

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

**Caracterização da *Tick Heme-binding Aspartic Protease* (THAP) na
embriogênese do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: análise da
expressão e da atividade de degradação de vitelina**

PAULA CRISTIANE POHL

Porto Alegre

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Caracterização da *Tick Heme-binding Aspartic Protease* (THAP) na
embriogênese do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: análise da
expressão e da atividade de degradação de vitelina**

PAULA CRISTIANE POHL

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e
Molecular (PPGBCM) da UFRGS
como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dr^a. Aoi Masuda

Co-orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr.

Porto Alegre, outubro de 2008

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Instituição:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Centro de Biotecnologia , Brasil

Fontes Financiadoras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brasil

Pronex (Programa de Apoio a Núcleos de Excelência - Consórcio CNPq/Capes/Finep)

Só depende de nós...

"Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite.

É minha função escolher que tipo de dia vou ter hoje.

Posso reclamar porque está chovendo ou agradecer às águas por lavarem a poluição.

*Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas
finanças, evitando o desperdício.*

Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo.

*Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria ou posso ser
grato por ter nascido.*

Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho.

*Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus por ter um teto para
morar.*

*Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer
novas amizades.*

Se as coisas não saíram como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar.

O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser.

E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma.

Tudo depende só de mim."

(Charles Chaplin)

Ao Daniel, pelo carinho, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Aoi Masuda, pela oportunidade e ensinamentos transmitidos.

Ao Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr., pela orientação e valiosa contribuição na execução dos trabalhos.

Ao Dr. Alexandre Trindade Leal, pelos ensinamentos, pelo incentivo e em especial pela amizade.

À Dra. Sandra Estrazulas Farias, pelas contribuições e pelo convívio.

Aos membros da banca examinadora.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal: Daiane, Alexandra, Silvia, Clotilde, Marcelo, Paulo, Andressa, Melina, Aline, Maria Lúcia, Leonara, Ana Paula, Fernanda, Pâmela, Kyioko e Ísis, obrigada pela alegria na convivência e cooperação. Em especial a Caroline, Mariana e Luís pelas inúmeras vezes que me auxiliaram e pela amizade acima de tudo.

Ao Professor Carlos Termignoni e as colegas do seu laboratório, Adriana e Andréia, pela colaboração e valorosa amizade.

Ao Dr. Carlos Logullo e Pedro L. Oliveira pelas oportunidades oferecidas e aos colegas de laboratório Ariane, Josiani, Leonardo, Maria Clara e Tiago.

Aos colegas de outros laboratórios do Centro de Biotecnologia.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aos órgãos de fomento.

Aos meus pais, pela confiança, pelos conselhos, pela compreensão e pelo apoio incondicional em todos os momentos.

A minha irmã Clarise, pela grande amizade, pela acolhida e pelo incentivo.

A minha irmã Elci, pela amizade e alegria transmitida.

Ao Daniel, pela sua compreensão, pelas dificuldades partilhadas, pelas experiências vividas e principalmente, pelo amor, carinho e incentivo.

À Deus!

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

° C	graus Celsius
µg	microgramas
µl	microlitros
µM	micromolar
Abz	aminobenzoil
BCP	<i>Bombyx acid cysteine protease</i>
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BmTIs	<i>Boophilus microplus trypsin inhibitors</i>
BYC	<i>Boophilus Yolk pro-Cathepsin</i>
CSIRO	<i>Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation</i>
CT	<i>threshold cycle</i>
DMSO	dimetil-sulfóxido
D.O.	densidade óptica
E-64	<i>trans</i> -epoxisucinil-L-leucilamido(4-guanidino)-butano
EDDnp	<i>etilenodinitrofenil-N-[2.4-dinitrofenil]-etilenodiamina</i>
ESP	<i>Egg-specific protein</i>
g	grama
HELP	<i>Heme-transporting lipoprotein</i>
IPTG	<i>isopropylthio-β-D-galactoside</i>
kDa	quilodalton = 1000 daltons
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
mA	miliampère
min	minutos
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetro
nTHAP	<i>Tick heme-binding aspartic proteinase nativa</i>

NusTag	proteína de fusão NusA
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMSF	<i>phenylmethanesulphonyl fluoride</i>
RFU	unidades de fluorescência
RHBP	<i>Rhodnius heme-binding protein</i>
rTHAP	<i>Tick heme-binding aspartic proteinase</i> recombinante
rTHAP-NusTag	rTHAP fusionada a NusTag
SDS	dodecilsulfato de sódio
VCB	<i>Vitellogenic cathepsin B</i>
VCP	<i>Vitellogenic carboxypeptidase</i>
VT	vitelina
VTG	vitelogenina
VTDCE	<i>Vitellin-degrading cysteine endopeptidase</i>

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	6
RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 O Carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	13
1.2 Ciclo biológico	14
1.3 Importância econômica do carrapato bovino.....	16
1.4 Perspectivas para o controle do carrapato bovino	17
1.5 A Oogênese e a Embriogênese no carrapato bovino	24
1.6 Os componentes do vitelo e a maquinaria enzimática.....	26
1.7 Sítios de síntese das proteínas do vitelo	29
1.8 O controle da degradação dos componentes do vitelo	31
1.9 O metabolismo do heme no <i>R. microplus</i>	34
1.10 A proteína <i>Tick heme-binding aspartic proteinase (THAP)</i>	37
2 OBJETIVOS GERAIS	39
2.1 Objetivos Específicos	39
3 RESULTADOS	40
4 DISCUSSÃO.....	75
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
6 ANEXOS.....	100
6.1 CURRICULUM VITÆ resumido	100

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é responsável por perdas econômicas substanciais na bovinocultura, acarretando o uso intensivo de acaricidas. Problemas com os resíduos químicos presentes na carne e no leite, o custo dos acaricidas e a seleção de populações de carrapato resistentes, têm estimulado o desenvolvimento de métodos de controle alternativos não-químicos. Muito esforço tem sido despendido para o desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato, no entanto, seu desenvolvimento depende da identificação de moléculas e caracterização de seus papéis na fisiologia do carrapato. Nesse sentido, entender melhor os processos envolvidos no desenvolvimento embrionário pode ajudar na identificação de alvos para o controle desse ectoparasita. Foi sugerida previamente a participação da *Tick Heme-binding Aspartic Proteinase* (THAP), uma aspártico-endopeptidase dos ovos do carrapato, na degradação da vitelina. Neste trabalho, nós avaliamos a função fisiológica e as características bioquímicas adicionais dessa proteína. Para identificar os sítios e o perfil de transcrição do gene da THAP, o RNA total foi extraído de intestino, ovário e corpo gorduroso de fêmeas parcialmente e completamente ingurgitadas e de ovos, e analisado por PCR quantitativo. Esta análise revelou que o gene da THAP é transcrito nos três tecidos, porém maior quantidade de mRNA foi detectada no corpo gorduroso e intestino de fêmeas completamente ingurgitadas, onde o processo de vitelogênese já foi iniciado. Nos ovos, a transcrição do gene da THAP não foi detectada. Para investigar a presença da proteína nos tecidos e ovos foi realizado um western-blot com soro anti-THAP, que revelou a presença, em pequena quantidade, da proteína na hemolinfa, no intestino e no corpo gorduroso. Maior

concentração de proteína foi detectada no ovário de fêmeas completamente ingurgitadas e nos ovos durante todo o desenvolvimento embrionário. Também foi observado que a THAP é sintetizada na forma de pró-endopeptidase e depois do início da embriogênese é convertida à forma ativa por autoproteólise. Uma proteína recombinante (rTHAP) foi produzida pela clonagem da região codificadora no vetor de expressão pET43a e expressão em *Escherichia coli*. Depois da purificação, a rTHAP apresentou atividade enzimática sobre substrato sintético fluorogênico, sendo especificamente inibida por pepstatina A. Para investigar sua participação na degradação de vitelina (VT), VT purificadas de ovos coletados 1, 7 e 12 dias após a postura foram incubadas com a rTHAP em diferentes pH (3,5; 4,0; 4,5; e 5,0). A análise por SDS-PAGE mostrou que a rTHAP é capaz de hidrolisar VT purificada de ovos coletados 7 dias após a postura em pH 3,5 a 37 °C. Esta atividade é sensível a heme e inibida por pepstatina A. VT purificadas de ovos coletados 1 e 12 dias após a postura não foram hidrolisadas e em outros pH a atividade da rTHAP não foi eficiente. Nossos resultados sugerem que a THAP é sintetizada principalmente em tecidos extra-ovarianos, estocada nos ovários e incorporada nos oócitos como pró-endopeptidase. Durante a embriogênese, a THAP é ativada a enzima na forma madura desenvolvendo papel no processamento da vitelina do carrapato.

Palavras chaves: THAP, *R. microplus*, síntese, degradação de vitelina, embriogênese

ABSTRACT

Rhipicephalus (Boophilus) microplus is a one-host tick that causes losses to bovine herds, leading intensive use of chemical acaricides. Problems of chemical residues in meat and milk, costs of acaricides, and development of resistance by ticks, have long been recognized and have helped to stimulate interest in tick control by immunological methods. Major efforts have been made to develop vaccines against tick; however, its development still depends on the identification of tick molecules and characterization of their roles in arthropod physiology. In this sense, to understand the processes involved in embryonic development can help in the identification of additional targets to control this ectoparasite. Previously, an aspartic endopeptidase from tick eggs, named THAP (*Tick Heme-binding Aspartic Proteinase*), was suggested to be involved in vitellin degradation. In this work, we have investigated the physiological role and additional chemical features of this protein. To identify the site and profiles of the THAP transcription, total RNA extracted from midgut, ovary and fat body from partially and fully engorged females and from eggs was analyzed by qRT-PCR. This analysis showed that THAP mRNA was transcribed in these three tissues. However, highest levels of transcriptions were found in fat body and midgut of fully engorged vitellogenic females. In eggs, THAP mRNA transcription was not detected. In order to investigate the presence of THAP protein in the tissues and eggs, an immunoblot analysis was conducted with an anti-nTHAP serum. The THAP protein was detected in the haemolymph, midgut and fat body and, in higher quantity, in the ovary of fully engorged females, and it was present throughout embryo development. The protein is synthesized as a higher molecular mass form (pro-endopeptidase) and after the onset of embryogenesis THAP is converted into an active form by autocatalysis. A recombinant

THAP (rTHAP) was produced through cloning in pET43a vector and expression in *Escherichia coli*. After the purification the rTHAP was active upon fluorogenic substrate in a reaction specifically inhibited by pepstatin A. To investigate rTHAP vitellin-degradation activity, vitellin (VT) purified from 1-, 7- and 12-day-old eggs were incubated with rTHAP in a range of pHs (3.5, 4.0, 4.5 and 5.0). SDS-PAGE analysis showed that rTHAP is able to hydrolyze VT from 7-day-old eggs in pH 3.5 at 37°C in a reaction that is heme-sensitive and inhibited by pepstatin A. Vitellins from eggs collected on the 1st and 12th days after oviposition were not hydrolyzed and in other pHs rTHAP activity was not efficient. These results suggest that THAP is synthesized in ovary and extra-ovarian site, stocked in ovary and incorporated by vitellogenic oocytes with a pro-endopeptidase. During embryogenesis, THAP was activated to the mature enzyme and play a role in tick vitellin processing.

