani, O., Hammell, M., and Mills, A.A. (2013). Chd5 requires PHD-mediated histone 3 binding for tumor suppression. *Cell Rep* 3, 92-102.

Peel, A., and Akam, M. (2003). Evolution of segmentation: rolling back the clock. *Curr Biol* 13, R708-710.

Polo, S.E., Kaidi, A., Baskcomb, L., Galanty, Y., and Jackson, S.P. (2010). Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *EMBO J* 29, 3130-3139.

Pouchkina-Stantcheva, N.N., Cunningham, L.J., and Olson, P.D. (2011). Spatial and temporal consistency of putative reference genes for real-time PCR in a model tapeworm. *Mol Biochem Parasitol* 180, 120-122.

Qu, D., Li, Q., Lim, H.Y., Cheung, N.S., Li, R., Wang, J.H., and Qi, R.Z. (2002). The protein SET binds the neuronal Cdk5 activator p35nck5a and modulates Cdk5/p35nck5a activity. *J Biol Chem* 277, 7324-7332.

Rajagopalan, S., Nepa, J., and Venkatachalam, S. (2012). Chromodomain helicase DNA-binding protein 2 affects the repair of X-ray and UV-induced DNA damage. *Environ Mol Mutagen* 53, 44-50.

Reiter, L., Kolstør, A.B., and Piehler, A.P. (2011). Reference genes for quantitative, reverse-transcription PCR in *Bacillus cereus* group strains throughout the bacterial life cycle. *J Microbiol Methods* 86, 210-217.

Remans, T., Smeets, K., Opdenakker, K., Mathijssen, D., Vangronsveld, J., and Cuypers, A. (2008). Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta* 227, 1343-1349.

Sambrook, J. E., Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd ed. (New York: Cold Spring Harbor).

Seo, S.B., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W.S., and Chakravarti, D. (2001). Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* 104, 119-130.

Shanks, M.O., Lund, L.M., Manni, S., Russell, M., Mauban, J.R., and Bond, M. (2012). Chromodomain helicase binding protein 8 (Chd8) is a novel A-kinase anchoring protein expressed during rat cardiac development. *PLoS One* 7, e46316.

Shikama, N., Chan, H.M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Lee, C.W., Cairns,

W., and La Thangue, N.B. (2000). Functional interaction between nucleosome assembly proteins and p300/CREB-binding protein family coactivators. *Mol Cell Biol* 20, 8933-8943.

Shimono, Y., Murakami, H., Kawai, K., Wade, P.A., Shimokata, K., and 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.

Shur, I., and Benayahu, D. (2005). Characterization and functional analysis of CReMM, a novel chromodomain helicase DNA-binding protein. *J Mol Biol* 352, 646-655.

Shur, I., Socher, R., and Benayahu, D. (2006). In vivo association of CReMM/CHD9 with promoters in osteogenic cells. *J Cell Physiol* 207, 374-378.

Sims, J.K., and Wade, P.A. (2011). SnapShot: Chromatin remodeling: CHD. *Cell* 144, 626-626.e621.

Smeenk, G., Wiegant, W.W., Vrolijk, H., Solari, A.P., Pastink, A., and van Attikum, H. (2010). The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage. *J Cell Biol* 190, 741-749.

Smith, D.B., and Johnson, K.S. (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.J.L. (1965) *Textbook of Veterinary Clinical Parasitology. Vol 1. Helminths* Philadelphia, F.A. Davis Company.

Specht, K., Haralambieva, E., Bink, K., Kremer, M., Mandl-Weber, S., Koch, I., Tomer, R., Hofler, H., Schuurin, E., Kluin, P.M., Fend, F., and Quintanilla-Martinez, L. (2004). Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels. *Blood* 104, 1120-1126.

Spiliotis, M., Konrad, C., Gelmedin, V., Tappe, D., Brückner, S., Möscher, H.U., and Brehm, K. (2006). Characterisation of EmMPK1, an ERK-like MAP kinase from *Echinococcus multilocularis* which is activated in response to human epidermal growth factor. *Int J Parasitol* 36, 1097-1112.

Spiliotis, M., Tappe, D., Brückner, S., Möscher, H.U., and Brehm, K. (2005). Molecular cloning and characterization of Ras- and Raf-homologues from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Mol Biochem Parasitol* 139, 225-237.

