

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Bacharelado em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso

**Análise da expressão do gene *MK2* ao longo do processo de
estrobilização de *Mesocestoides corti***

Bárbara Machado Marques

Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, junho de 2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Bacharelado em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso

Análise da expressão do gene *MK2* ao longo do processo de estrobilização de *Mesocestoides corti*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia com Habilitação em
Biotecnologia Molecular

Bárbara Machado Marques

Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, junho de 2016

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia da UFRGS, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Olício e Elisângela, e à minha irmã Bibiana, que apesar da distância, sempre confiaram em mim e apoiaram todas as minhas decisões, dando todo o suporte que eu precisava para concluir a minha graduação.

Ao meu namorado Daniel, que sempre me motivou a ser cada vez melhor, por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava, por sempre me dar forças para eu ir além do meu limite, por todo o seu apoio e carinho. Não há palavras para dimensionar toda a tua importância durante estes anos.

Ao meu orientador Prof^o Henrique B. Ferreira, pelo voto de confiança ao me incluir em seu grupo de pesquisa e por todos os ensinamentos durante este período.

À Tatiana Basika, por toda a dedicação e companheirismo neste período, por estar sempre disposta a ajudar e principalmente por toda a paciência em ensinar, mesmo quando era preciso mais de uma explicação.

Aos colegas de laboratório, em especial à Edileuza, por estarem sempre dispostos a ajudar uma aluna de iniciação científica perdida.

Aos colegas de graduação Karina, Solon, Gabriela, Alexia, Bárbara e Isadora, por todos os momentos felizes que vocês me proporcionaram durante estes quatro anos, que foram essenciais para aliviar as preocupações e dificuldades da graduação. E principalmente à Eduarda, pela amizade que construímos desde o primeiro dia na graduação.

RESUMO

Proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs, de *mitogen-activated protein kinases*) são serino/treonino-proteína-quinases que realizam a conversão de estímulos extracelulares em uma variedade de respostas celulares. MAPKs estão entre os componentes de algumas das principais e mais conservadas rotas de transdução de sinais que regulam muitos processos fisiológicos, incluindo a progressão do ciclo celular, a migração celular, a organização do citoesqueleto e o remodelamento da cromatina. Estudos moleculares envolvendo platelmintos da classe Cestoda têm demonstrado que as MAPKs possuem um papel fundamental no desenvolvimento destes organismos. Análises transcritômicas preliminares realizadas pelo nosso grupo, evidenciaram a expressão diferencial do gene que codifica uma proteína da família das MAPKs chamada MAPK-proteína-quinase ativada (MK2) entre os estágios larval e adulto do cestódeo *Mesocestoides corti*, sugerindo seu possível envolvimento na regulação do desenvolvimento deste parasito. *M. corti* é uma espécie-modelo para o estudo da classe Cestoda, utilizado inclusive para a investigação do processo de diferenciação da larva (tetratirídeo) no verme adulto, chamado de estrobilização. Platelmintos cestódeos são agentes etiológicos de parasitoses importantes (cestodíases), tanto em seres humanos como em animais, causando doenças como a hidatidose e a cisticercose. Assim, o estudo de aspectos básicos da biologia destes parasitos é importante para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle de cestodíases. O objetivo geral deste trabalho é a investigação do possível envolvimento da MK2 de *M. corti* em uma rota de sinalização de MAPKs, que pode regular o processo de estrobilização deste parasito. A sequência codificadora da McMK2 foi amplificada por PCR e clonada por recombinação homóloga *in vivo* no vetor de expressão em pGEX-4T1-TEV. O plasmídeo recombinante construído foi então utilizado para a transformação genética de células de *Escherichia coli* BL21-CodonPlus-RP. As condições de expressão da McMK2 recombinante (rMcMK2) foram otimizadas e a proteína recombinante foi purificada para utilização na imunização de coelhos e produção de anticorpos policlonais monoespecíficos. Tais anticorpos serão posteriormente utilizados em experimentos de imunolocalização, para avaliação dos padrões de expressão espaciais e temporais da McMK2 em diferentes estágios do desenvolvimento estrobilar de *M. corti*. Os níveis de expressão do gene *McMK2*, codificador da McMK2, foram investigados por meio de RT-qPCR. Uma diminuição

significativa na expressão do gene *McMK2* foi observada no verme estrobilado, em comparação com a expressão em tetratirídeos, sugerindo que esta proteína pode estar envolvida com a regulação da estrobilização de *M. corti*.

ABSTRACT

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are serine/threonine-protein kinases that convert extracellular stimuli into a variety of cellular responses, participating of some of the major and most conserved signal transduction pathways and regulating many physiological processes. Molecular studies involving parasite platyhelminthes of the Cestoda class (cestodes), have reported the importance of MAPKs on the development of these parasites. Previous transcriptomics studies carried out with *Mesocestoides corti*, a cestode parasite, to search for differentially expressed genes between larvae (tetrathyridia) and adult (proglottized and segmented) worms allowed to identify a *M. corti* gene that codes for a possible ortholog of a vertebrate MAPK-activated protein kinase 2 (MK2), also a component of MAPK signal pathways. *M. corti*, is an useful experimental model to investigate the cestode developmental processes, such as those involved in the transition of the larval to the adult worm stage, which is called strobilation. Cestodes are etiological agents of important helminthiases, such as hydatidosis and cysticercosis, which affect both humans and animals. The study of basic aspects of cestode biology is important for the development of new strategies for prevention and control of helminthiases. The aim of this work is to investigate the possible involvement of *M. corti* MK2 (McMK2) in MAPK signal transduction pathways that might regulate the strobilation process of this parasite. The McMCK2 coding sequence was amplified by RT-PCR and cloned into the pGEX-4T1-TEV plasmid by *in vivo* homologous recombination in *Escherichia coli* KC8 cells. *E. coli* KC8 transformed cells were analyzed by PCR in order to identify colonies carrying the recombinant construction (pGEX-McMK2). *E. coli* strain BL21-CodonPlus-RP were transformed with pGEX-McMK2 plasmid used for the expression of the recombinant McMCK2 protein (rMcMK2). Different induction conditions with different concentrations of isopropyl- β -D-1thiogalactopyranoside (IPTG), incubation times and temperatures were evaluated in order to optimize rMcMK2 heterologous expression, which was evaluated by SDS-PAGE. The rMcMK2 was expressed and purified, free of the GST moiety, by affinity

chromatography coupled with TEV digestion. Rabbits will be immunized with the purified rMcMK2 in order to produce monospecific polyclonal antibodies against McMCK2. The anti-McMK2 antibodies produced will be used in immunolocalization experiments, to assess the spatial and temporal expression patterns of McMCK2 along *M. corti* strobilar development. The transcriptional levels of McMCK2 encoding gene (McMK2) were investigated by qPCR. A significant decrease of the expression levels of the *McMK2* gene was observed on strobilated stage, compared with tetrathyridia. This results suggests a possible involvement of this protein at regulation of the *M. corti* strobilation process.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs)	1
1.2 Envolvimento de MAPKs no desenvolvimento de platelmintos cestódeos	2
1.3 MAPK proteína-quinase ativada 2 (MK2)	4
1.4 <i>Mesocostoides corti</i> , organismo modelo para estudo dos cestódeos	5
2. JUSTIFICATIVAS.....	8
3. OBJETIVOS	8
3.1. Objetivo Geral.....	8
3.2. Objetivos Específicos	8
4. MATERIAIS E MÉTODOS	9
4.1. Manutenção de estoques <i>in vivo</i> e cultivo <i>in vitro</i> de <i>M. corti</i>	9
4.2 Análise eletroforética de DNA e RNA em géis de agarose	9
4.3. Análise eletroforética de proteínas em géis de poliacrilamida-SDS.....	10
4.4 Extração de RNA e síntese de cDNA	10
4.5. Amplificação e clonagem da sequência codificadora da McMK2	10
4.6. Expressão e purificação de McMK2 recombinante	12
4.7. RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5.1. Análises <i>in silico</i> da proteína McMK2	14
5.2. Amplificação e clonagem da sequência codificadora da McMK2	16
5.3. Padronização das condições de expressão da rMcMK2-GST	17
5.4. Expressão e purificação da rMcMK2	19
5. Análise do padrão de expressão temporal do gene <i>McMK2</i>	20
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Modelo de uma rede de sinalização de MAPKs	2
Figura 2 Representação esquemática da via de sinalização de EmMKP1	3
Figura 3 Representação estrutural da cadeia total da MK2 de humanos	4
Figura 4 Representação do provável ciclo de vida de <i>M. corti</i>	6
Figura 5 Mapa do vetor pGEX-4T1-TEV	12
Figura 6 Alinhamento múltiplo de sequências ortólogas à McMK2.....	15
Figura 7 Estrutura tridimensional da proteína McMK2	15
Figura 8 Análise eletroforética dos amplicons da McMK2 com iniciadores primários e secundários	16
Figura 9 Análise eletroforética dos produtos da PCR de colônia da clonagem da sequência da McMK2	16
Figura 10 Avaliação da expressão da rMcMK2-GST sob indução com diferentes concentrações de IPTG	17
Figura 11 Avaliação da expressão da rMcMK2-GST sob indução em diferentes tempos	18
Figura 12 Avaliação da expressão da rMcMK2-GST sob indução em diferentes temperaturas	18
Figura 13 Avaliação da expressão e purificação da rMcMK2 recombinante	19
Figura 14 Média dos níveis de expressão de <i>McMK2</i>	20
Figura 15 Média dos níveis de expressão de <i>McMK2</i> e <i>McSET/TAF</i>	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Iniciadores utilizados para amplificação e clonagem das sequências de <i>M. corti</i>	11
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- BAEE:** 10⁵ benzoilarginina-etil-éter
- cDNA:** DNA complementar
- DNA:** ácido desoxirribonucleico
- EDTA:** ácido etilenodiaminotetracético
- EmMPK1:** proteína ERK de *Echinococcus multilocularis*
- ERK:** proteína quinase extracelular-regulada
- GST:** glutationa-S-transferase
- HsMK2:** proteína MK2 humana
- IPTG:** isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
- JNK:** proteína-quinase c-JUN N-terminal
- kDa:** quilodalton(s)
- MAPK:** proteína-quinase ativada por mitógenos
- MAPKAPK:** MAPK- proteína-quinase ativada
- McMK2:** proteína MK2 de *Mesocestoides corti*
- miRNAs:** micro RNAs
- MK2:** proteína MAPK-proteína-quinase ativada 2
- MKK:** proteína MAPK-quinase
- MKKK:** proteína MAPK-quinase-quinase
- NES:** sítio para exportação nuclear, do inglês *nuclear export signal* = em português
- NLS:** sítio para localização nuclear, do inglês *nuclear localization signal*
- pb:** pares de bases
- PCR:** reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*
- pH:** potencial hidrogeniônico
- rMcMK2:** proteína MK2 de *Mesocestoides corti* recombinante
- rMcMK2-GST:** proteína rMcMK2 fusionada à proteína GST
- RNA:** ácido ribonucleico
- RNAseq:** sequenciamento de alta performance de RNAs