Keywords: THAP, *R. microplus*, Synthesis, Vitellin processing, Embryogenesis

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Carrapatos são ácaros hematófagos encontrados em todas as regiões terrestres do planeta. Estes parasitas estão entre os mais importantes vetores de doenças humanas e animais. Além disso, podem causar paralisias, alergias e perdas econômicas devido à espoliação sanguínea (Sonenshine, 1991; Jongejan e Uilenberg, 2004). Por sua grande importância médica e veterinária, os carrapatos são de grande interesse para estudos científicos e numerosas investigações têm reportado detalhes da sistemática, morfologia e ecologia destes parasitas. Nas últimas décadas do século 20, em particular, foram muitos os relatos descrevendo os fundamentos da genética, ultraestrutura, fisiologia e bioquímica dos carrapatos (Sonenshine, 1991).

O carrapato *R. microplus* pertence ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acarina e família Ixodidae. Em 2003, o carrapato *Boophilus microplus* foi reclassificado, com base em análises moleculares e morfológicas, como pertencente ao gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*, com a nomenclatura de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Murrell e Barker, 2003), sendo a nova nomenclatura utilizada neste texto.

O carrapato *R. microplus* é parasita de um único hospedeiro (carrapatos monoxenos), o bovino. Essa espécie é originária da Ásia, notadamente da Índia e da ilha de Java. Em função das expedições exploradoras registradas na história, com a movimentação de animais e mercadorias, ocorreu a sua introdução e expansão na maioria das regiões tropicais e subtropicais: Austrália, México, América Central, América do Sul e África, tendo se estabelecido dentro dos climas demarcados pelos paralelos 32° Norte e 32° Sul (Nuñez et. al, 1982). No Brasil, o carrapato bovino encontrando-se distribuído atualmente

em todo o país e varia de intensidade de acordo com as condições climáticas e a raça de bovinos explorados (Gonzales, 1995).

1.2 Ciclo biológico

O ciclo de vida do *R. microplus* divide-se em duas fases: a fase de vida livre e a fase de vida parasitária (Figura 1).

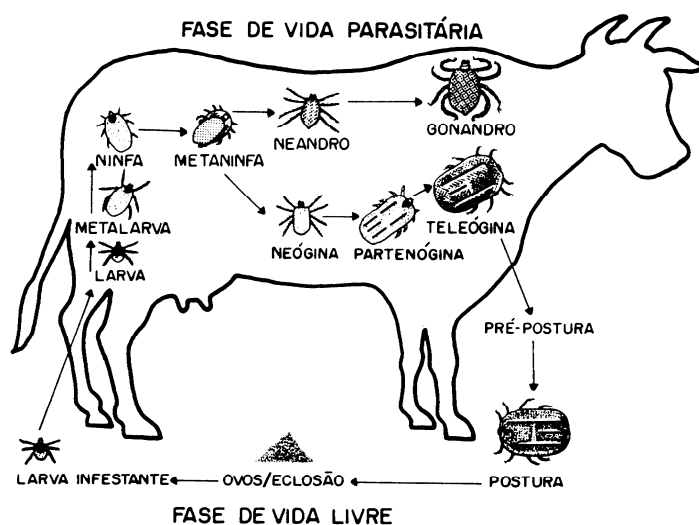


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato *R. microplus* (Fonte: Gonzales, 1995).

A fase de vida livre tem duração de 20 dias a vários meses, dependendo das condições climáticas. Essa fase tem início quando a fêmea completamente ingurgitada (teleóquina) se desprende do hospedeiro e cai ao solo. As teleóquinas possuem geotropismo positivo e buscam abrigo protegido da luz solar no solo e na vegetação para dar início ao período de pré-postura que dura de 2 a 3 dias, dependendo do volume de sangue ingerido (Nagar, 1968) e da temperatura ambiente (Oliveira et al., 1974). Após esse período, tempo

necessário para a formação dos ovos, as teleóginas realizam a postura (Figura 2), que pode chegar a 3.000 ovos por fêmea, e morrem. Aproximadamente 18 dias após o término da postura, inicia-se a eclosão dos ovos, quando as condições são ideais para o desenvolvimento do embrião, ou seja, temperatura de 28 °C e umidade relativa superior a 70 % (Gonzales, 1995). Após um período de aproximadamente 7 dias, as neolarvas transformam-se em larvas infectantes e migram por geotropismo negativo para as extremidades apicais da vegetação, onde localizam o hospedeiro pelo odor, vibrações, sombreamento, estímulo visual e dióxido de carbono expirado (Sonenshine, 1991). A fase de vida livre termina quando a larva encontra o hospedeiro.

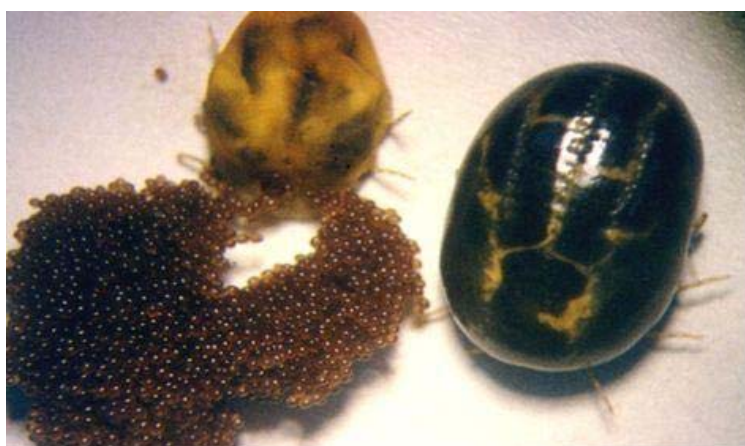


Figura 2- Fêmea adulta (teleógina) do carrapato *R. microplus* antes (esquerda) e após a postura dos ovos (direita). (Fotografia cortesia de Glória Braz).

A fase de vida parasitária do *R. microplus* se desenvolve sobre o bovino e têm período de duração médio de 21 dias, passando pelos estágios de larva, ninfa e adulto (Figura 1). Assim que entram em contato com o bovino, as larvas migram para a região posterior das coxas e as regiões perianal e perivulvar, que são mais propícias para o seu desenvolvimento em virtude da espessura, vascularização e temperatura da pele e

dificuldade de auto-limpeza do hospedeiro (Cordovés, 1996). As larvas passam a se alimentar de linfa e após 7 dias, aproximadamente, sofrem a primeira ecdise, transformando-se em ninfas. Uma segunda ecdise ocorre 8 dias depois dando origem a adultos com dimorfismo sexual. Na fase adulta ocorre a cópula e as fêmeas passam a se alimentar de sangue até seu ingurgitamento total e queda ao solo. Os machos, por sua vez, permanecem no hospedeiro à procura de novas fêmeas, sobrevivendo até duas vezes mais do que essas (Roberts, 1968). Os carrapatos adultos machos recebem a denominação de neandros logo após a ecdise e de gonandros quando atingem o seu tamanho máximo. Já as fêmeas adultas são denominadas neóginas, logo após a ecdise, partenóginas, quando se encontram parcialmente ingurgitadas e teleóginas, quando estão ingurgitadas e prontas para se desprender do hospedeiro (Figura 2) (Gonzales, 1995). É na fase de vida parasitária que o carrapato se alimenta, aumenta consideravelmente seu peso, armazena nutrientes para a fase seguinte no solo (quando fêmea), transmite agentes patogênicos ou não ao hospedeiro e determina os prejuízos econômicos decorrentes deste parasitismo (Cordovés, 1996).

1.3 Importância econômica do carrapato bovino

As infestações por *R. microplus* são conhecidas pelo seu efeito adverso na produtividade pecuária (Josson, 2006). Durante a fase parasitária, um único carrapato suga de 2 a 3 ml de sangue (Gonzales, 1995), o que, dependendo da intensidade da infestação parasitária, se reflete em anemia, perdas na produção de leite e carne (Sutherst et al., 1983), além dos danos ao couro causados pelas lesões e reações inflamatórias nos pontos da fixação do carrapato (Seifert et al., 1968). Estas lesões também podem favorecer o aparecimento de infecções secundárias como as miíases cutâneas (Gonzales e Serra-Freire,

1992). O *R. microplus* também transmite patógenos para animais e seres humanos que causam doenças tais como a babesiose (*Babesia bovis* e *Babesia bigemina*), a anaplasmosose (*Anaplasma marginale*), a teleriose (*Theileria annulata*) e a doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi*) (Nari et al., 1995; Nuttall et al., 2006), cujas medidas de prevenção e ocorrência de surtos são de grande impacto sanitário e econômico na pecuária (Young e Morzaria, 1986). Além dos prejuízos diretos causados pela infestação de carrapatos, existem as despesas com instalações e equipamentos necessários à aplicação de acaricidas nos rebanhos, aquisição destes produtos e período de carência após aplicação das drogas. A existência de carrapatos e das enfermidades por eles transmitidas limita em muitos casos a exportação de bovinos vivos de certas regiões endêmicas para áreas livres de carrapatos (Cordovés, 1996).

O Brasil é detentor do segundo maior rebanho de bovinos do mundo. Em 2006, o rebanho bovino brasileiro totalizou 205,9 milhões de cabeças, produzindo aproximadamente 9 milhões de toneladas de carne e 25,4 bilhões de litros de leite (IBGE, 2005). Estima-se que, anualmente, as perdas decorrentes da infestação pelo *R. microplus* cheguem a 1 bilhão de dólares americanos no país (Gomes, 2000). Neste contexto, o controle do carrapato bovino é fundamental para a manutenção da sanidade do rebanho nacional e o desenvolvimento da bovinocultura, uma atividade de fundamental importância para o país.

1.4 Perspectivas para o controle do carrapato bovino

O método de controle para o carrapato bovino que mais tem sido utilizado desde a década de 50 é o controle químico através do uso de acaricidas (Pruett, 1999; George et al., 2004). A introdução destas drogas, que permitiram o controle do carrapato, foi um dos

fatores preponderantes no desenvolvimento da pecuária em várias regiões, mas apesar de ser ainda o único método eficaz disponível, é caro, traz impactos ao meio ambiente e a saúde pública, através da contaminação de rios e solos e devido à presença de resíduos tóxicos nos produtos de origem bovina (carne, leite e derivados) (Kunz e Kemp, 1994; George et al., 2004). Além disso, é crescente o número de relatos que apontam um aumento das populações de carrapatos resistentes a diversos princípios químicos presentes nos acaricidas, reduzindo a eficiência do controle (Barré et al., 2008; Jonsson e Hope, 2007; Li et al., 2004; Martins e Furlong, 2001). Com isso, a necessidade de troca dos princípios ativos levou a utilização seqüencial e/ou simultânea de acaricidas baseados em compostos arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidinas, piretróides e avermectinas (George et al., 2004). O curto período de tempo entre as gerações e o emprego de subdosagem, parece contribuir para o rápido aparecimento de resistência no *R. microplus* (Kocan, 1995). Além disso, o controle químico mostra-se cada vez mais inviável economicamente, visto o alto custo dos acaricidas, da mão-de-obra e das instalações necessárias para aplicação. Todos esses fatores impõem a necessidade de buscar métodos alternativos para o controle do *R. microplus*.