Tao, H., Liu, W., Simmons, B.N., Harris, H.K., Cox, T.C., and Massiah, M.A. (2010). Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *Biotechniques* 48, 61-64.

Thomas, D.G., Giordano, T.J., Sanders, D., Biermann, S., Sondak, V.K., Trent, J.C., Yu, D., Pollock, R.E., and Baker, L. (2005). Expression of receptor tyrosine kinases epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in synovial sarcoma. *Cancer* 103, 830-838.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24, 145-149.

Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garciarribio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, Tracey A, Bobes RJ, Fragoso G, Sciutto E, Aslett M, Beasley H, Bennett HM, Cai J, Camicia F, Clark R, Cucher M, De Silva N, Day TA, Deplazes P, Estrada K, Fernández C, Holland PW, Hou J, Hu S, Huckvale T, Hung SS, Kamenetzky L, Keane JA, Kiss F, Koziol U, Lambert O, Liu K, Luo X, Luo Y, Macchiaroli N, Nichol S, Paps J, Parkinson J, Pouchkina-Stantcheva N, Riddiford N, Rosenzvit M, Salinas G, Wasmuth JD, Zamanian M, Zheng Y; Taenia solium Genome Consortium, Cai X, Soberón X, Olson PD, Laclette JP, Brehm K, Berriman M. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496, 57-63.

Tsukiyama, T. (2002). The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 422-429.

Urquhart, A.J., Gatei, M., Richard, D.J., and Khanna, K.K. (2011). ATM mediated phosphorylation of CHD4 contributes to genome maintenance. *Genome Integr* 2, 1.

van Keulen, H., Loverde, P.T., Bobek, L.A., and Rekosh, D.M. (1985). Organization of the ribosomal RNA genes in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 15, 215-230.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.

Vargas, D.M., Monteiro, K. M., Teichmann, A., Zaha, A., Ferreira, H. B (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.

von Lindern, M., van Baal, S., Wiegant, J., Raap, A., Hagemeyer, A., and

Grosveld, G. (1992). Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol* 12, 3346-3355.

von Zelewsky, T., Palladino, F., Brunschwig, K., Tobler, H., Hajnal, A., and Müller, F. (2000). The *C. elegans* Mi-2 chromatin-remodelling proteins function in vulval cell fate determination. *Development* 127, 5277-5284.

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

Woodage, T., Basrai, M.A., Baxevanis, A.D., Hieter, P., and Collins, F.S. (1997). Characterization of the CHD family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11472-11477.

Xu, Z., Yang, W., Shi, N., Gao, Y., Teng, M., and Niu, L. (2010). Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of SET/TAF- β δ N from *Homo sapiens*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 66, 926-928.

Yan, J., Yuan, F., Long, G., Qin, L., and Deng, Z. (2012). Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis in *citrus*. *Mol Biol Rep* 39, 1831-1838.

Zaleśny, G., and Hildebrand, J. (2011). Molecular identification of *Mesocestoides* spp. from intermediate hosts (rodents) in central Europe (Poland). *Parasitol Res*.

Zavala-Góngora, R., Derrer, B., Gelmedin, V., Knaus, P., and Brehm, K. (2008). Molecular characterisation of a second structurally unusual AR-Smad without an MH1 domain and a Smad4 orthologue from *Echinococcus multilocularis*. *Int J Parasitol* 38, 161-176.

Zavala-Góngora, R., Kroner, A., Bernthaler, P., Knaus, P., and Brehm, K. (2006). A member of the transforming growth factor-beta receptor family from *Echinococcus multilocularis* is activated by human bone morphogenetic protein 2. *Mol Biochem Parasitol* 146, 265-271.

Zhong, H., and Simons, J.W. (1999). Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 259, 523-526.

Curriculum Vitae resumido

Costa, C. B.