RT: do inglês, reverse transcription

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

SMART: *Simple Modular Architecture Research Tool*

TEV: do inglês, *tobacco etch virus*

Tm: temperatura de fusão dos iniciadores

UV: luz ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

1.1 Proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs)

Proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs, do inglês *mitogen-activated protein kinases*) são serino-treonino-proteína-quinases que realizam a fosforilação de seus próprios resíduos de serina e treonina (autofosforilação) ou ativam e inativam seus substratos (Peti *et al.*, 2013). MAPKs estão presentes nas principais rotas eucarióticas de transdução de sinais e atuam na mediação de muitos processos fisiológicos, em resposta à estímulos extracelulares como citocinas, fatores de crescimento, antígenos, toxinas, drogas, formato celular, aderência à matriz extracelular e interações entre células. A ativação de MAPKs em resposta a estes estímulos contribui para o controle da transcrição, proliferação, desenvolvimento, apoptose, motilidade e muitas outras respostas celulares (Johnson *et al.*, 2011; Peti *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2016) (Figura 1). Para controlar tantas respostas biológicas, MAPKs são ativadas e inativadas com acuracidade espacial e temporal dentro da célula. A perda desta regulação espaço-temporal, por mutações ou expressão alterada de proteínas que regulam as MAPKs, pode levar ao desenvolvimento de câncer, doenças neurodegenerativas, inflamações e defeitos no desenvolvimento (Johnson *et al.*, 2011).

As cascatas de sinalização de MAPKs são compostas por pelo menos três tipos de quinases: as MAPK quinases quinases (MAP3Ks ou MKKKs), as MAPK quinases (MAP2Ks ou MKKs) e as MAPKs. Em geral, os sinais recebidos pelos receptores celulares são transduzidos para MKKKs, gerando eventos subsequentes de fosforilações. As MKKKs ativam MKKs pela fosforilação de dois resíduos serina/treonina (S/T-XXXXX-S/T, aonde X representa um aminoácido qualquer). As MKKs ativadas fosforilam MAPKs em resíduos de treonina e/ou tirosina, no motivo T-X-Y. Fosforiladas, as MAPKs transduzem os sinais recebidos para diversas moléculas efetoras, regulando sua atividade funcional, *turnover* e localização (Johnson *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2016) (Figura 1).

Em mamíferos, existem três rotas de MAPKs bem caracterizadas: as quinases extracelular-reguladas 1 e 2 (ERK 1/2, do inglês *extracellular-regulated kinase*), as quinases N-terminais c-JUN 1, 2 e 3 (JNK 1/2/3, do inglês *c-JUN N-terminal kinase*) e as p38 MAPK α , β , δ e γ . As ERK 1/2, são ativadas em resposta à fatores de crescimento,

hormônios e estímulos pró-inflamatórios, enquanto as JNK 1/2/3 e as p38 MAPK α , β , δ e γ são ativadas por estresses celulares e ambientais, além de estímulos pró-inflamatórios (Owens *et al.*, 2007; Kyriakis *et al.*, 2012).

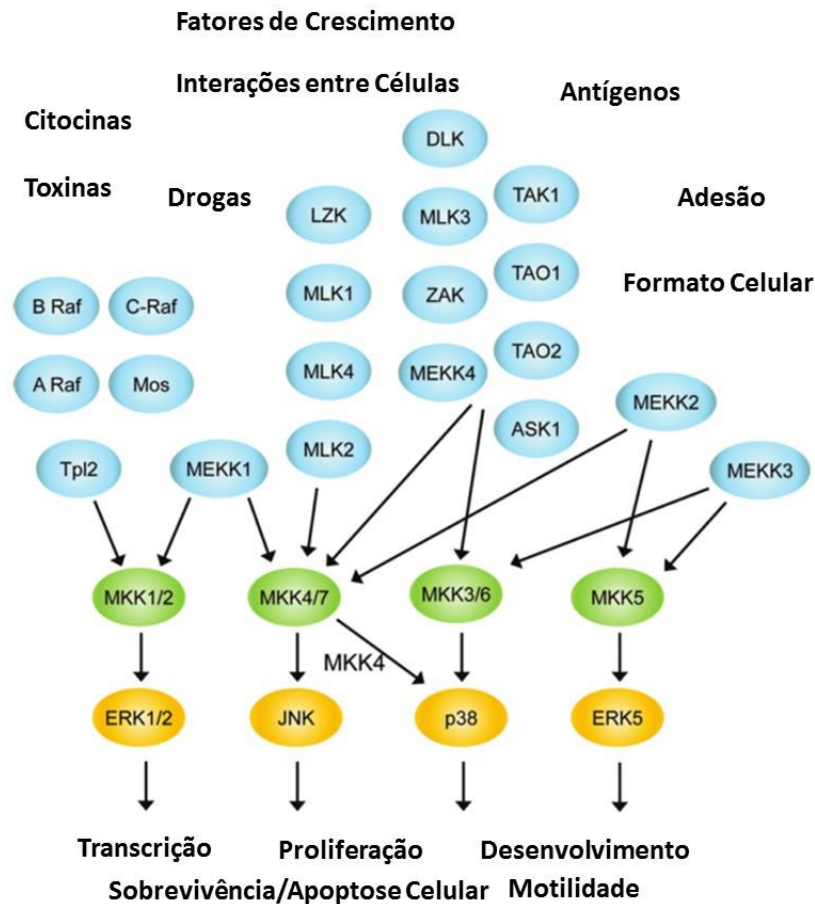


Figura 1: Modelo de uma rede de sinalização de MAPKs. Estão representadas em azul as MKKs, em verde as MKKs e em amarelo as MAPKs. Por meio de um interatoma de MAPKs, diferentes estímulos são transduzidos em diferentes respostas celulares. Adaptado de Johnson *et al.* (2011).

1.2 Envolvimento de MAPKs no desenvolvimento de platelmintos cestódeos

Estudos moleculares envolvendo cascatas de sinalização de MAPKs em platelmintos são fundamentais. Devido ao papel decisivo das rotas de MAPKs na regulação de mecanismos importantes como a proliferação, apoptose e diferenciação celular, é possível que rotas de quinases ortólogas à mamíferos estejam envolvidas no processo de desenvolvimento destes parasitos (Gelmedin *et al.*, 2010). Neste contexto, estudos de identificação e caracterização de MAPKs de cestódeos vem sendo desenvolvidos. Em *Echinococcus multilocularis*, uma quinase ortóloga à ERK de mamíferos foi identificada (EmMPK1). A partir da caracterização estrutural e funcional,

foi evidenciado que esta proteína é constitutivamente expressa ao longo de um estágio de desenvolvimento deste parasito, desde o cisto hidático (metacéstódeo) ao protoscolex. Também demonstrou-se que a EmMPK1 é responsiva à estímulos externos do hospedeiro, mediando o desenvolvimento de *E. multilocularis* (Spiliotis *et al.*, 2006). Em outros estudos deste mesmo grupo, foram caracterizadas outras duas quinases pertencentes à esse parasito, que compõem a mesma via de sinalização de EmMKP1 (Figura 2). Além da EmMKP1, fazem parte desta via as quinases EmRAF (do inglês, *virus-induced rapidly accelerated fibrosarcoma*), que pertence à família das MKKKs, e a EmMCK2 (do inglês, *mitogen-activated protein kinase kinase 2*), que pertence à família das MKKs (Spiliotis *et al.*, 2005; Gelmedin *et al.*, 2010). Um estímulo do hospedeiro, como fatores de crescimento, ativa a via de sinalização pela fosforilação de EmRAF, gerando a transdução de sinal, por consecutivas fosforilações de EmMCK2 e EmMPK1 (Gelmedin *et al.*, 2010).