O controle de ectoparasitos através de vacinação tem sido estudado nas últimas cinco décadas e é considerado um método promissor como alternativa ao uso de acaricidas (Willadsen e Kemp, 1988; Willadsen, 2004 e 2006). No entanto, o desenvolvimento de uma vacina depende da identificação de moléculas com potencial protetor, caracterização de seus papéis na fisiologia do carrapato e produção de antígenos recombinantes, etapa fundamental para produção de uma vacina economicamente viável (Willadsen, 2001; Willadsen, 2004).

Durante o processo de obtenção de sangue, os carrapatos estimulam a imunidade do hospedeiro, que é caracterizada pelo aparecimento de anticorpos e imunidade celular contra vários antígenos do parasita. A resposta imune do bovino contra o carrapato envolve células apresentadoras de antígenos, citocinas, linfócitos B e T, imunoglobulinas, granulócitos, entre outras células e moléculas. A resistência adquirida mediada imunologicamente é expressa pela diminuição da produção e viabilidade dos ovos e larvas, pela redução no número de carrapatos que se fixam ao hospedeiro, pela diminuição no peso das teleóginas, pelo aumento do tempo de alimentação e pela morte dos carrapatos (Wikel, 1996). Os parasitas, por sua vez, desenvolveram maneiras de evadir ou suprimir respostas imunes. A saliva de artrópodes hematófagos possui propriedades anti-hemostáticas, vasodilatatórias, antiinflamatórias e imunossupressoras, facilitando a sua alimentação e a aquisição e transmissão de patógenos (Reck et al., no prelo; Ribeiro, 1989).

Com objetivo de induzir uma melhor resistência nos animais, vários estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de obtê-la por imunização artificial. A capacidade dos bovinos imunizados de produzirem uma resposta imune para extratos de carrapato e proteínas purificadas tem sido descrita. Foi observado que a taxa de fecundidade dos carrapatos alimentados em bovinos imunizados com ovo, larva ou tecidos adultos de *R. microplus* é mais baixa que daqueles alimentados em bovinos não imunizados (Opdebeeck et al., 1989 apud Da Silva Vaz Jr et al., 1998). Estas observações fornecem bases que justificam tentativas de utilizar vacinas no controle desse ectoparasita.

Duas fontes de antígenos candidatos para vacina são identificáveis: os antígenos naturalmente expostos ao sistema imune do hospedeiro durante a fase parasitária, como proteínas e peptídeos sintetizados na glândula salivar; e os antígenos ocultos (*concealed*

antigen) que não entram em contato com o hospedeiro (Nuttal et al., 2006). Este novo conceito surgiu com experimentos de vacinação contra o *R. microplus* (Willadsen e Kemp, 1988). Por não entrarem em contato com o sistema imunológico do hospedeiro, os antígenos ocultos não tem possibilidade de induzirem resposta imune durante o parasitismo. Entretanto, uma vez que o hospedeiro seja imunizado artificialmente com um destes antígenos, anticorpos e outros elementos do sistema imune, se ingeridos pelo parasito, interagem com a proteína utilizada na imunização, podendo interferir nas funções desta de modo a causarem danos ao parasito (Da Silva Vaz Jr et al., 2002).

A vantagem estratégica do uso de vacinas com antígenos ocultos é a de evitar os principais mecanismos que os parasitos apresentam para escapar da resposta imune do hospedeiro como inibidores do sistema complemento, da resposta inflamatória, da proliferação de linfócitos T, produção de citocinas e histamina (Barriga, 1999). No entanto, uma implicação negativa do uso de antígenos ocultos é que a resposta imunológica dos animais tratados não é continuamente estimulada pela infestação natural, necessitando de revacinação para manutenção do status protetor (Willadsen, 2004).

Preenchendo os requisitos deste conceito, o primeiro antígeno oculto isolado em carrapatos foi a proteína Bm86, uma glicoproteína de membrana presente no intestino (Willadsen et al., 1989). A Bm86 induz resposta imunológica em bovinos imunizados e é a base de duas vacinas comerciais presentes no mercado: a TickGard™, desenvolvida na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO, e a Gavac™, desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba. Infelizmente, a eficiência dessas vacinas não tem sido satisfatória, e mesmo com seu uso, ainda se faz necessário utilizar formas químicas de controle, além dos sucessivos reforços que devem ser administrados, o que dificulta o manejo da vacina (De La Fuente et al., 2007).

Com o intuito de aumentar a efetividade da vacina, o grupo australiano avaliou o potencial da vacinação com DNA na produção de uma resposta imune protetora utilizando a seqüência codificadora da Bm86, mas o nível de proteção foi muito menor quando comparado às imunizações com a proteína (De Rose et al., 1999). Imunizações de bovinos com peptídeos sintéticos derivados da Bm86 também foram testadas, resultando na diminuição do número, peso e capacidade de ovoposição das teleóginas (Patarroyo et al., 2002). O grupo australiano descreveu e avaliou um segundo antígeno oculto, denominado Bm91, que, em associação com Bm86, aumentou a eficácia da vacinação (Riding et al., 1994; Willadsen et al., 1996).

Além dos antígenos que compõem as vacinas comercialmente disponíveis descritas acima, outras proteínas que também conferem algum grau de proteção ou induzem a produção de anticorpos que interferem em processos fisiológicos do carrapato têm sido descritas.

Foi demonstrado que 2% dos anticorpos ingeridos por uma fêmea ingurgitada durante a refeição sanguínea em um hospedeiro vacinado estão viáveis na hemolinfa (Da Silva Vaz Jr. et al., 1996). Isto mostra que os anticorpos presentes no sangue do hospedeiro são capazes de chegar, via hemolinfa, a órgãos internos do carrapato, podendo interferir em processos fisiológicos não exclusivamente relacionados à digestão. Este resultado suporta o estudo de proteínas de órgãos que não entram em contato com o hospedeiro. Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado na caracterização de diversas proteínas do *R. microplus* presentes no intestino, nos ovários, nas glândulas salivares, nos ovos e nos tecidos de larvas.

A *Boophilus yolk pro-cathepsin* (BYC) purificada dos ovos do *R. microplus* foi capaz de induzir resposta imune protetora em bovinos contra infestações dessa carrapato.

Os efeitos protetores foram observados pela redução no número de teleóginas, capacidade de postura e fertilidade dos ovos, com eficácia variando entre 14% e 36% (Da Silva Vaz Jr. et al, 1998). O cDNA da BYC foi clonado em dois vetores plasmidiais distintos para a expressão em *Escherichia coli* de duas formas de proteína recombinante, com e sem proteína de fusão tioredoxina. As duas formas foram imuno-reativas contra soros de coelhos, camundongos e bovinos previamente imunizados com a BYC nativa (Leal et al.; 2006 a). Experimentos de vacinação de bovinos com BYC recombinante produzida em *E. coli* resultaram em um índice de proteção global de 25 % quando os bovinos foram desafiados com 20.000 larvas infestantes de *R. microplus* (Leal et al., 2006 b). A taxa de proteção induzida pela BYC nativa e pela BYC recombinante são insuficientes para permitir um controle eficiente do *R. microplus*. Uma possível razão para estes resultados se deve ao fato da BYC ser abundante nos ovos, necessitando alta concentração de anticorpos para induzir um dano significativo nos carrapatos. Dados que corroboram para essa suposição é a observação que a inoculação de anticorpos monoclonais anti-BYC em fêmeas ingurgitadas de carrapato induzem redução de fertilidade de forma dose-dependente (Da Silva Vaz Jr. et al., 1998).

Experimentos de imunização de bovinos com a *Vitellin-degrading cysteine endopeptidase* (VTDCE) demonstraram também a imunogenicidade dessa proteína. A produção de anticorpos específicos pelos animais aumentou gradualmente em resposta as imunizações com VTDCE purificada de ovos. Análises por western-blot confirmaram a presença de anticorpos anti-VTDCE no soro dos animais imunizados. Estes foram desafiados com larvas de *R. microplus* e apresentaram um índice de proteção global de 21%, sendo também observado a redução de 18 % no peso e na fertilidade dos ovos de fêmeas alimentadas nos bovinos imunizados com VTDCE (Seixas et al., 2008).

Inibidores de tripsina (BmTIs) foram detectados em diferentes fases de desenvolvimento do *R. microplus*, indicando um possível papel na interação parasita-hospedeiro. Esses BmTIs foram usados como antígenos para a imunização de bovinos que foram desafiados com larvas de carrapato. Esses bovinos apresentaram redução de 68 % no número total de carrapatos, 71 % no peso total dos ovos e 69 % no peso total das fêmeas ingurgitadas, quando comparados aos bovinos controles. A eficácia total da vacinação foi de 73 % (Andreotti et al., 2002).

O potencial imunogênico da vitelina (VT), principal proteína de reserva do ovo, foi avaliado em experimentos de imunização, usando ovinos como modelos experimentais. Foram avaliadas duas glicoproteínas derivadas do complexo vitelina, uma de 87 kDa (VIT87) e outra de 80 kDa (GP80), purificadas a partir de ovos e larvas, respectivamente. A eficácia global da imunização, mensurada pela redução no número de larvas após um ciclo completo, foi de 68% com VIT87 e 66% com GP80 (Tellam et al., 2002).

Além dos antígenos aqui citados, muitos outros têm sido testados, no entanto, nenhum apresentou eficácia para garantir a produção de uma vacina mais eficiente contra carrapatos (revisado por De La Fuente et al., 2007) e assim, ainda hoje a pesquisa de antígenos com potencial protetor constitui-se no maior desafio para o desenvolvimento de vacinas, sendo o objeto de pesquisa de vários grupos (Guerrero et al., 2006; Kocan et al., 2007; Leal et al., 2006 b; Lima et al., 2006; Peconick et al., 2008; Willadsen, 2008). Deste modo, o estudo mais detalhado da fisiologia e da bioquímica do carrapato, como o estudo dos processos envolvidos no desenvolvimento embrionário, constitui uma estratégia interessante para a identificação de novas proteínas que possam servir de alvo para novos métodos de controle do parasita.