Dados pessoais

Nome Caroline Borges Costa

Nascimento 07/09/1985 - Porto Alegre/RS - Brasil

Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421 Salas 204/206 Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Agronomia - Porto Alegre, 91501-970, RS – Brasil

Endereço eletrônico e-mail para contato : carol_bcosta@hotmail.com

e-mail alternativo : carol_bcosta@cbiot.ufrgs.br

Formação acadêmica/titulação

2011 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: Estudo de genes e proteínas durante o processo de estrobilização de *Mesocostoides corti*

Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira

Co-orientador: Karina Mariante Monteiro

2011 - 2012 Graduação em Ciências Biológicas-Bacharelado.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: Análise da expressão da proteína CHD no parasito cestódeo *Mesocostoides corti*

Orientador: Henrique B. Ferreira

2006 - 2010 Graduação em Ciências Biológicas- Licenciatura.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: Práticas de avaliação discente: um estudo de caso

Orientador: Russel Teresinha Dutra da Rosa

Atuação profissional

2011 - Atual Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Aluno/Pesquisador-Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Integral

2007 - 2010 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Projetos de pesquisa

2008 - 2011 Estudo de proteínas expressas em estágios larvais patogênicos de parasitos da classe Cestoda

Descrição: Identificação e caracterização de proteínas expressas diferencialmente durante o processo de estrobilização de *M. corti*.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (2); Doutorado (1);

Integrantes: Caroline Borges Costa Karina Mariante Monteiro; Arnaldo Zaha; Henrique Bunselmeyer Ferreira

2006 - 2010 Estudo de genes e proteínas expressos diferencialmente nos cestódeos *Echinococcus granulosus* e *Mesocestoides corti*

Descrição: Identificação e caracterização de proteínas expressas no estágio larval patogênico (cisto hidático) de *E. granulosus* com o objetivo de definir melhor o perfil de genes e proteínas expressos na fase patogênica do parasito, fornecendo subsídios importantes para uma melhor caracterização da sua fisiologia e de suas interações com o hospedeiro. Identificar e caracterizar genes e proteínas potencialmente envolvidos no processo de estrobilização de *M. corti*.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (1); Mestrado acadêmico (2);

Doutorado (3); Integrantes: Caroline Borges Costa Karina Mariante Monteiro;

Henrique Bunselmeyer Ferreira; Alice Laschuk; Cristiano Valim Bizarro;

Veridiana Gomes Virginio; Marcos Oliveira De Carvalho; Luciana Gutterres De

Azevedo.

Prêmios e títulos

2010 Destaque na Sessão GENÉTICA MOLECULAR I no evento XXII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Produção em C, T& A

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. COSTA, C. B., Santos, J. H., Monteiro, K. M., Zaha, A., Ferreira, H. B. CHD and SET/TAF differential expression during *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes, Cestoda) strobilation

XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro.

2. COSTA, C. B., Monteiro, K. M., Zaha, A., Ferreira, H. B.

Expressão diferencial de uma cromodomínio-helicase de *Mesocestoides corti* ao longo do processo de estrobilização.

XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2011, São Paulo.

3. COSTA, C. B., Monteiro, K. M., Zaha, A., Ferreira, H. B.
Chromodomain-helicase differential expression in *Mesocestoides corti*
XXXIX Annual Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2010, Foz do Iguaçu.

4. COSTA, C. B.
Expressão diferencial da proteína CHD no parasito cestódeo *Mesocestoides corti*, 2010. Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Cidade: Porto Alegre;
XXII Salão de Iniciação Científica Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

5. COSTA, C. B., Zaha, A., Monteiro, K. M., Ferreira, H. B.
Caracterização de proteínas diferencialmente expressas durante o desenvolvimento de *Mesocestoides corti*, 2009. Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Cidade: Porto Alegre; Evento: Inst.promotora/financiadora: Pró-reitoria de Pesquisa na Universidade Federal do Rio Grande do Sul
XXI Salão de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

6. COSTA, C. B., Monteiro, K. M., BENITZ, A. N., Zaha, A., Ferreira, H. B.
Estudo da Expressão de proteínas potencialmente envolvidas no desenvolvimento de *Mesocestoides corti* (PLATYHELMINTHES, CESTODA), 2009.
XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2009, Foz do Iguaçu, Paraná.

7. COSTA, C. B., Monteiro, K. M., Zaha, A., Ferreira, H. B.
Estudo da expressão de proteínas ortólogas da hindisight e da X-box binding protein durante a estrobilização de *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes, Cestoda), 2008. Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Cidade: Porto Alegre;
XX Salão de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Pró-reitoria de pesquisa- PROPESQ

8. COSTA, C. B., LASCHUK, A., Zaha, A., Ferreira, H. B.
Clonagem de cDNAs codificadores de proteínas de *Mesocestoides corti* ortólogas das proteínas Hindsight e da X-box binding protein-1, 2007.; Local: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Cidade: Porto Alegre
XIX Salão de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Pró-Reitoria de Pesquisa- PROPESQ.