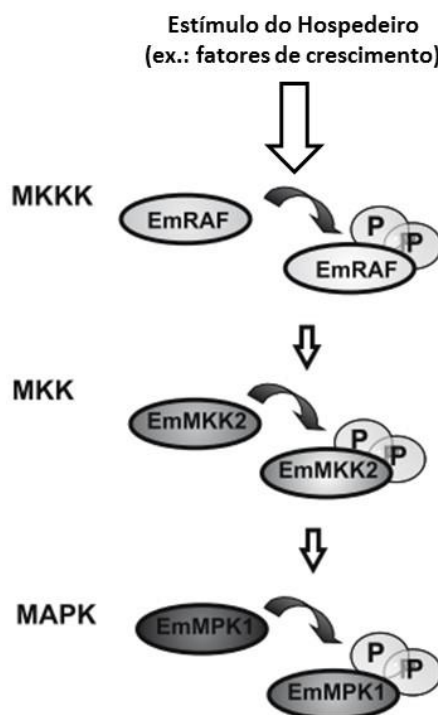


Figura 2: Representação esquemática da via de sinalização de EmMPK1. Adaptado de Gelmedin *et al.* (2010).

Outro trabalho envolvendo o estudo de MAPKs e o desenvolvimento de cetódeos foi realizado em *Taenia crassiceps*. Comprovou-se que a quinase ERK-like está diretamente envolvida com o desenvolvimento reprodutivo deste parasito. Neste

organismo, a via de sinalização de ERK-like é ativada pelo hormônio 17 β -estradiol, secretado pelo hospedeiro (Escobedo *et al.*, 2010).

1.3 MAPK proteíno-quinase ativada 2 (MK2)

MAPK proteíno-quinase ativada 2 (MK2, do inglês *MAPK-activated protein kinase 2*), pertence à família das MAPKAPK (do inglês *MAPK-activated protein kinase*), que são ativadas por MAPKs. Em mamíferos, a MK2 é ativada pela MAPK p38 em resposta a condições de estresse, como irradiação UV, choque térmico, estresse oxidativo, hiperosmolaridade e diversas citocinas. Uma vez ativada, a MK2 regula processos como produção de citocinas, migração celular, remodelamento da actina, controle do ciclo celular e a expressão de genes (Cargnello *et al.*, 2011).

A MK2 de humanos possui 400 aminoácidos e dois sítios para fosforilação nos resíduos Tyr²²² e Tyr³³⁴. A região C terminal possui um sítio para localização nuclear (NLS, do inglês *nuclear localization signal*) (Lys-Lys-Xaa₁₀-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys). Este sítio NLS se localiza ao redor de um domínio D (do inglês, *docking*), que faz a mediação de interações entre a MK2 e as isoformas p38 α e p38 β (Smith *et al.*, 2000). A MK2 também possui um sítio para exportação nuclear (NES, do inglês *nuclear export signal*) (Met-Thr-Ser-Ala-Leu-Ala-Thr-Met-Arg-Val), localizado entre o domínio quinase e os sítios NLS e D (Ben-Levy *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 2002) (Figura 3).

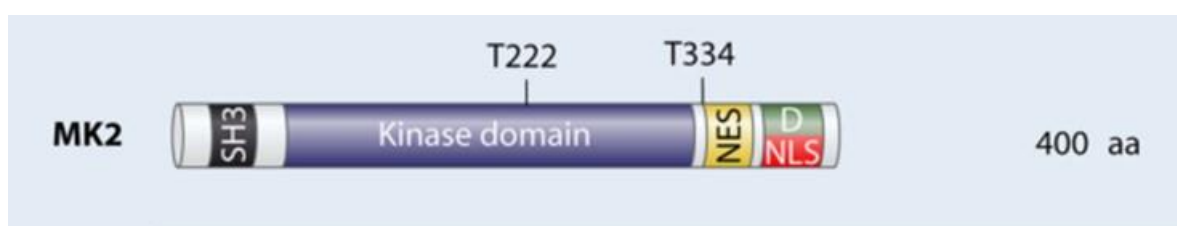


Figura 3: Representação estrutural da cadeia total da MK2 de humanos Os sítios de fosforilação estão marcados pelo aminoácido e a posição na qual são fosforilados. NES (do inglês *nuclear export signal*), sítio para exportação nuclear; NLS (do inglês *nuclear localization signal*), sítio de localização nuclear; D (do inglês *docking*) domínio D; SH3 (do inglês *Src homology 3 domain*) Adaptado de Cargnello *et al.* (2011).

A MK2 se localiza predominantemente no núcleo. Sobre condições de estresse esta proteína é rapidamente exportada para o citoplasma da célula (Engel *et al.*, 1998; Neufeld *et al.*, 2000). Este transporte para o citoplasma é aparentemente mediado pela fosforilação do domínio quinase, uma vez que a mutação fosfomimética em Tyr³³⁴

aumenta a localização citoplasmática desta proteína (Engel *et al.*, 1998). Por esta razão, é possível afirmar que a MK2 possui o sítio NLS constitutivamente ativo e o sítio NES regulado por fosforilação (Cargnello *et al.*, 2011).

Apesar da recorrente associação da MK2 à regulação de processos desencadeados por estresses, estudos também têm demonstrado o envolvimento desta proteína no desenvolvimento de organismos. Holloway *et al.*, (2009) identificou a MK2 em *Danio rerio* (zebrafish) e comprovou uma função modulatória desta quinase no processo de morfogênese de embriões. Neste organismo, a MK2 previne a constrição prematura de blastósporos, observada em mutantes para o gene *MK2*.

Em nosso grupo de estudo, bibliotecas de cDNA enriquecidas com sequências expressas pelos estágios larval (tetratirídeo) e adulto (verme estrobilizado) do cestódeo *Mesocestoides corti*, foram construídas. Por meio de análises de microarranjos de DNA, foi possível identificar genes diferencialmente expressos entre os dois estágios de desenvolvimento analisados (Bizarro *et al.*, 2005). Nesta análise, a sequência codificadora da MK2 foi identificada como diferencialmente expressa, sugerindo um possível envolvimento desta proteína no desenvolvimento estrobilar de *Mesocestoides corti*.

1.4 *Mesocestoides corti*, organismo modelo para estudo dos cestódeos

Mesocestoides corti é um platelminto endoparasita da classe Cestoda, a mesma classe da qual pertencem representantes dos gêneros *Echinococcus* e *Taenia*, que possuem relevância médica e veterinária. Este organismo pertence à ordem Cyclophyllidae, a qual é composta principalmente por parasitos de aves e mamíferos, raramente ocorrendo em répteis e anfíbios. *M. corti* é um organismo-modelo para diversos aspectos biológicos de cestódeos (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 (Cabrera *et al.*, 2010; Mishra & Teale, 2012, 2013). A capacidade da forma larvária (tetratirídeos) de *M. corti* de se multiplicar assexuadamente tanto *in vivo* (especialmente em ratos e camundongos) quanto *in vitro* (Markoski *et al.*, 2003), torna esta espécie muito útil como modelo para o estudo do desenvolvimento dos cestódeos (Espinoza *et al.*, 2005). Além

disso, sua manipulação é segura, uma vez que *M. corti*, diferente de 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 tetratrídeos (Fuentes *et al.*, 2003).

Este parasito apresenta um ciclo de vida complexo (Figura 4), 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. 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 tetratrídeo, estágio larval capaz de reprodução assexuada por fissiparidade ou brotamento. Já no seu hospedeiro definitivo o verme é capaz de reprodução assexuada por divisão longitudinal do escólex e sexual por fecundação cruzada que dá origem a novas proglótides grávidas, reiniciando o ciclo.

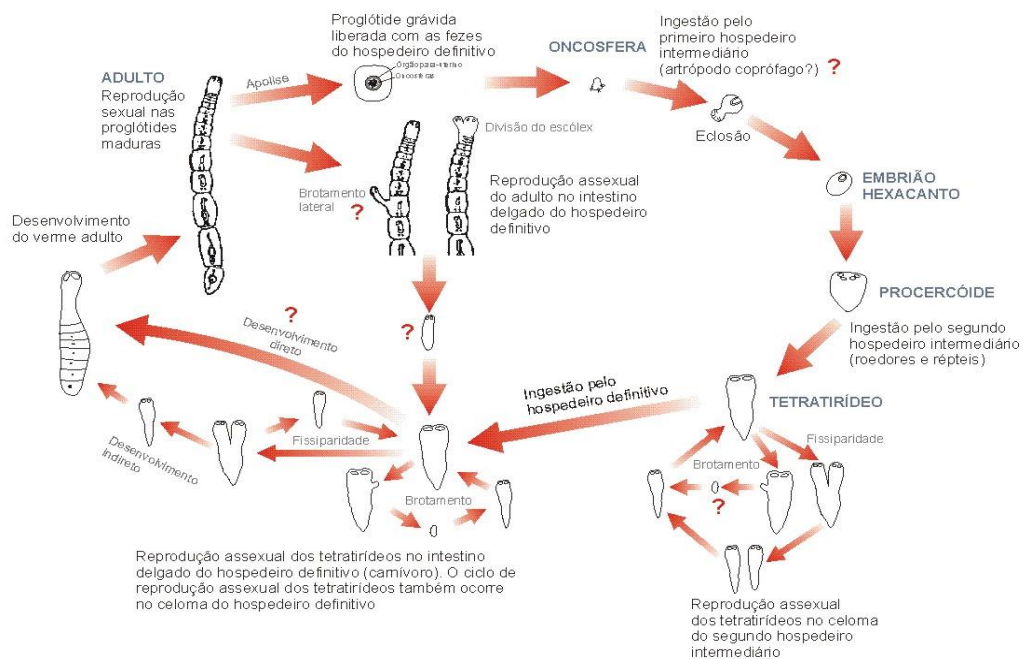


Figura 4: Representação do provável ciclo de vida de *M. corti* (figura cedida por H. B. Ferreira).