1.5 A oogênese e a embriogênese no carrapato bovino

Assim como em todos os organismos ovíparos, a embriogênese no carrapato ocorre na ausência de nutrientes exógenos. Desse modo, durante a oogênese, nutrientes de origem materna são estocados nos oócitos em crescimento, constituindo a fonte de nutrientes para o desenvolvimento do embrião (Fagotto, 1990; Sappington e Raikel, 1998).

O ovário de *R. microplus* consiste de um órgão tubular onde óocitos de diferentes tamanhos e estágios de desenvolvimento são observados (Figura 3). Isso se deve ao fato de que oócitos de diferentes estágios de desenvolvimento são processados simultaneamente e assincrônicamente, fazendo com que oócitos em todos os estágios sejam encontrados ao mesmo tempo no ovário (Saito et al., 2005).

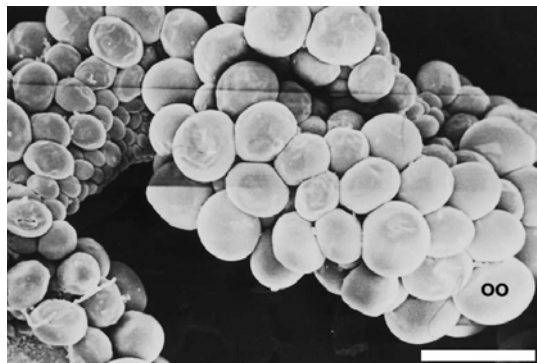


Figura 3- Microscopia eletrônica de varredura do ovário de *R. microplus* com oócitos em diferentes fases de desenvolvimento. Oo- oócito jovem, barra- 0,1 mm (Fonte: Saito et al., 2005).

A oogênese dos carrapatos está dividida em 5 estágios distintos, segundo Balashov (1972) (Figura 4). Em um estudo recente, foram apresentadas características detalhadas da morfologia e composição do ovário e dos oócitos do carrapato bovino (Saito et al., 2005): Oócitos primários, estágio I de Balashov, estão no período de pré-vitelogênese inicial, tendo pequeno tamanho e conteúdo citoplasmático homogêneo. Este estágio ocorre em

ninfas alimentadas. Após o início da alimentação hematófaga da fêmea adulta, os oócitos entram no estágio II, pré-vitelogênese tardia, onde finas granulações dispersas pelo citoplasma são observadas. O período de síntese e captação do vitelo (vitelogênese) compreende as fases III e IV da oogênese, caracterizadas por um grande aumento no volume dos oócitos e surgimento dos grânulos de vitelo maiores provenientes da fusão de grânulos menores. No estágio V de Balashov, o oócito apresenta o citoplasma completamente preenchido por grandes grânulos de vitelo, está bem desenvolvido e pronto para a ovoposição.

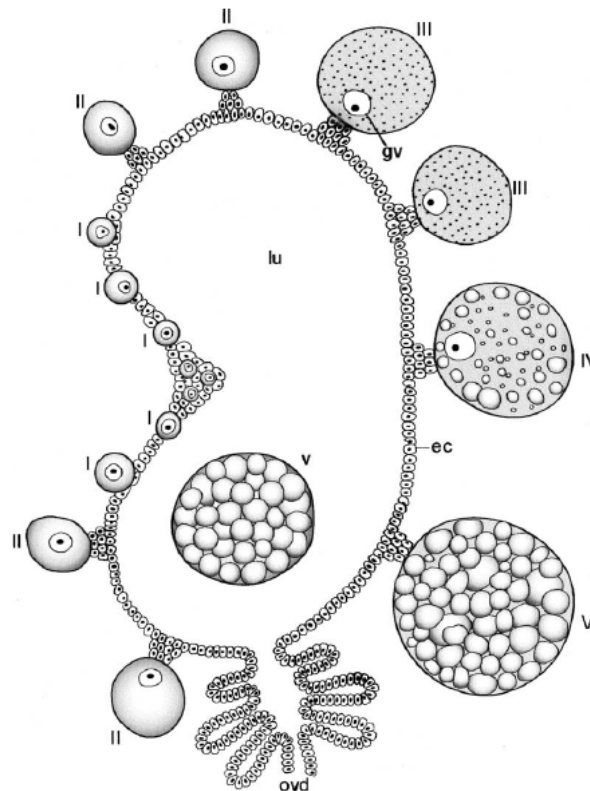


Figura 4- Diagrama esquemático da oogênese no ovário do carrapato *R. microplus*. I a V-estágios da oogênese, ec- epitélio ovariano, lu- lúmen, ovd- oviduto, gv- vesícula germinal (Fonte: Saito et al., 2005).

Após a ovoposição, o desenvolvimento embrionário do *R. microplus* é completado em 21 dias quando os ovos são mantidos a 28 °C. Até o quinto dia após a postura, o embrião é um sincício. A celularização do blastoderme ocorre no sexto dia, sendo seguida por uma rápida movimentação das células. No sétimo dia bandas do embrião segmentado já podem ser distinguidas (Figura 5) (Campos et al., 2006).

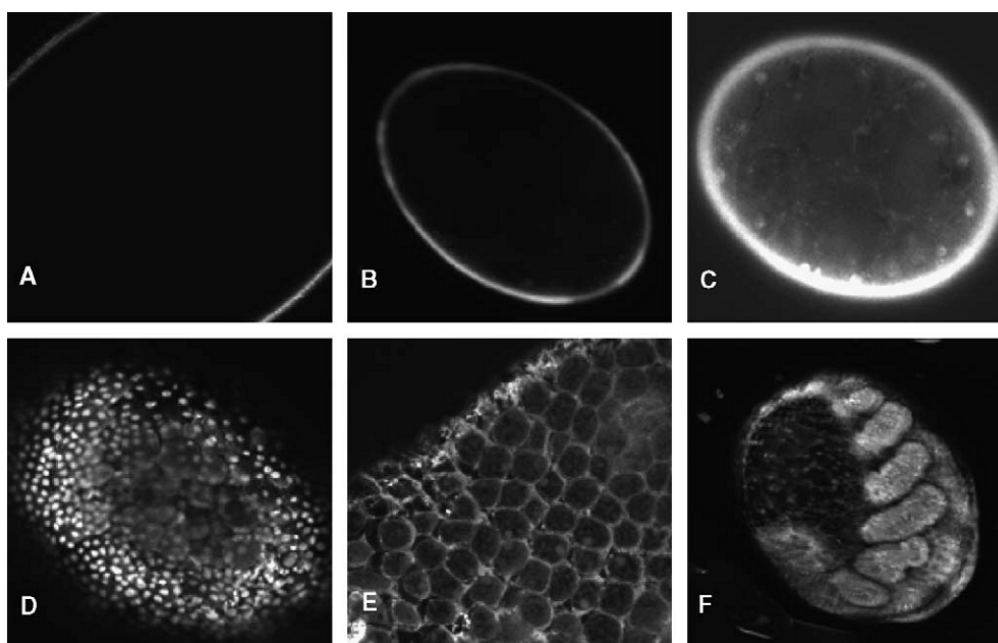


Figura 5- Morfologia do embrião de *R. microplus*. Ovos de diferentes dias após a postura foram analisados por microscopia confocal. (B-F) corados com laranja de acridina, (E) corado com azul de Evans, (A) Ovo de 6º dia sem coloração, (B) ovo de 1º dia, (C) ovo de 4º dia, (D) ovo de 6º dia, (F) ovo de 7º dia. (Fonte: Campos et al., 2006).

1.6 Os componentes do vitelo e a maquinaria enzimática

A principal proteína do vitelo dos ovos de artrópodes é a vitelina (VT), uma hemefosfolipoproteína que deriva de um precursor materno, a vitelogenina (VTG). A VTG, sintetizada no ovário e no corpo gorduroso, é secretada na hemolinfa, onde é

endocitada via receptor pelos oócitos, processada e armazenada em estruturas denominadas grânulos de vitelo como VT (Diehl et al., 1982). Estas estruturas são grandes organelas semelhantes a lisossomos que armazenam, além do substrato (VT), a maquinaria necessária para a sua utilização (Fagotto, 1990; Sappington e Raikel, 1998).

As vitelogeninas de diferentes espécies de artrópodes são polipeptídeos que variam de 200 a 700 kDa, e derivam de um precursor único, na maioria dos casos (Sappington e Raikel, 1998). As vitelinas, por sua vez, são formadas por 6 a 9 subunidades, que variam de 35 a 160 kDa, derivadas do processamento por clivagem da vitelogenina (Rosell e Coons, 1991). Os polipeptídeos da vitelina formam um complexo macromolecular não-covalente (Chen and Hillen, 1983 apud Tellan et al., 2002). A vitelina sofre freqüentemente modificações pós-traducionais, tais como, glicosilação e metilações e pode ligar heme (Boctor and Kamel, 1976; Chinzei et al., 1983; James and Oliver, 1997; Logullo et al., 2002; Rosell and Coons, 1991).

Em carrapatos, vitelogeninas ou vitelinas foram parcialmente caracterizadas em *R. microplus* (Canal et al., 1995, Tellan et al., 2002), *Amblyomma hebraeum* (Friesen e Kaufman, 2002), *Dermacentor andersoni* (Boctor e Kamel, 1976), *Ornithodoros moubata* (Chinzei et al., 1983), *Argas hermanni* (Shanbaky et al., 1990), *Dermacentor variabilis* (Rosell e Coons, 1991), *Ixodes scapularis* (James e Oliver, 1997) dentre outros.

Após a vitelogênese e a fertilização do oócito, a VT é processada de modo a fornecer o suporte energético necessário para o desenvolvimento do embrião. Várias enzimas envolvidas na degradação da VT têm sido caracterizadas nos últimos anos em diferentes modelos animais (Fagotto, 1990; Fialho et al., 2005; Logullo et al., 1998; Seixas et al., 2003; Sorgine et al., 2000). No *R. microplus*, estão descritas quatro enzimas envolvidas com a degradação de VT. Três delas em ovos, a VTDCE (Seixas et al., 2003), a

BYC (Logullo et al., 1998) e a THAP (Sorgine et al., 2000); e uma em larvas, a RmLCE (*R. microplus larvae cysteine endopeptidase*; Estrela et al., 2007).

A BYC é a protease mais abundante dos ovos do carrapato bovino. Ela é sintetizada como um precursor de aspártico protease sendo ativada por autoproteólise em condições ácidas (Logullo et al., 1998). Sua participação na degradação da VT foi confirmada *in vitro* para a proteína nativa purificada de ovos e para a proteína recombinante, demonstrando a importância dessa enzima no processo de embriogênese (Abreu et al., 2004, Nascimento-Silva et al., 2008). Sua co-localização com os grânulos de vitelo ácidos em ovos de quatro dias sugere que sua atividade é controlada pela acidificação dessas estruturas reforçando seu papel na degradação da VT (Abreu et al., 2004).

A VTDCE, uma cisteíno-endopeptidase degradadora de VT, foi também purificada a partir de ovos de *R. microplus* e caracterizada. Essa enzima é naturalmente associada a VT, sendo ativada por acidificação. Os ensaios enzimáticos demonstraram atividade da VTDCE frente a vários substratos sintéticos, além de hemoglobina, albumina, gelatina e vitelina, este último sendo seu provável substrato natural. Essa atividade foi demonstrada em larvas não alimentadas, ovários e ovos de fêmeas ingurgitadas, sugerindo um papel na embriogênese do carrapato (Seixas et al., 2003).

A THAP foi também isolada dos ovos do *R. microplus* e sua caracterização constitui o primeiro relato de uma aspártico-endopeptidase capaz de ligar heme e ter sua atividade regulada por essa molécula (Sorgine et al., 2000). A THAP constitui o objetivo central desse trabalho e maiores informações sobre suas características serão fornecidas posteriormente.

A RmLCE é uma cisteíno-endopeptidase que foi parcialmente purificada de larvas de 0 a 12 dias de *R. microplus* (Estrela et al., 2008). Esta enzima foi capaz de hidrolisar VT

e com o passar dos dias após a eclosão da larva esta atividade proteolítica aumenta concomitantemente com o conteúdo de proteína total, sugerindo que ela seja responsável pela nutrição da larva até o início da alimentação hematófaga.

1.7 Sítios de síntese das proteínas do vitelo

Os ovos dos artrópodes necessitam de grandes quantidades de proteínas do vitelo para o desenvolvimento do embrião, muitas das quais são sintetizadas fora dos oócitos, principalmente no corpo gorduroso, mas também nas células foliculares do ovário e no intestino (Giorgi et al., 1999).

O corpo gorduroso em artrópodes é o órgão que sintetiza e estoca reservas alimentares, metaboliza hormônios e outras moléculas mensageiras, além de detoxificar compostos nocivos ao organismo. Por seu valor funcional, o corpo gorduroso tem sido comparado ao fígado de mamíferos (revisado em Sonenshine, 1991). Diferentemente dos insetos, onde o corpo gorduroso é um órgão discreto concentrado na região abdominal, em carrapatos este é um órgão difuso composto de cordas e membranas de células aderidas às traqueas, em grupamentos logo abaixo da epiderme, ou ao redor do sistema reprodutivo e outros órgãos internos. As células primárias deste tecido são denominadas trofócitos e sua ultra-estrutura é típica de células que fazem síntese proteica (Coons et al, 1990). No carrapato *Amblyomma cajennense* os trofócitos de fêmeas parcialmente ingurgitadas (partenóginas) possuem grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, sugerindo que estas células sintetizam proteínas que podem ser estocadas nestas células ou liberadas diretamente na hemolinfa (Denardi et al., 2008).

O intestino dos carrapatos é dividido em intestino anterior (“foregut”), médio (“midgut”) e posterior (“hindgut”) (Sonenshine, 1991). O intestino médio ocupa a maior

parte da cavidade corporal cobrindo os órgãos internos dorsalmente (Balashov, 1972). O intestino médio é responsável pela digestão dos componentes sanguíneos e pode funcionar também em outras atividades fisiológicas importantes, como a síntese da vitelogenina e de endopeptidases (Sonshine, 1991). No carrapato *D. variabilis*, o epitélio do intestino médio possui um tipo especializado de células (células basofílicas) que aumentam de tamanho e permanecem proeminentes durante a digestão sanguínea, período de pré-ovoposição e ovoposição. Análises ultraestruturais destas células indicaram a presença de grandes quantidades de retículo endoplasmático rugoso, inclusões lipídicas, espaços extracelulares laterais e um labirinto basal bem desenvolvido, características de células envolvidas com a síntese de grandes quantidades de proteínas secretadas (Tarnowski e Coons, 1989). Os autores concluíram que estas células apresentam a mesma estrutura dos trófócitos do corpo gorduroso. No carrapato *R. microplus* o citoplasma das células basofílicas é repleto de retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e grânulos secretórios, mas não possuem vesículas de pinocitose e lisossomos tais como as células digestivas. Além disso, as células basofílicas estão em contato com a hemolinfa e sua morfologia indica um papel no transporte de água através do intestino e na secreção de produtos (Agbede e Kemp, 1987).

Grande número de proteínas da hemolinfa são endocitadas pelos oócitos e estocadas dentro dos grânulos de vitelo durante a vitelogênese. Assim como a vitelina já mencionada (Diehl et al., 1982), endopeptidases envolvidas com sua hidrólise podem também ser sintetizadas em tecidos extra-ovarianos. No entanto, uma grande diversidade entre os sítios de síntese é observada quando diferentes endopeptidases e artrópodes são comparados.

No mosquito *Aedes aegypti*, uma serino carboxipeptidase (VCP) e uma catepsina-B (VCB) são sintetizadas como pró-enzimas no corpo gorduroso, secretadas na hemolinfa,

endocitadas e acumuladas pelos oócitos em desenvolvimento (Cho et al.,1991, 1999). Na mariposa *Helicoverpa armigera*, os transcritos correspondentes a uma cisteíno-endopeptidase capaz de degradar VT foram detectados no corpo gorduroso e nas células foliculares do ovário da fêmea adulta desta espécie (Zhao et al., 2002). Na barata *Blattella germanica*, uma cisteíno-endopeptidase responsável pelo processamento da vitelina (Liu et al., 1996) é sintetizada no corpo gorduroso de fêmeas adultas (Liu e Nordin, 1998) estando co-localizada com a VTG nos trofócitos do corpo gorduroso (Yin et al., 2001). A BYC, uma aspártico protease dos ovos do carrapato *R. microplus* já mencionada anteriormente, é sintetizada no intestino e no corpo gorduroso, secretada na hemolinfa e acumulada no ovário (Logullo et al., 1998). A VTDCE de *R. microplus* é também sintetizada em tecidos extra-ovarianos, apresentando o mesmo perfil de síntese observado para a BYC (Adriana Seixas, comunicação pessoal).

Outras endopeptidases, no entanto, são sintetizadas no ovário e diretamente acumuladas nos oócitos, sem serem exportadas para a hemolinfa. Este é o caso de uma serino-endopeptidase (ESP-proteinase) e da cisteíno-endopeptidase (BCP) de *Bombyx mori* (Indrasith et al.,1988; Yamamoto et al., 1994) que são sintetizadas durante a vitelogênese pelas células foliculares do ovário e acumuladas pelos oócitos.

1.8 O controle da degradação dos componentes do vitelo

Como mencionado anteriormente, os grânulos de vitelo são como lisossomos modificados, pois além de armazenarem as substâncias de reserva, possuem a maquinaria enzimática necessária para a disponibilização destes nutrientes. Diferentemente dos lisossomos clássicos, que são organelas capazes de rapidamente reduzir praticamente qualquer proteína a aminoácidos, açúcares e outros produtos menores, os grânulos de vitelo

atuam na degradação do seu conteúdo interno de maneira controlada (Fagotto, 1995). Esta regulação na utilização do vitelo é essencial para que sejam providenciados nutrientes em sincronia com o desenvolvimento do embrião, garantindo assim, a sua sobrevivência até se tornar um organismo apto a alimentar-se. Muitos estudos têm demonstrado que a proteólise da VT é ativada após a fertilização do oócito, com o início da embriogênese, sendo regulada por mecanismos que controlam a atividade proteolítica das enzimas presentes nos grânulos de vitelo (Fagotto, 1995).

Há diversas evidências mostrando que o pH é um regulador chave da degradação do vitelo. Em diversas espécies, tais como os carrapatos *R. microplus* (Abreu et al., 2004) e *O. moubata* (Fagotto, 1991), a barata *B. germanica* (Liu et al., 1996), a rã *Xenopus laevis* (Fagotto e Maxfield, 1994) e o mosquito *A. aegypti* (Cho et al., 1999), os grânulos de vitelo são inicialmente neutros e tornam-se acidificados durante o desenvolvimento inicial do embrião, causando a ativação de várias enzimas e a degradação dos constituintes do vitelo. No entanto, somente o controle do pH é insuficiente para prevenir completamente a proteólise prematura dos grânulos de vitelo durante o período de oogênese e outros fatores como a latência enzimática parecem ser necessários (Fagotto, 1995).

Investigando o carrapato *O. moubata*, Fagotto (1990) mostrou que a degradação da VT durante a embriogênese pode ser atribuída a uma cisteíno-endopeptidase do tipo catepsina-L, que é estocada nos grânulos de vitelo como uma pró-enzima e é proteoliticamente ativada após a redução do pH durante a embriogênese. Em *B. mori* um precursor de cisteíno-endopeptidase (pró-BCP) dos ovos é convertido à forma ativa por autoproteólise em pH ácido (Takahashi et al., 1993; Yamahama et al., 2003). Estudos sobre a embriogênese de *Musca domestica* revelaram que um precursor de cisteíno-endopeptidase do tipo catepsina-B, responsável pela degradação de componentes do vitelo,

está presente como uma pró-enzima de 55 kDa que é ativada em duas etapas. Os autores sugerem que primeiramente, induzido pela redução no pH, ocorre uma hidrólise intramolecular na cadeia polipeptídica, reduzindo esta a 48 kDa que sofre então uma autoproteólise gerando a enzima madura de 41 kDa (Ribolla e Bianchi, 1995). Em *A. aegypti*, a VCP é ativada nos ovos no início do desenvolvimento embrionário. Sua ativação está associada com a redução no seu tamanho de 53 kDa (pró-enzima inativa) para 48 kDa (enzima ativa) que está presente em maior quantidade no meio do desenvolvimento embrionário e desaparece no final (Cho et al., 1991). Nesta mesma espécie a VCB é secretada pelo corpo gorduroso de fêmeas vitelogênicas como uma pró-enzima de 44 kDa. Após sua internalização pelos oócitos, a VCB sofre um primeiro processamento que reduz a enzima a 42 kDa e, com o início da embriogênese, ela sofre novo processamento para 33 kDa, forma ativa sobre VT. No carrapato *R. microplus*, a aspártico-endopeptidase BYC é também sintetizada na forma de pró-enzima com 54 kDa. A incubação desta em pH 3,5 resultou na sua autoproteólise com a formação da enzima madura com 49 kDa. Análises por western-blot com anticorpo monoclonal anti-BYC revelaram a ativação dessa enzima durante a embriogênese (Logullo et al., 1998). Mais recentemente, Abreu et al. (2004) mostraram que a BYC apresenta atividade ótima em pH ácido e está co-localizada com os grânulos de vitelo acidificados nos ovos de *R. microplus*, sugerindo a importância do pH ácido na ativação e atividade proteolítica dessa enzima.