Uma das etapas do ciclo de vida de *M. corti* que tem sido foco de estudo é a estrobilização. Esta etapa é caracterizada pela passagem da fase de tetratrídeo (metacestódeo) para a fase adulta, envolve o alongamento e segmentação corporal,

concomitantemente com a maturação dos órgãos sexuais (Olson *et al.*, 2001, 2005). Um sistema de cultura para indução da estrobilização deste organismo já está padronizado pelo nosso grupo. A adição de tripsina ao meio de cultura foi comprovadamente capaz de induzir os processos de segmentação e diferenciação sexual *in vitro* (Markoski *et al.*, 2003; Espinoza *et al.*, 2005). Porém, ainda é necessário o desenvolvimento de estudos que caracterizem os processos moleculares envolvidos na regulação da estrobilização (Espinoza *et al.*, 2005; Koziol *et al.*, 2010). Neste sentido, Costa *et al.* (2015) caracterizou o padrão de expressão espacial e temporal da proteína SET/TAF-1 β , propondo a utilização desta proteína como marcador molecular do desenvolvimento estrobilar de *M. corti*. Basika *et al.* (submetido) reportou, pela primeira vez, perfis de expressão de micro RNAs (miRNAs) entre os estágios tetratirídeo e verme estrobilado de *M. corti*, evidenciando miRNAs estágio-específicos e diferencialmente expressos ao longo da estrobilização.

2. JUSTIFICATIVAS

Parasitas cestódeos que infectam seres humanos e animais domésticos são alvos de investigação científica, com ênfase para a busca de formas mais eficientes de prevenção, diagnóstico e tratamento das enfermidades causadas por eles (Armua-Fernandez *et al.*, 2011; Cardona *et al.*, 2013). Porém tais esforços visando ao controle de cestodíases têm apresentado resultados bastante limitados (Brunetti *et al.*, 2011; Barnes *et al.*, 2012). O insucesso de programas de prevenção e controle de cestodíases deve-se, em parte, à escassez de conhecimentos sobre a biologia do desenvolvimento destes parasitos e sobre aspectos moleculares das interações parasito-hospedeiro. Por isso, o estudo de aspectos moleculares básicos da biologia de cestódeos representa uma etapa essencial para a ampliação do número de proteínas parasitárias identificadas e caracterizadas a sua expressão e função. Tais proteínas poderão servir como marcadores moleculares de processos de desenvolvimento, como novos antígenos para imunodiagnóstico ou como potenciais alvos para intervenção terapêutica. Sua caracterização funcional proporcionará uma melhor compreensão de estratégias de sobrevivência e de processos de desenvolvimento de estágios larvais patogênicos do parasito, o que fornecerá subsídios adicionais para a elaboração de novas estratégias de prevenção e controle de cestodíases.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi a investigação do padrão de expressão espacial e temporal do gene *McMK2* e dos produtos codificados por ele, a fim de elucidar outros processos moleculares envolvidos com a estrobilização de *M. corti*.

3.2. Objetivos Específicos

- (i) Expressão heteróloga da *McMK2* e produção da proteína recombinante;
- (ii) Análise do padrão de expressão temporal da *McMK2* durante a estrobilização;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Manutenção de estoques *in vivo* e cultivo *in vitro* de *M. corti*

Os procedimentos para manutenção de estoques de tetratirídeos *in vivo*, em hospedeiros experimentais (camundongos) e para o cultivo de tetratirídeos e a indução e acompanhamento do processo de estrobilização *in vitro* foram realizados como descrito por Markoski *et al.* (2003). A manutenção de estoques *in vivo* foi realizada a partir da injeção intraperitoneal de tetratirídeos em camundongos *Mus musculus*, linhagem BALB/c. Após três meses de infecção, os camundongos foram eutanasiados e os tetratirídeos foram aspirados da cavidade abdominal de cada animal. Inicialmente, os tetratirídeos foram mantidos em meio RPMI 1640 (Cultilab) a 37°C, em atmosfera com 5% CO₂, por 24 h, e posteriormente, foram transferidos para meio suplementado com 20% de SFB (RPMI/SFB). Todos os procedimentos com camundongos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS (projeto: Estudo de Aspectos Moleculares da Biologia de platelmintos parasitas da classe Cestoda, nº 21625) e foram realizados de acordo com as normas vigentes.

Para indução da estrobilização, os tetratirídeos foram pré-incubados em meio contendo tripsina (10⁵ BAEE/ml) a 39°C, durante 24 h. Após os tetratirídeos foram mantidos em RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, com trocas de meio cada 48 h. Após aproximadamente 9 dias (tempo necessário para que ocorra a estrobilização completa), os parasitos foram retirados do meio e estocados em Trizol (Invitrogen) a -80°C. As amostras obtidas foram utilizadas para extração de proteínas (seção 5.3) ou de RNA (Seção 5.4).

4.2 Análise eletroforética de DNA e RNA em géis de agarose

Para visualização de amostras de DNA e RNA, foram utilizados géis de agarose 1% e 0,8%, em tampão TBE 1X (2,5 mM EDTA, 89 mM ácido bórico 89 mM, Tris-HCl-pH 8,3) e corado com GelRed. As amostras eram resolvidas em uma cuba eletroforética horizontal (BioRad), com TBE 1X, em uma voltagem constante de 90 V. A visualização das bandas era feita sob luz ultravioleta e fotodocumentadas pelo aparelho Gel Doc XR (BioRad).

4.3. Análise eletroforética de proteínas em géis de poliacrilamida-SDS

Para a visualização de amostras proteicas, foram utilizados géis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) 12%. As amostras eram resolvidas em uma cuba eletroforética vertical (BioRad), com o tampão Tris-glicina/SDS (250 mM Tris-Cl; 1,92 mM glicina; 1% SDS; pH 8,3) e com uma voltagem constante de 100 V. Às amostras a serem analisadas eram adicionados 0,2 volume 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. 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.

4.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

RNA total de quatro estágios de desenvolvimento de *M. corti* (TT, 24H, 48H e ST) foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) e posteriormente tratado com DNase I. A síntese de cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fornecedor. Os cDNAs obtidos foram utilizados para a realização dos experimentos de análise dos padrões de expressão da McMK2 por RT-qPCR (Seção 5.7).

4.5. Amplificação e clonagem da sequência codificadora da McMK2

Para a amplificação do cDNA do gene *McMK2*, iniciadores específicos foram projetados com base na sequência do gene correspondente (MCOS_0000001001). Os cDNAs gerados foram novamente amplificados utilizando-se iniciadores específicos contendo 25 nt homólogos ao vetor de expressão plasmidial de expressão pGEX-4T1-TEV (Costa *et al.*, 2015) (Tabela 1 - MAPK2). Em uma segunda etapa de amplificação, foram acrescentadas às extremidades do amplicon inicial 25 nt adicionais, homólogos à região de clonagem do vetor de expressão, utilizando iniciadores específicos (Tabela 1 – recII).

O amplicon obtido nas etapas de amplificação anteriores foi então clonado no vetor por recombinação homóloga *in vivo*, em células de *Escherichia coli* KC8, segundo protocolo descrito por Parrish *et al.* (2004). O plasmídeo pGEX-4T1-TEV (Figura 5) é

derivado do vetor de expressão pGEX-4T1 (Amersham Biosciences), porém foi modificado para incluir a sequência codificadora do sítio de clivagem da protease do *tabaco etch virus* (TEV). Para a recombinação homóloga *in vivo*, o vetor foi linearizado, por clivagem com a endonuclease de restrição *XhoI* (Promega) e defosforilado com a enzima fosfatase alcalina de camarão (SAP, GE Healthcare). Os plasmídeos clivados foram separados por eletroforese em gel de agarose e purificados através do kit de purificação DNA GFX (GE Healthcare). Células de *E. coli* KC8 foram transformadas por choque térmico com 50 ng do vetor pGEX-4T1-TEV 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 o choque térmico, as células foram incubadas em 1 ml de meio Luria Bertani (LB) a 37°C por 1 h e plaqueadas em meio seletivo com antibióticos. A identificação dos clones recombinantes foi feita por PCR das colônias obtidas, utilizando iniciadores específicos para o vetor pGEX-4T1-TEV (Tabela 1 – pGEX-Alt). Uma vez inserida no plasmídeo, a sequência codificadora da McMK2 tem a sua expressão controlada pelo promotor *tac*, induzido na presença de IPTG. O produto gerado pela indução deste promotor é traduzido em uma proteína de fusão com GST (rMcMK2-GST), que possui um peso molecular total de aproximadamente 68 kDa.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação e clonagem das sequências de *M. corti*. Em (D) iniciador direto e (R) iniciador reverso. As sequências nucleotídicas específicas às sequências-alvo encontram-se em negrito, e as sequências nucleotídicas em homologia ao vetor estão demonstradas em letras maiúsculas sem negrito.