Além da ativação por acidificação existem outras hipóteses como o controle transcricional das enzimas responsáveis por esta hidrólise (Ikeda et al., 1991); a proteólise limitada das pró-enzimas latentes; ou a remoção de inibidores específicos (Fagotto, 1995). Além disso, muito pouco se sabe ainda sobre os mecanismos que controlam a própria suscetibilidade da VT ao ataque proteolítico. Fialho et al. (2002) sugeriram pela primeira

vez que a defosforilação das proteínas do vitelo pode estar relacionada com a sua utilização. Eles verificaram que a fecundação dos ovos do barbeiro *Rhodnius prolixus* ativa uma fosfatase ácida que se correlaciona com a defosforilação da VT e proteólise *in vivo*. Corroborando a hipótese, foi demonstrado que a inibição da fosfatase ácida diminui a suscetibilidade da VT à degradação por catepsina-D (Fialho et al., 2005). Silveira et al. (2006) analisando a correlação entre a proteólise e a fosforilação da VT no *R. microplus*, verificaram que os resíduos fosfotirosina da VT são gradualmente removidos durante a embriogênese do carrapato pela ação de uma tirosina-fosfatase. Esta enzima foi fortemente inibida por molibdato de amônio, vanadato de sódio e íon cúprico. Quando um homogenado total de ovos foi incubado com molibdato de amônio, tanto a defosforilação quanto a proteólise da VT foram bloqueadas. A defosforilação da VT com lambda-fosfatase e subsequente incubação com catepsina-D bovina resultou num aumento drástico da proteólise da VT. Estes dados demonstram a importância do mecanismo de defosforilação na proteólise da VT, o processo bioquímico mais importante para o desenvolvimento do embrião.

1.9 O metabolismo do heme no *R. microplus*

O heme (ferro-protoporfirina IX) está presente em todas as células vivas como grupo prostético de uma grande variedade de proteínas, tais como citocromos, hemoglobinas e peroxidases, que participam de vias metabólicas essenciais (Lara et al., 2005). Por outro lado, esta molécula é extremamente reativa e está relacionada com a formação de espécies reativas de oxigênio (Deterding et al., 2004), que são capazes de promover danos oxidativos em lipídeos, proteínas e no DNA. Além disso, sendo um ânion lipofílico, tem capacidade de alterar a permeabilidade e seletividade da membrana

plasmática das células (Alf e Muller, 1983; Schmitt et al., 1993; Vicent, 1989). Devido a este potencial tóxico, o heme encontra-se normalmente associado com proteínas e vários mecanismos antioxidantes foram desenvolvidos para proteger as células.

Artrópodes hematófagos enfrentam uma situação muito especial em relação ao metabolismo do heme porque ingerem grandes quantidades de sangue do seu hospedeiro vertebrado. Mosquitos e barbeiros triatomídeos ingerem de três a dez vezes seu próprio peso em sangue do seu hospedeiro vertebrado. No caso dos carrapatos ixodídeos, o volume de sangue ingerido por uma fêmea pode ser superior a cem vezes o peso inicial do ectoparasito. A hemoglobina é a proteína mais abundante no sangue dos mamíferos e sua degradação no sistema digestivo desses animais resulta na liberação de altas concentrações de heme, seu grupo prostético (Graça-Souza et al., 2006; Lara et al., 2005). Isso representa uma forte pressão seletiva que precisou ser contrabalançada, durante o curso de evolução da hematofagia, pela geração de mecanismos de proteção contra o poder oxidativo do heme.

A formação de agregados insolúveis de heme no sistema digestivo de animais hematófagos parece constituir a primeira linha de defesa contra a toxicidade do heme. No barbeiro *R. prolixus*, um vetor da doença de Chagas, o heme liberado pela degradação da hemoglobina no lume intestinal é convertido a um agregado cristalino especial, a hemozoína, protegendo desta forma, as células do epitélio intestinal (Oliveira, 1999 e 2000). A hemozoína foi descrita primeiramente nos parasitas do gênero *Plasmodium* e posteriormente em outros organismos tais como o *Schistosoma mansoni*, *Haemoproteus columbae* e *R. prolixus* (Graça-Souza et al., 2006). No mosquito *A. aegypti* o heme é retido em uma matriz peritrófica formada de proteínas e polissacarídeos que separa as células do intestino do bolo de sangue (Pascoa et al., 2002).

Enzimas antioxidantes e proteínas ligadoras de heme também possuem papel especial na proteção das células contra a citotoxicidade do heme. No inseto *R. prolixus* foi demonstrada a presença de uma proteína ligadora de heme (RHBP) na hemolinfa que o protege dos danos oxidativos que poderiam ser causados por essa molécula (Oliveira et al., 1995).

Junto com alguns organismos unicelulares como bactérias patogênicas e tripanossomatídeos que se alimentam de sangue, o carrapato *R. microplus* é o único organismo multicelular incapaz de sintetizar suas próprias moléculas de heme (Braz et al., 1999). Como consequência disso, o carrapato bovino, deve retirar as moléculas de heme necessárias para a construção de suas hemoproteínas da dieta, ou seja, do sangue do hospedeiro. Isso levou ao desenvolvimento de mecanismos muito refinados para a absorção, transporte, reciclagem do heme e proteção contra seus efeitos danosos, que até o momento não haviam sido descritos em nenhum outro organismo multicelular.

Em contraste ao que é observado na maioria dos artrópodes hematófagos, a digestão dos componentes do sangue no carrapato *R. microplus* ocorre no interior das células intestinais levando a liberação de grandes quantidades de heme dentro das células (Lara et al., 2005; Liyou et al., 1996). Análises da digestão da albumina e da hemoglobina, as principais proteínas do sangue vertebrado, revelaram que a entrada da hemoglobina nas células intestinais desse carrapato parece ser mediada por receptores de superfície celular específicos, que a direcionam para uma população de grandes vesículas digestivas. Isso não é observado para a albumina, que entra na célula de forma não específica e é direcionada para uma população distinta de pequenas vesículas digestivas (Lara et al., 2005). Lara et al. (2003) também descreveram uma nova via de detoxificação intracelular do heme no *R. microplus*. Eles observaram que a maioria do heme produzido pela

degradação da hemoglobina é acumulado como um agregado não-cristalino - diferentemente da hemozoína - no interior de organelas delimitadas por membrana nas células intestinais, denominadas hemossomas, e uma pequena parte entra na hemolinfa do carrapato. Para evitar os possíveis danos causados pelo heme, a HeLp (Heme Lipoprotein), principal proteína da hemolinfa do *R. microplus*, realiza o transporte do heme da hemolinfa aos tecidos onde este será utilizado na síntese de hemoproteínas (Maya-Monteiro et al., 2000 e 2004).

Outra importante observação resultante da incapacidade de sintetizar heme está relacionada à reprodução desse carrapato. Para o desenvolvimento do embrião, o vitelo dos ovos além de fornecer os aminoácidos necessários para a síntese protéica deve também conter toda a quantidade necessária de heme. Nesse contexto, a vitelina, parece ter um importante papel no desenvolvimento embrionário. No *R. microplus* parecem atuar também como proteínas ligadoras de heme, funcionando não somente como fonte de heme, mas também como moléculas antioxidantes. Logullo et al. (2002) apresentaram evidências de que a vitelina é o principal reservatório de heme que, além de ser fonte dessa molécula durante sua degradação, liga-se a qualquer molécula de heme livre que exceda a quantidade necessária para o desenvolvimento embrionário.

1.10 A proteína *Tick heme-binding aspartic proteinase* (THAP)

A THAP foi purificada dos ovos do *R. microplus* e apresentou atividade proteolítica, sensível à pepstatina A, contra substratos sintéticos e protéicos e pH ótimo 3,5, caracterizando-a como uma aspártico-endopeptidase (E.C. 3.4.23). Além disso, a análise da seqüência de aminoácidos predita, baseada na análise do fragmento de DNA clonado, revelou a presença dos dois resíduos catalíticos de ácido aspártico no sítio ativo,

típicos de aspártico-endopeptidases. A THAP constitui o primeiro relato de uma aspártico-endopeptidase capaz de ligar heme e ter sua atividade regulada por essa molécula (Sorgine et al., 2000). Hemoglobina foi um bom substrato para a THAP, no entanto, baixa atividade foi observada contra globina desprovida do grupamento prostético heme. Essa atividade foi aumentada com a adição de heme a reação, com máximo de ativação numa proporção heme: globina de 1:1. A atividade hidrolítica da THAP sobre a VT, seu provável substrato fisiológico, foi inibida pela adição de heme livre a reação. Estudos de ligação de heme pela THAP demonstraram que ela liga heme com estequiometria 1:1, sugerindo a presença de um único sítio de ligação à heme distinto do sítio ativo, já que a ligação de heme a THAP não interfere na sua atividade contra substrato sintético (Sorgine et al., 2000).

Uma importante consequência proveniente do fato da atividade da THAP ser regulada pela ligação de heme está relacionada à citotoxicidade dessa molécula. Durante a oogênese, grandes quantidades de VT contendo heme são internalizadas pelos oócitos do *R. microplus*, e esta fonte energética é subsequenteemente degradada durante a embriogênese. Como o heme é um gerador de radicais livres, a taxa de degradação da VT deve se igualar a utilização do heme liberado para evitar a formação de um “pool” de heme livre potencialmente perigoso para o embrião. Enquanto que o conteúdo de heme da VT favorece a atividade proteolítica da THAP, a liberação de um excesso de heme livre pela degradação de VT pode inibir a ligação da THAP a esse substrato, diminuindo assim, o ritmo da proteólise e prevenindo um estresse oxidativo. Desse modo, o sítio de ligação de heme da THAP deve funcionar como um sítio de ancoragem que reconhece heme sobre a superfície do substrato protético, aumentando sua especificidade para hemeproteínas e fornecendo um possível mecanismo de regulação da degradação da VT no *R. microplus* (Sorgine et al., 2000).

2 OBJETIVOS GERAIS

Determinar o papel da *Tick heme-binding aspartic proteinase* (THAP) no desenvolvimento embrionário do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

2.1 Objetivos Específicos

- a) Investigar a transcrição e síntese protéica da THAP de acordo com o estágio de vida e os diferentes tecidos da fêmea de *R. microplus*;
- b) Investigar a transcrição e síntese protéica da THAP em ovos;
- c) Avaliar a atividade enzimática da rTHAP sobre substrato sintético;
- d) Determinar a participação da THAP no processo de degradação da VT;
- e) Investigar os possíveis mecanismos pelos quais a atividade da THAP pode ser regulada.

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos durante o mestrado estão descritos no artigo aceito para publicação:

An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity

Paula C. Pohl, Marcos Henrique F. Sorgine, Alexandre T. Leal, Carlos Logullo, Pedro L. Oliveira, Itabajara da Silva Vaz Jr, Aoi Masuda

Comparative Biochemistry and Physiology, [doi:10.1016/j.cbpb.2008.08.008](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.08.008)

Colaboração dos autores no trabalho:

Paula C. Pohl: caracterização da expressão da THAP, clonagem da THAP e produção da proteína recombinante, caracterização da atividade da rTHAP sobre substratos sintéticos e naturais.

Marcos Sorgine: Imunolocalização da THAP em ovário

Alexandre T. Leal, Carlos Logullo, Pedro L. Oliveira, Itabajara da Silva Vaz Jr e Aoi Masuda: orientação na execução dos experimentos.

Accepted Manuscript

An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity

Paula C. Pohl, Marcos Henrique F. Sorgine, Alexandre T. Leal, Carlos Logullo, Pedro L. Oliveira, Itabajara da Silva Vaz Jr., Aoi Masuda

PII: S1096-4959(08)00214-5
DOI: doi: [10.1016/j.cbpb.2008.08.008](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.08.008)
Reference: CBB 9107

To appear in: *Comparative Biochemistry and Physiology*

Received date: 11 July 2008
Revised date: 11 August 2008
Accepted date: 12 August 2008

Please cite this article as: Pohl, Paula C., Sorgine, Marcos Henrique F., Leal, Alexandre T., Logullo, Carlos, Oliveira, Pedro L., da Silva Vaz Jr., Itabajara, Masuda, Aoi, An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity, *Comparative Biochemistry and Physiology* (2008), doi: [10.1016/j.cbpb.2008.08.008](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.08.008)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Title

An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity

Authors

Paula C. Pohl^a, Marcos Henrique F. Sorgine^b, Alexandre T. Leal^a, Carlos Logullo^c, Pedro L. Oliveira^b, Itabajara da Silva Vaz Jr^{a,d*}, Aoi Masuda^{a,e}.

Affiliations

a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Porto Alegre – RS 91501-970, Brazil

b Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, Brazil

c Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes- RJ, Brazil

d Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil

e Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 (51) 3308-6078, Fax: +55 (51) 3308-7309. *Email address:* ita@cbiot.ufrgs.br (I. da Silva Vaz Jr).

Abstract

An aspartic endopeptidase named THAP, from the eggs of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, has been suggested to be involved in vitellin degradation. Here we characterized this enzyme further, showing that THAP mRNA is present in the fat body, midgut and ovary of ticks, in two developmental stages (partially and fully engorged females). However, higher transcription levels were found in fully engorged vitellogenic females. The THAP protein was detected in the haemolymph, midgut and fat body and, in higher quantity, in the ovary of fully engorged females, and it was present throughout embryo development. The protein is synthesized as a higher molecular mass form and after the onset of embryogenesis THAP is converted into an active form by autocatalysis. We also produced a recombinant protein (rTHAP) in *E. coli* that was active in the fluorogenic peptide substrate and able to hydrolyze vitellin from 7-day-old eggs in a reaction that is heme-sensitive and inhibited by pepstatin A. However, rTHAP does not hydrolyze vitellin from 1 and 12-day-old eggs. As a result, we suggest a model for THAP synthesis, transport, storage and activation and for the role it plays in embryonic development by participating in vitellin processing.

Keywords: Endopeptidase, Synthesis, THAP, Tick, Vitellin processing

1 Introduction

The hard tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is the cause of substantial economic losses to the livestock industry. Current tick control methods are based on the use of acaricides (Graef et al., 2004), leading to problems such as chemical residues in meat and milk, and to the selection of drug-resistant ticks, which have long been acknowledged and stimulated interest in immunological and biological tick control strategies (Kunz and Kemp, 1994). An anti-tick vaccine is supposed to be one of the most promising alternative methods (Sonenshine et al., 2006; Willadsen, 2006); however, its development depends on the identification of tick molecules and characterization of their roles in arthropod physiology (Willadsen, 2004).

A major biochemical event of egg development in oviparous organisms is the utilization of yolk components that have been stored in the eggs during oogenesis. Tick oogenesis starts in the female ovary during the feeding period. Vitellogenin is produced in the fat body, exported to maternal haemolymph, and then accumulates in oocytes as vitellin (VT) (Diehl et al., 1982). VT is the main yolk component of arthropods' eggs (Sappington and Raikhel, 1998). After vitellogenesis and oocyte fertilization, this hemephospholipoglycoprotein is processed to support the amino acid source for embryo development (Campos et al., 2006).

A variety of proteolytic enzymes have been implicated in VT degradation, ranging from neutral serine endopeptidases (Ikeda et al., 1990) to acidic cysteine endopeptidases, such as Cathepsins B and L (Medina et al., 1988; Fagotto, 1990; Seixas et al., 2003; Fialho et al., 2005). Also, Cho et al. (1999) described a Cathepsin B-like endopeptidase (VCB, for vitellogenic cathepsin B) in *Aedes aegypti* that is synthesized as an inactive precursor by the fat body of vitellogenic females, secreted to the haemolymph and taken up by the

growing oocytes. This protein is converted to its active form after eggs are laid, at the onset of embryonic development. The embryo extract containing VCB is able to degrade vitellogenin, the VT precursor, *in vitro*. In the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*, an aspartic endopeptidase has been related to VT degradation (Nussenszveig et al., 1992), and in the tick *R. microplus*, an aspartic endopeptidase precursor, BYC (*Boophilus* Yolk Cathepsin) has been proposed to play a role in VT degradation during embryogenesis (Logullo et al., 1998).

Previously, Sorgine et al. (2000) have shown that the eggs of the hard tick *R. microplus* contain an aspartic endopeptidase named THAP, which stands for Tick Heme-binding Aspartic Proteinase, with unique properties. The authors showed that hydrolysis of globin by THAP increased when heme were added to reaction, although the addition of an excess of free-heme in the reaction medium inhibited proteolysis. Also, VT hydrolysis by THAP was sensitized by the addition of an excess of free-heme, suggesting that in addition to its proteolytic active site, THAP has a heme-binding site that works as a docking-site, recognizing heme molecules on the surface of protein substrates. This site increases the specificity towards hemeproteins and provides a possible regulation mechanism of VT (a hemeprotein) degradation. This mechanism represents a novel way of regulation the activity of endopeptidases.

In this work, we have investigated additional physiological and physicochemical features of THAP. The THAP transcription and synthesis sites were determined, and a recombinant THAP was produced through cloning in pET system and expression in *E. coli*. The recombinant enzyme was active against synthetic and natural substrates, exhibiting a selective proteolysis towards VT subunits.

2 Materials and Methods

2.1 Ticks and eggs

Porto Alegre strain ticks were reared on calves, which were brought from a naturally tick-free area and maintained in insulated individual boxes at the Faculdade de Veterinária of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Calves were infested with 15-day-old tick larvae. After 22 days, partially engorged and fully engorged adult females ticks were collected. Fully engorged females were incubated at 28°C and 80% relative humidity until completion of oviposition. Eggs from the 1st, 3rd, 7th, 9th, 12th and 18th days after oviposition were collected and stored at -70 °C.

2.2 Relative quantitation of THAP mRNA

To evaluate THAP mRNA expression, total RNA was extracted from the midgut, ovary and fat body of partially and fully engorged females and eggs from the 1st, 3rd, 7th, 9th, 12th and 18th days after oviposition. Ticks were washed with 70% ethanol and rinsed with PBS prior to dissection of midgut, ovary and fat body under a microscope. Total RNA was extracted using TRIzol[®] reagent (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. RNA quantity and quality were estimated by spectrophotometry at 260/280 nm. One microgram of total RNA was reverse-transcribed at 37°C using the High-capacity cDNA Reverse Transcription kit with random primers according to manufacturer's recommendations (Applied Biosystems).

THAP-mRNA quantification was carried out by quantitative PCR (qPCR) with Light Cycler Fast Start DNA master plus SYBR Green I amplification kit in glass capillaries using a Light Cycler instrument (Roche Applied Science). For THAP (GenBank accession no. **AF286865**) amplification, the gene-specific primers were designed

(5'TGAGCAAGCAGCCCAGTGAGC3'; forward primer and 5'ACCACTGTAGGGCATCCACCGA3; reverse primer) to permit the amplification of a 181-bp PCR product. As a control, cDNA encoding 40-S ribosomal protein (GenBank accession no. **EW679928**) was amplified with primers sequences: forward primer 5'GGACGACCGATGGCTACCT3' and reverse primer 5'TGAGTTGATTGGCGCACTTCT3' (amplification of a 69-bp PCR product). Cycling parameters were 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 10 s at 95°C, 5-s annealing at 60°C (THAP PCR) or 47°C (40-S PCR) and extension at 72°C for 5 s. Once amplification was completed, the melting curve analysis was performed as follows: denaturation at 95°C for 20 s and annealing at 45°C for 30 s followed by a gradual increase in temperature (transition rate of 0.1°C/s) to 85°C with continuous fluorescence acquisition. The standard curves for THAP and 40-S were determined with 1/2, 1/5, 1/10 and 1/20 cDNA dilutions in duplicate, and for the analyses 300 ng cDNA were added to each reaction. A positive result was determined by identifying the threshold cycle (CT) value at which reporter dye emission could be observed above the background. The relative amount of THAP produced per unit of 40-S was calculated for each sample. Each analysis was conducted in triplicate. The relative expression ratio of THAP gene in each experiment was calculated according to the mathematical model described by Pfaffl (2001) in Relative Expression Software Tool (REST-MCS[®], version 2) (Pfaffl et al., 2002). Statistical analysis was performed using the Microsoft Excel Software. The two-way ANOVA was used to compare tree independent experiments.

2.3 Preparation of tick extracts

Tick extracts were prepared with midgut, ovary and fat body of partially and fully engorged females and eggs from the 1st, 3rd, 7th, 9th, 12th and 18th days after oviposition. Each tissue was collected from five ticks and 250 mg of eggs were separately homogenized in a Potter-Elvehjem tissue grinder with 1 ml of buffer with 100 mM Tris-HCl, EDTA 5 mM buffer, pH 7.4, with leupeptin (10 μ M), PMSF (100 μ M) and pepstatin A (1 μ M) (Logullo et al., 1998). In addition, haemolymph was collected from fully engorged females by cutting the cuticle and gently pressing the tick's abdomen. Protein concentrations were estimated by spectrophotometry at 280 nm.

2.4 Electrophoresis and Immunoblot analysis

SDS-polyacrylamide gels (7.5% or 10%) were electrophoresed at a 20-mA constant current (Laemmli, 1970). Gels were stained with Coomassie brilliant blue G or transferred to a nitrocellulose membrane and probed with anti-native THAP rabbit serum and anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate as previously described (Sorgine et al; 2000).

Image acquisition of SDS-PAGE was performed with a scanner and densitometry analysis was carried out using ImageJ software (Abramoff et al; 2004). Band intensities were expressed as relative percentages.