Oligos	Sequências	T _m (°C)
MK2	D: 5´- TAT TTT CAG GGA GAA TTC CCG GGT CCT CAA ACA CCT CTT CTT ACG A - 3´	77,0
	R: 5´- GCG AGG CAG ATC GTC AGT CAG TCA TGC TGT TGG TCG GGG TGA T - 3´	82,9
recII	D: 5´- TGG TTC CGC GTG GAT CTG AAA ACC TGT ATT TTC AGG GAG AAT TCC CGG GT - 3´	82,9
	R: 5´- GGT TTT CAC CGT CAT CAC CGA AAC GCG CGA GGC AGA TCG TCA GTC AGT CA - 3´	86,7
pGEX- Alt	D: 5´- CCT GGA TGC GTT CCC AAA- 3´	54,0
	R: 5´- CGA CAC CCG CCA ACA CC- 3´	55,1

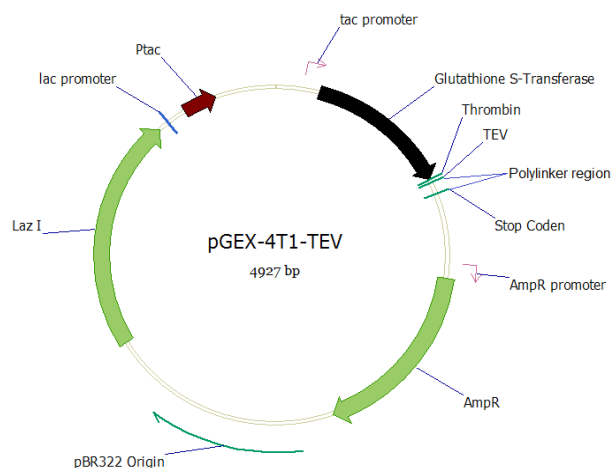


Figura 5: Mapa do vetor pGEX-4T1-TEV.

4.6. Expressão e purificação de McMK2 recombinante

Para a expressão da McMK2 (rMcmK2) recombinante, células de *E. coli* BL21-CodonPlus-RP foram transformadas com o plasmídeo pGEX-McMK2. As condições de indução da expressão da proteína recombinante foram otimizadas, na qual foram avaliadas as concentrações de 0,1 mM, 0,25 mM e 0,5 mM do indutor IPTG a 37°C por 14-16 h. Foram também avaliados diferentes tempos de indução (3, 5 e 16 h) e diferentes temperaturas de incubação (18 e 25°C). 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). Os níveis de expressão e a solubilidade da rMcmK2-GST produzida foram avaliados em cada condição testada por eletroforese em géis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Após a otimização das condições de expressão, a proteína foi produzida em maior escala e purificada por cromatografia de afinidade, utilizando a resina de *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare). 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-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 0,5 mM e DTT 1 mM, a 34°C por 16 h.

4.7. RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Para a análise do padrão de expressão temporal da McMK2 ao longo da estrobilização, foram realizados experimentos de RT-qPCR. O cDNA dos quatro estágios de desenvolvimento (1:200) foram misturados com o mix contendo: iniciadores senso e anti-senso (0,5 μ M) (Tabela 1 – MK2), dNTPs (5 mM), tampão de reação 10X, MgCl₂ (50 mM), SYBR Green (1X), 0,24 U *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen,) e água milli-Q autoclavada. As RT-qPCRs foram realizadas no equipamento 7500 *Fast-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. A quantificação relativa do nível de expressão de *McMK2* foi realizada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, de acordo com Livak and Schmittgen, 2001. O gene da proteína de ligação a poli-A (*PABP*, do inglês *poly A binding protein*) foi utilizado como controle endógeno. Esta reação foi realizada em duplicatas biológicas e triplicatas técnicas. Em uma análise adicional, o gene *McSET/TAF* de *M. corti* (Costa *et al.*, 2015) foi utilizado como marcador de desenvolvimento. Nesta nova análise, foram utilizadas triplicatas técnicas.

4.8. Análises *in silico* da proteína McMK2

As características físico-químicas e presença de peptídeo sinal da McMK2 foram determinadas pela plataforma *online* ExPASy (SIB Bioinformatics Resource Portal – disponível em <http://www.expasy.org/>). O servidor SMART (do inglês *simple modular architecture research tool*) (Schultz *et al.*, 1998; disponível em <http://smart.embl-heidelberg.de/>) foi utilizado para predição de domínios quinase presentes na McMK2. A busca por sequências ortólogas à McMK2 foi realizada pelos servidores GeneDB (disponível em <http://www.genedb.org/Homepage>) e UniProt (disponível em <http://www.uniprot.org/>). Foram selecionadas seis sequências proteicas dos organismos *Echinococcus granulosus* (GeneDB - EgrG_000899600), *Echinococcus multilocularis* (GeneDB - EmuJ_000899600), *Schistosoma mansoni* (GeneDB - Smp_053560), *Homo sapiens* (UniProtKB - P49137), *Mus musculus* (UniProtKB - P49138) e *Drosophila melanogaster* (UniProtKB - P49071). As sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o *software* BioEdit Sequence Alignment Editor e o alinhamento foi visualizado pelo *software* GeneDoc. A predição da estrutura tridimensional da McMK2 foi realizada pelo servidor Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015; disponível em <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises *in silico* da proteína McMK2

A sequência proteica da McMK2 é composta por 377 aminoácidos, totalizando uma massa molecular de aproximadamente 42,5 kDa e um ponto isoelétrico de 8,77, não havendo peptídeo sinal ao longo da sequência. A análise da sequência de aminoácidos da McMK2, feita por meio do servidor SMART, identificou a presença de um domínio catalítico Ser/Thr quinase entre os resíduos Tyr¹⁷ e Val²⁸¹.

O alinhamento realizado utilizando os *softwares* Bioedit e GeneDoc está representado na Figura 5. Com base na estrutura da MK2 de humanos (HsMK2), caracterizada por Meng *et al.*, 2002, foram observadas semelhanças entre as sequências proteicas analisadas. Os resíduos Ser²⁷², Thr²²² e Thr³³⁴, descritos como dois dos principais reguladores do sítio de fosforilação da HsMK2, e o resíduo Thr³³⁸, associado à atividade de autofosforilação, estão conservados entre todos os organismos analisados (Figura 5 – resíduos destacados em vermelho). Resíduos importantes para a atividade catalítica da HsMK2 como a Lys⁹³, Glu¹⁰⁴, Arg¹⁸⁵, Asp¹⁸⁶ e Asp²⁰⁷ também estão conservados entre as MK2 analisadas (Figura 6 – resíduos destacados em verde). Além disso, regiões como o sítio de ativação (resíduos 217 a 235) e o domínio quinase (resíduos 260 a 290) da HsMK2 também apresentam uma alta conservação.

A modelagem da estrutura tridimensional da McMK2 foi feita pelo servidor Phyre2. Este programa busca por características evolutivamente conservadas da estrutura de proteínas ortólogas à proteína dada como entrada, fazendo a predição da estrutura tridimensional a partir destes dados (Kelley *et al.*, 2015). A McMK2 foi modelada a partir do fragmento de uma *twitchin*-quinase de *Caenorhabditis elegans* (UniProtKB - Q23551). A análise obteve uma cobertura de 89% da sequência (correspondente à 335 aminoácidos) e 100% de confiabilidade, resultando na estrutura ilustrada pela Figura 7.

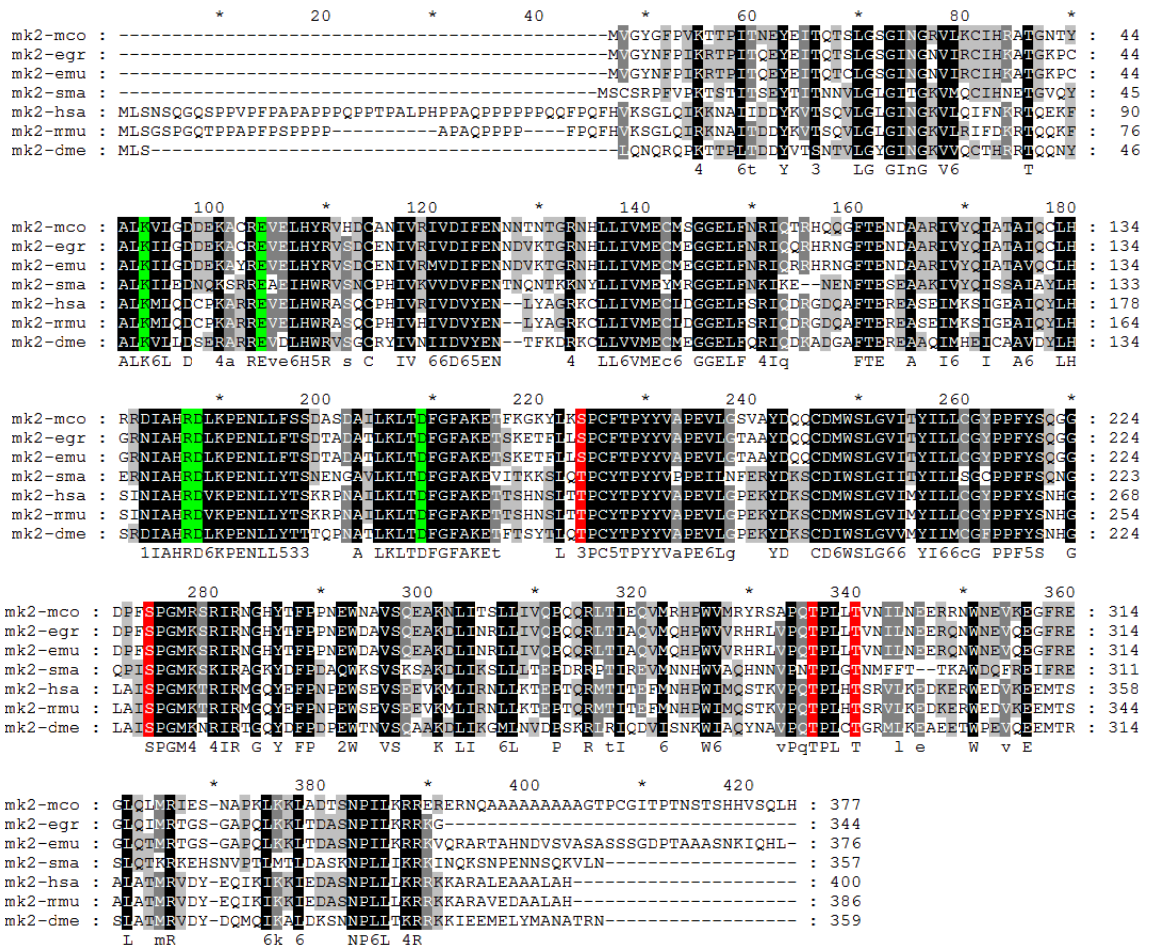


Figura 6: Alinhamento múltiplo de seqüências ortólogas à McMK2. Destacados em verde os resíduos associados à atividade catalítica. Destacados em vermelho resíduos associados à sítios de fosforilação.

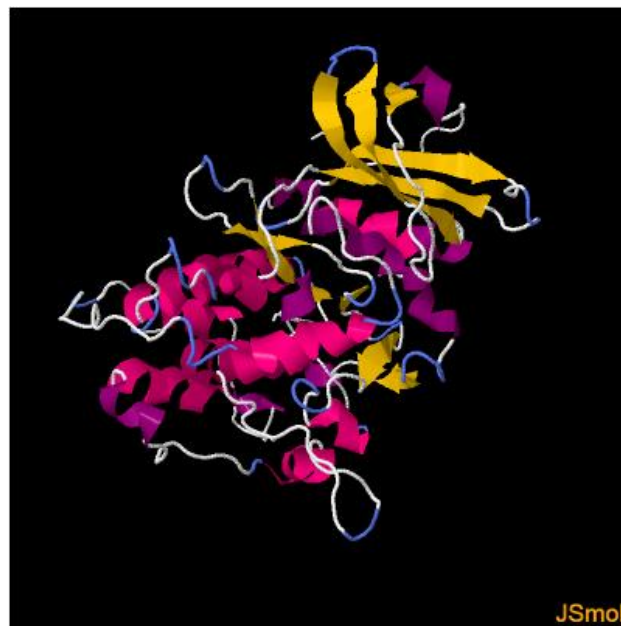


Figura 7: Estrutura tridimensional da proteína McMK2. A modelagem desta estrutura foi realizada a partir do fragmento de uma twitchin-quinase de *Caenorhabditis elegans*. Destacadas em amarelo as estruturas folhas β e em rosa as α -hélices.

6.2. Amplificação e clonagem da sequência codificadora da McMK2

A sequência codificadora da McMK2 possui 1134 pb. Em duas etapas de amplificação por PCR, foram adicionados à esta sequência 50 pb homólogos ao vetor de expressão pGEX-4T1-TEV, gerando um fragmento com o tamanho total de 1189 pb. Os produtos gerados pelas duas etapas de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose, representado na Figura 8. Por meio desta análise, foi possível observar a presença de bandas que representam fragmentos de aproximadamente 1200 pb, confirmando o sucesso da amplificação.

O fragmento amplificado foi clonado por recombinação homóloga *in vivo* utilizando células de *E. coli* KC8. As colônias recombinantes obtidas foram avaliadas quanto à inserção do fragmento de interesse no sítio de recombinação do plasmídeo pGEX-TEV, por PCR de colônia. A análise dos amplicons gerados foi realizada por eletroforese em gel de agarose, onde foi possível observar a presença de amplicons maiores em duas das 21 colônias testadas (Figura 9 – 1 e 20), confirmando o evento de recombinação nessas colônias.

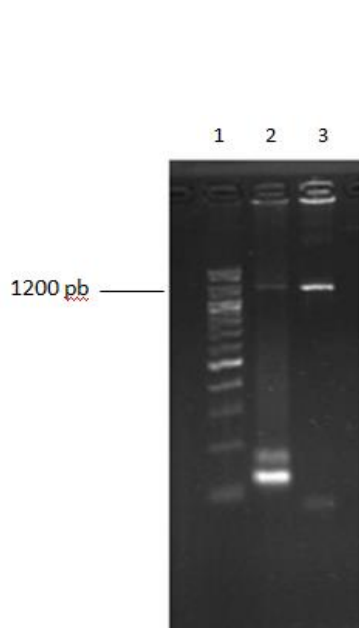


Figura 8: Análise eletroforética dos amplicons da McMK2 com iniciadores primários e secundários. Em (1) marcador de tamanho dos fragmentos de DNA, (2) produto da amplificação com iniciadores primários e (3) produto da amplificação com iniciadores secundários.

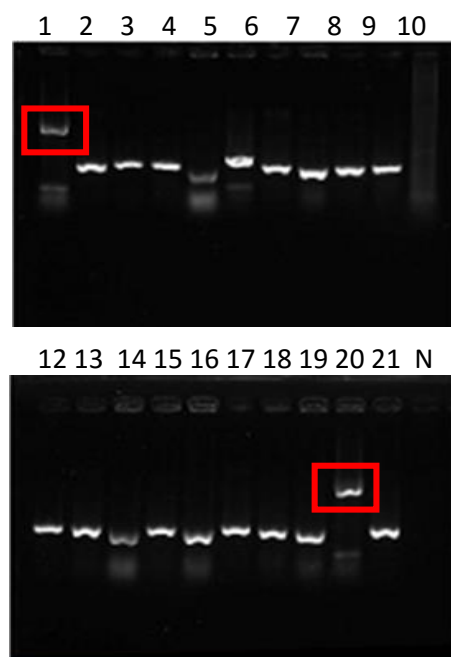


Figura 9: Análise eletroforética dos produtos da PCR de colônia da clonagem da sequência da McMK2. As bandas em destaque correspondem às colônias recombinantes. Em (N) controle negativo.

5.3. Padronização das condições de expressão da rMcMK2-GST

Células de *E. coli* BL21-CodonPlus-RP foram transformadas com o plasmídeo recombinante pGEX-McMK2, por choque térmico. Para avaliar as condições de expressão em que havia maior produção de rMcMK2-GST, foram utilizadas três concentrações diferentes de IPTG para indução da expressão das células bacterianas transformadas. A avaliação da expressão de rMcMK2-GST por eletroforese em SDS-PAGE (Figura 10), mostra que houve uma produção satisfatória de rMcMK2-GST nas três condições testadas, quando comparadas ao cultivo não induzido (NI). Porém, não houve diferença significativa na quantidade de rMcMK2-GST produzida entre as três concentrações testadas (A, B e C), evidenciando que as três concentrações são igualmente eficientes para a indução da expressão de rMcMK2-GST.

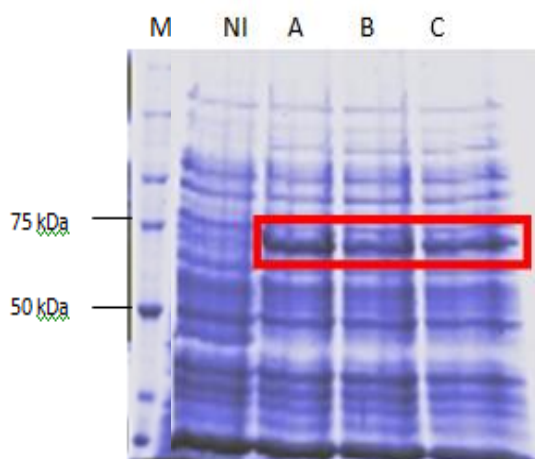


Figura 10: Avaliação da expressão da rMcMK2-GST sob indução com diferentes concentrações de IPTG, em SDS-PAGE 10%. (M) Marcador de massa molecular (kDa); (NI) cultivo não induzido, (A) cultivo induzido com 0,1 mM IPTG; (B) cultivo induzido com 0,25 mM IPTG; (C) cultivo com 0,5 mM IPTG, para cada colônia. A banda em destaque corresponde à rMcMK2-GST.

O tempo de indução da expressão para obtenção de maiores quantidades de rMcMK2-GST também foi testado. A análise eletroforética em SDS-PAGE dos tempos de indução testados (Figura 11), demonstra que foi obtida a maior quantidade de rMcMK2-GST 16 h após a adição de IPTG.

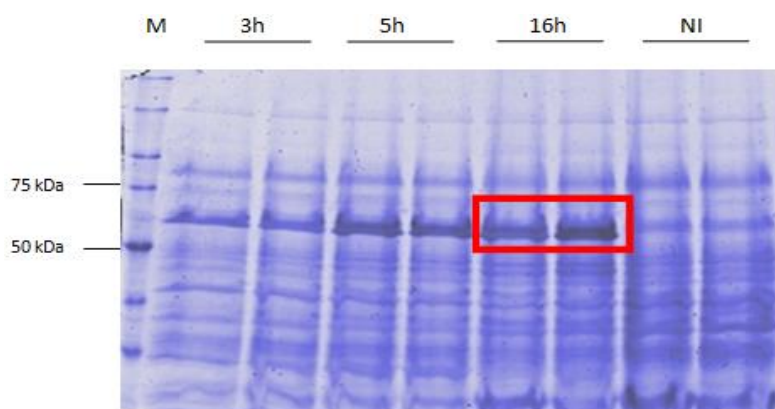


Figura 11: Avaliação da expressão da rMcMK2-GST sob indução em diferentes tempos, em SDS-PAGE 10%. (M) Marcador de massa molecular (kDa); (NI) cultivo não induzido. A banda em destaque corresponde à rMcMK2-GST

A temperatura de cultivo do inóculo induzido também foi otimizada, a fim de solubilizar a rMcMK2 produzida. Os cultivos foram induzidos com 0,1 mM de IPTG, por 16h, nas temperaturas de 18 e 25°C. A análise em SDS-PAGE (Figura 12) demonstra que a rMcMK2 foi produzida em ambos os inóculos, porém a temperatura de 18°C foi mais eficiente na produção de rMcMK2-GST.

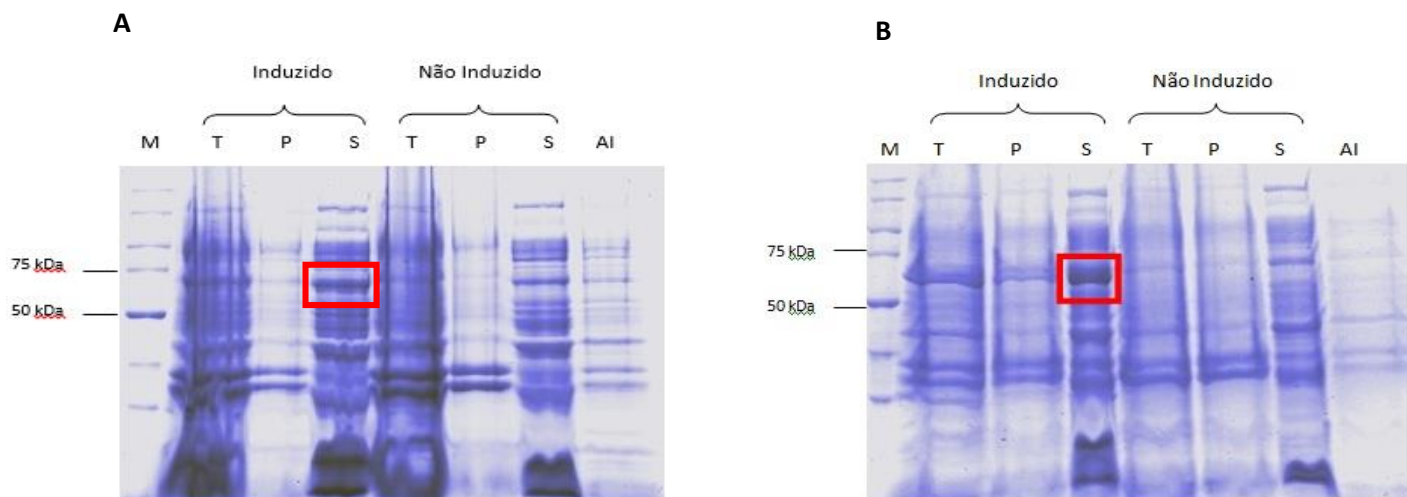


Figura 12: Avaliação da expressão da rMcMK2-GST sob indução em diferentes temperaturas, em SDS-PAGE 10%. **A:** temperatura de indução de 25°C. **B:** temperatura de indução de 18°C. (M) Marcador de massa molecular (kDa); (T) extrato total; (S) sobrenadante; (P) pellet; (AI) extrato anterior à indução. A banda em destaque corresponde à rMcMK2-GST.

5.4. Expressão e purificação da rMcMK2

Após a padronização das condições de cultivo, descrito na seção 5.3 células de *E. coli* BL21-CodonPlus-RP transformadas com o plasmídeo pGEX-McMK2 foram cultivadas, para indução da expressão de rMcMK2-GST em maior escala. A análise das frações eluídas feita por SDS-PAGE, mostra que houve eluição parcial da rMcMK2 após a clivagem com TEV (Figura 13 – E1-3). Entretanto, grande parte da rMcMK2 produzida permaneceu retida na resina, sugerindo uma possível ligação de caráter inespecífico da rMcMK2 com a resina (Figura 13 - Ma).

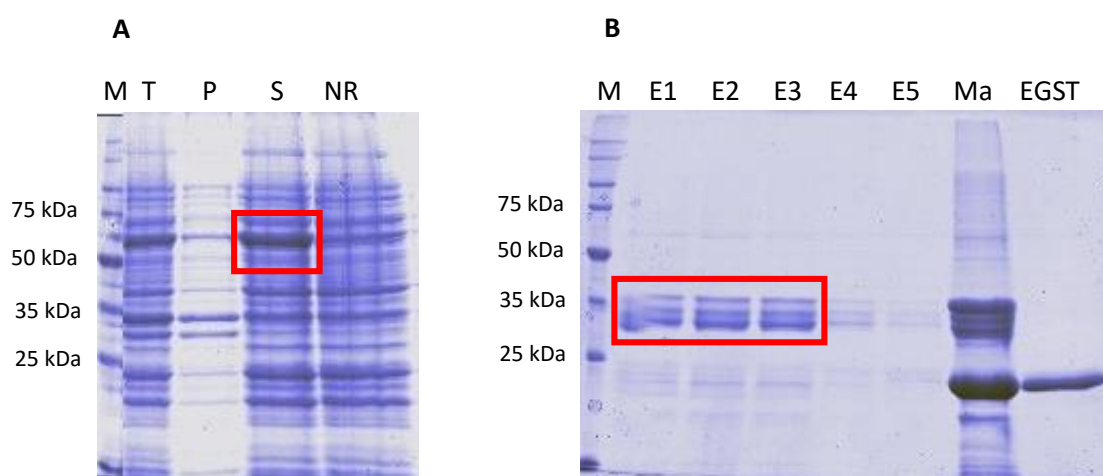


Figura 13: Avaliação da expressão e purificação da McMK2 recombinante, em SDS-PAGE 12%. (M) Marcador de massa molecular (kDa); **A:** (T) extrato total; (P) pellet; (S) sobrenadante; (NR) fração não retida. A banda em destaque corresponde à rMcMK2-GST. **B:** (E1-5) eluído após clivagem com TEV; (Ma) matriz após clivagem com TEV; (EGST) eluição de GST. A banda em destaque corresponde à rMcMK2.

5. Análise do padrão de expressão temporal do gene *McMK2*

A análise do padrão de expressão temporal do gene *McMK2* foi realizada por RT-qPCR a partir de amostras de cDNA de quatro estágios de desenvolvimento de *M. corti* (TT, 24H, 48H, ST). Dentre os estágios analisados, foram encontradas diferenças significativas nos níveis de expressão gênica do gene *McMK2* (Figura 14) entre o estágio inicial (TT) e o estágio final (ST) de desenvolvimento de *M. corti*, conforme análise pelo teste T. Em uma segunda avaliação da expressão temporal de *McMK2*, foi incluído na análise o gene *McSET/TAF*, como marcador do desenvolvimento estrobilar de *M. corti*, padronizado por Costa *et al.* (2015). O nível de expressão do gene *McMK2* seguiu o padrão observado na primeira análise (Figura 15). Observou-se uma expressão significativamente aumentada de *McMK2* no estágio inicial (TT) em relação ao estágio final (ST), segundo análise pelo teste T. O gene *McSET/TAF*, utilizado como marcador do desenvolvimento estrobilar de *M.corti*, seguiu o padrão de expressão descrito por Costa *et al.* (2015).

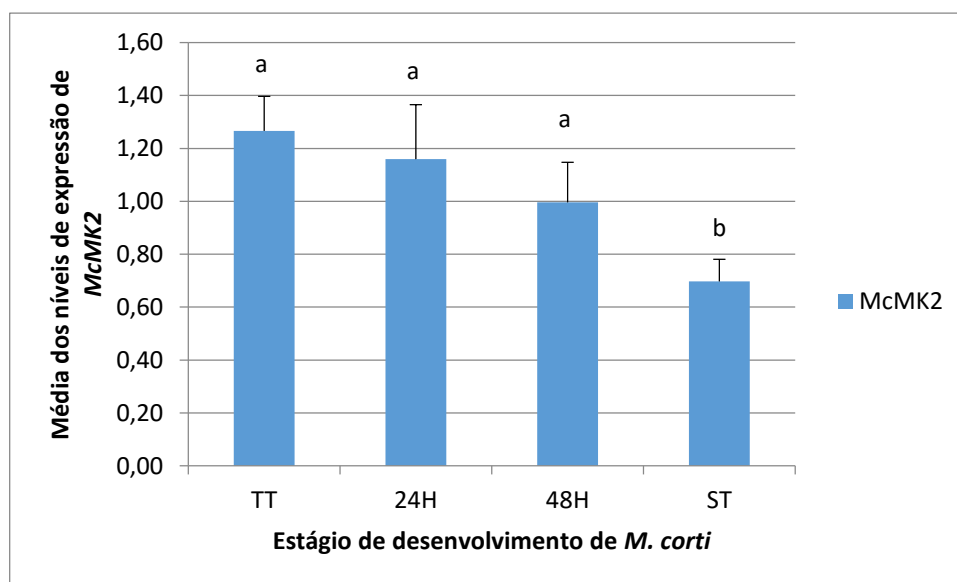


Figura 14: Média dos níveis de expressão de *McMK2*. O nível de expressão de *McMK2* foi normalizado em relação ao nível de expressão do gene *PABP*. Dados que diferem com significância de 5% pelo teste T foram indicados com letras diferentes. As barras indicam desvio-padrão.

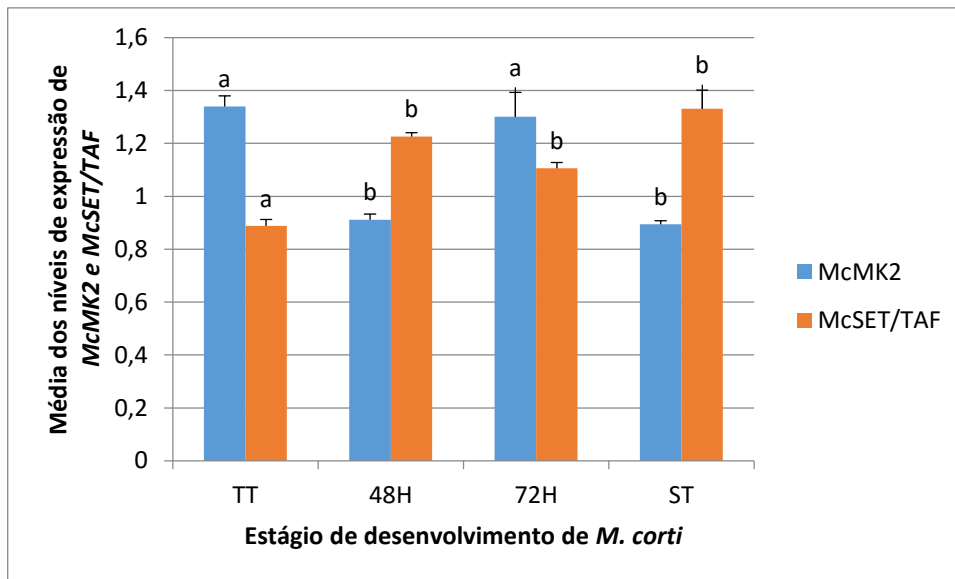


Figura 15: Média dos níveis de expressão de *McMK2* e *McSET/TAF*. Os níveis de expressão de *McMK2* e *McSET/TAF* foram normalizados em relação ao nível de expressão do gene *PABP*. Dados que diferem com significância de 5% pelo teste T foram indicados com letras diferentes. As barras indicam desvio-padrão.

Os resultados parciais das análises de microarranjos de DNA apresentados por Bizarro *et al.* (2005), evidenciam uma expressão diferencial de *McMK2*, na qual se observou uma expressão aumentada na fase estrobilar, em relação ao tetratrídeo. Em análises RNAseq, de ambos estágios de desenvolvimento, realizadas por Basika *et al.* (2016) (manuscrito em preparação), não foi observada a expressão diferencial deste gene entre o tetratrídeo e o verme estrobilado. Estes dados não estão de acordo com os inicialmente obtidos por meio de RT-qPCR, aonde foi observada a expressão aumentada do gene na fase tetratrídeo, em relação ao verme estrobilado. Entretanto, o padrão de expressão do gene *McSET/TAF*, observado nas análises de RT-qPCR, coincide com o descrito por Costa *et al.* (2015), validando os resultados obtidos para o gene *McMK2*.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As análises *in silico* da McMK2 identificaram o domínio Ser/Thr quinase, característico de proteíno-quinases. Além disso, a conservação de resíduos e domínios importantes para a atividade de uma MK2 comprovam a identidade desta proteína.

Por meio da clonagem e expressão heteróloga em células de *E. coli*, as condições de expressão da foram otimizadas e a rMcMK2 foi produzida e purificada em larga escala. Em uma próxima etapa, a proteína recombinante produzida será utilizada para imunização de coelhos, a fim de produzir anticorpos policlonais monoespecíficos anti-rMcMK2. Os anticorpos serão posteriormente utilizados em experimentos de imunohistoquímica, para avaliação do padrão de expressão espacial e temporal da McMK2 ao longo da estrobilização.

A avaliação do padrão de expressão temporal da *McMK2* por RT-qPCR, mostrou um indicativo de que este gene pode ser diferencialmente expresso ao longo da estrobilização, uma vez que os níveis de expressão estavam significativamente aumentados no estágio larval, em relação ao verme estrobilado. Entretanto, será necessária a realização de análises adicionais de RT-qPCR para confirmação dos resultados obtidos. Experimentos de RNA de interferência também serão realizados, para avaliação de modificações no fenótipo de *M. corti* devido à perda de função do gene *McMK2*, e assim possivelmente inferir uma provável função para este gene.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armua-Fernandez, M. T., Nonaka, N., Sakurai, T., Nakamura, S., Gottstein, B., Deplazes, P., Phiri, I. G., Katakura, K. and Oku, Y.** (2011). Development of PCR/dot blot assay for specific detection and differentiation of taeniid cestode eggs in canids. *Parasitol Int*, **60**, 84-89.
- Barnes, T. S., Deplazes, P., Gottstein, B., Jenkins, D. J., Mathis, A., Siles-Lucas, M., Torgerson, P. R., Ziadinov, I. and Heath, D. D.** (2012). Challenges for diagnosis and control of cystic hydatid disease. *Acta Trop*, **123**, 1-7
- Basika, T. C., Macchiaroli, N., Cucher, M., Espínola, S., Kamenetzky, L., Zaha A., Rosenzvit, M. and Ferreira H. B.** Identification and profiling of microRNAs in two developmental stages of the model cestode parasite *Mesocestoides corti*. *Submetido à Parasitology*.
- Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H. F. and Marshall, C. J.**(1998). Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol*, **8**, 1049-1057.
- 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.
- Brunetti, E., Garcia, H. H., Junghanss, T. and International CE Workshop in Lima, P. r., 2009** (2011). Cystic echinococcosis: chronic, complex, and still neglected. *PLoS Negl Trop Dis*, **5**, e1146.
- 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.
- Cardona, G. A. and Carmena, D.** (2013). A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Vet Parasitol*, **192**, 10-32
- Costa, C. B., Monteiro, K. M., Teichmann, A., da Silva, E. D., Lorenzatto, K. R., Cancela, M., Paes, J. A., Benitz, A. e. N., Castillo, E., Margis, R., Zaha, A. and Ferreira, H. B.** (2015). Expression of the histone chaperone SET/TAF-I β during the strobilation process of *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes, Cestoda). *Parasitology*, **142**, 1171-1182.
- Engel, K., Kotlyarov, A. and Gaestel, M.** (1998). Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J*, **17**, 3363-3371.
- Escobedo, G., Soldevila, G., Ortega-Pierres, G., Chávez-Ríos, J. R., Nava, K., Fonseca-Liñán, R., López-Griego, L., Hallal-Calleros, C., Ostoa-Saloma, P. and Morales-Montor, J.** (2010). A new MAP kinase protein involved in estradiol-stimulated reproduction of the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *J Biomed Biotechnol*, **2010**, 747121

- 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.
- 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.
- Gelmedin, V., Spiliotis, M. and Brehm, K.** (2010). Molecular characterisation of MEK1/2- and MKK3/6-like mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKK) from the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Int J Parasitol*, **40**, 555-567.
- Holloway, B. A., Gomez de la Torre Canny, S., Ye, Y., Slusarski, D. C., Freisinger, C. M., Dosch, R., Chou, M. M., Wagner, D. S. and Mullins, M. C.** (2009). A novel role for MAPKAPK2 in morphogenesis during zebrafish development. *PLoS Genet*, **5**, e1000413.
- Johnson, G. L.** (2011). Defining MAPK interactomes. *ACS Chem Biol*, **6**, 18-20.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. and Sternberg, M. J.** (2015). The Pyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, **10**, 845-858.
- 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.
- 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.
- Kyriakis, J. M. and Avruch, J.** (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev*, **92**, 689-737.
- Lee, Y., Kim, Y. J., Kim, M. H. and Kwak, J. M.** (2016). MAPK Cascades in Guard Cell Signal Transduction. *Front Plant Sci*, **7**, 80.
- 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.
- 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.
- Meng, W., Swenson, L. L., Fitzgibbon, M. J., Hayakawa, K., Ter Haar, E., Behrens, A. E., Fulghum, J. R. and Lippke, J. A.** (2002). Structure of mitogen-activated protein

kinase-activated protein (MAPKAP) kinase 2 suggests a bifunctional switch that couples kinase activation with nuclear export. *J Biol Chem*, **277**, 37401-37405.

- Mishra, P. K., Morris, E. G., Garcia, J. A., Cardona, A. E. and Teale, J. M.**(2013). Increased accumulation of regulatory granulocytic myeloid cells in mannose receptor C type 1-deficient mice correlates with protection in a mouse model of neurocysticercosis. *Infect Immun*, **81**, 1052-1063.
- Mishra, P. K. and Teale, J. M.** (2012). Transcriptome analysis of the ependymal barrier during murine neurocysticercosis. *J Neuroinflammation*, **9**, 141.
- Neufeld, B., Grosse-Wilde, A., Hoffmeyer, A., Jordan, B. W., Chen, P., Dinev, D., Ludwig, S. and Rapp, U. R.** (2000). Serine/Threonine kinases 3pK and MAPK-activated protein kinase 2 interact with the basic helix-loop-helix transcription factor E47 and repress its transcriptional activity. *J Biol Chem*, **275**, 20239-20242.
- 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. doi: 10.1016/S0065-308X(05)60003-6.
- Owens, D. M. and Keyse, S. M.** (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, **26**, 3203-3213. doi: 10.1038/sj.onc.1210412.
- 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.
- Peti, W. and Page, R.** (2013). Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Sci*, **22**, 1698-1710.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. and Ponting, C. P.** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5857-5864.
- Smith, J. A., Poteet-Smith, C. E., Lannigan, D. A., Freed, T. A., Zoltoski, A. J. and Sturgill, T. W.** (2000). Creation of a stress-activated p90 ribosomal S6 kinase. The carboxyl-terminal tail of the MAPK-activated protein kinases dictates the signal transduction pathway in which they function. *J Biol Chem*, **275**, 31588-31593.
- Spiliotis, M., Konrad, C., Gelmedin, V., Tappe, D., Brückner, S., Mösch, 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., Mösch, 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.