2.5 Histology and immunolocalization of THAP

Ovaries of fully engorged females were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS overnight at 4°C. After fixation, the tissue was washed in PBS, and then infiltrated in a 3.5% sucrose solution in sodium phosphate buffer 0.1 M pH 7.2. The tissue was properly placed under a dissecting microscope in an aluminium chamber filled with OCT embedding medium, and transverse sections were cut to 10- μ M thickness. The sections

were mounted on glass slides and processed for THAP immunolocalization. Ovary sections were incubated with 50 mM NH₄Cl PBS for 30 minutes. The samples were blocked with 1.5% albumin-PBS for 60 min. After incubation with anti-THAP rabbit serum or non-immune rabbit serum for 60 min, the sections were washed with blocking buffer and incubated with anti-rabbit IgG fluorescein conjugate (Molecular Probes) diluted in blocking buffer for 60 min in the dark. The preparations were mounted with 0.2 M n-propyl gallate in 9:1 glycerol-PBS. The sections were analyzed using a Zeiss laser scanning microscope (LSM 310), operating in confocal mode. The images obtained were all equally processed using Adobe Photoshop software.

2.6 Cloning of THAP cDNA

The cDNA encoding THAP was previously cloned by RT-PCR in tick eggs (Sorgine et al, 2000). According to THAP amino acid sequencing, the cDNA was incomplete, without the coding sequence for the four N-terminal amino-acids. The full coding sequence was restored by PCR and the amplicon was cloned into pET-43a expression vector (Novagen). This vector encodes an N-terminal Nus-Tag-6xHis-Tag-S-Tag fusion sequence, followed by thrombin and enterokinase cleavage sites and a multiple cloning site region. For cloning into *Bam*HI and *Psh*AI sites, the following specific-THAP primers were used: forward 5'**AGAATTTGCGCTGCAGTTAGGCTGGCACGACCC**3'; reverse 5'AAAAAAAGGATCCCTAGACCGTGGCAAATC3' (the bases coding the missing amino acids are in bold, BamHI restriction site is underlined). PCR amplification with Elongase polymerase (Invitrogen) was performed using 80 ng of template plasmid (pT7-Blue/THAP). Reaction conditions were an initial 3-min denaturation at 94°C, 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 53.5°C, 2 min at 68°C, and a 5-min final extension at 68°C. The 1065-

bp amplified fragment encoding the THAP was digested with *Bam*HI and cloned into plasmid at *Bam*HI and *Psh*AI restriction sites with *T4*-DNA ligase (Invitrogen) to give the pET43a-THAP plasmid. *E. coli* XL1-Blue cells were transformed by eletroporation with the resulting plasmid and selected in Luria-Bertani (LB) agar medium containing ampicillin (100 µg ml⁻¹). The integrity of the THAP coding sequence was confirmed by PCR, enzyme restriction and sequencing analyses.

2.7 Expression of recombinant protein (*rTHAP-NusTag*)

To establish the best strain for recombinant protein production, nine *E. coli* BL21 (DE3) strains were transformed with the plasmid pET43a-THAP and plated onto LB agar plates containing ampicillin (100 µg ml⁻¹). Strains used were BL21 Star (DE3), BL21(DE3) pLysE, BL21(DE3) pLysS, Rosseta (DE3), BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, BL21-CodonPlus (DE3)-RP, BL21(DE3) pT-GroE, BL21(DE3) pT-TRX, C43 (DE3). Single colonies from each strain were inoculated into 1 ml LB medium containing ampicillin and grown overnight at 37°C at 180 rpm. Four ml LB medium were inoculated with 160 µl from overnight cultures and incubated at 37°C at 180 rpm until an OD₆₀₀ of 0.8 was reached. For induction, isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) was added to a final concentration of 1 mM and cultures were grown at 37°C for 4 h. The cell cultures were centrifuged at 10,000g for 10 min at 4°C and the cell pellet was resuspended in 300 µl H₂O and 300 µl SDS sample buffer. Samples were analyzed by 10% SDS-PAGE. To determine the best condition for the THAP-soluble expression, a similar protocol was used, but the induced cultures were grown at 37°C or 23°C for 4 h. The cell pellet was resuspended in PBS, frozen, thawed out and sonicated in ice. The soluble and insoluble fractions were

separated by centrifugation at 10,000g for 10 min at 4°C and analyzed by 10% SDS-PAGE.

The rTHAP was prepared in a large scale from *E. coli* BL21(DE3)-RIL grown in 500 ml LB medium at 23 °C for 4 h. The cell pellet was collected as described above and resuspended in ligation buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 60 mM imidazole). The cells were lysed and a soluble fraction was obtained by centrifugation at 10,000g for 30 min at 4 °C.

2.8 Purification of rTHAP-NusTag

The recombinant protein was purified from the centrifugation supernatant described above using Ni²⁺-Sephrose chromatography following the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech). Samples were loaded, resin washed with ligation buffer and the rTHAP-NusTag was eluted with 480 mM imidazole.

2.9 Recombinant protein hydrolysis

To release the rTHAP from NusA carrier protein, hydrolysis with enterokinase was performed. A fraction from rTHAP-NusTag was dialyzed against 500 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl₂ and 0.1% Tween-20 buffer (pH 8.0) and one unit of enterokinase (Invitrogen) was added to each 20 µg of protein and incubated overnight at 37 °C.

2.10 Enzyme assay with fluorogenic substrate

rTHAP (15 µg) was incubated in 100 µl 200 mM sodium acetate buffer, pH 3.5, at 37°C in presence or absence of inhibitors as indicated in table legends. After 10 min, the fluorogenic substrate Abz-Ala-Ile-Ala-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln-EDDnp was added to a final

concentration of 5.1 μM . The fluorogenic reaction was monitored for 1 h with a F-MAX fluorometer (Molecular Devices) using a 320-nm excitation filter and a 430-nm emission filter. As control, hydrolysis activity of native THAP (nTHAP) and purified bacterial extracts containing pET43a plasmid were performed.

2.11 VT proteolysis assay

Vitellin (VT) was purified according to Sorgine et al; (2000) from eggs of the 1st, 7th and 12th days after oviposition. Briefly, VT (150 μg) were incubated in 50 mM glycine/ phosphate/ sodium acetate buffer at pH 3.5, 4.0, 4.5 and 5.0 at 37°C in a 240- μl reaction volume. The reaction was started by the addition of 30 μg rTHAP, and at different time intervals (0 h, 3 h, 6 h and 24 h) 60- μl aliquots were retrieved. Reactions were stopped by adding SDS sample buffer (1:6) and boiled for 5 min. Reaction was carried out in the presence or absence of pepstatin A or heme.

3 Results

3.1 Characterization of *THAP* gene and protein expression

To identify the site and profiles of THAP transcription, total RNA extracted from the midgut, ovary and fat body from partially and fully engorged females and from eggs collected at different embryogenesis stages were analyzed by qPCR. In Fig. 1A, the relative amount of mRNA per unit of control 40-S mRNA (a stably expressed house-keeping gene) is shown as the relative expression ratio (%). Tissues from partially engorged females had less THAP mRNA than tissues from fully engorged females, which are ready to start oviposition. THAP mRNA transcripts were detected in the three tissues analyzed, the fat body showing higher expression level, followed by the midgut, while a lower expression level was detected in the ovary (Fig. 1A). In order to investigate the presence of THAP protein in same tissues and eggs, an immunoblot analysis was conducted with an anti-THAP serum. A positive reaction was detected in the ovary, fat body, midgut and haemolymph from fully engorged females (Fig. 1B) and in eggs from all developmental embryonic-stages analyzed (Fig. 1C).

In eggs, the THAP transcript is not present or the concentration is lower than the qPCR detection limit (data not shown). Native THAP protein can be purified from eggs laid as a doublet, formed by 37-kDa and 32-kDa polypeptides, corresponding to the proenzyme and the active enzyme, respectively (Sorgine et al., 2000). In order to investigate the relationship between the two forms as well as the presence of THAP during embryogenesis, eggs collected at different embryogenesis stages were analyzed for the presence of the polypeptides (Fig. 1C). In eggs from the 1st and 3rd days after oviposition, 37-kDa and 32-kDa polypeptides are found in similar amounts. However, between the 7th

day after oviposition and eclosion of the 1st instar, there was a progressive increase in 32-kDa polypeptide content, together with a gradual reduction of the 37-kDa band.

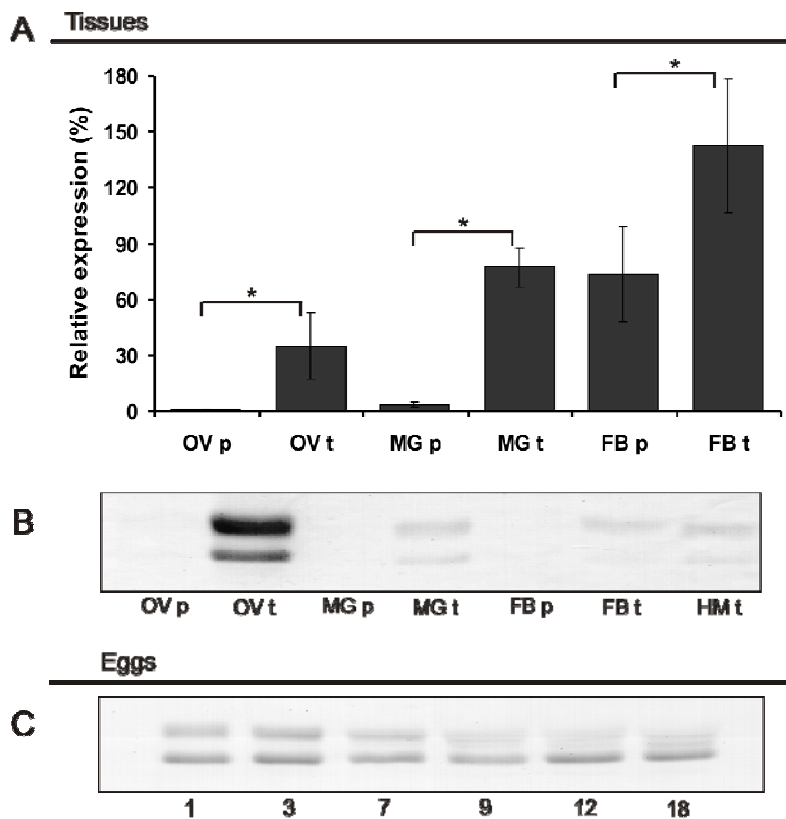


Fig. 1- Gene and protein expression analysis of THAP in tissues at two stages of the tick and eggs. (A) THAP mRNA expression by qPCR. The relative expression (%) is the relative THAP amount against each tick 40-S mRNA unit. Each column represents the mean and standard deviation of three analyses (* $p \leq 0,5$). (B and C) Expression of THAP protein by western blot. Tissues homogenates (30 μg of total protein/lane) and haemolymph (150 μg of total protein/lane) were electrophoresed on 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was then probed with rabbit anti-THAP antibodies as described in materials and methods. OV, ovary; MG, midgut; FB, fat body; HM, haemolymph; p, partially engorged adult female ticks; t, engorged adult female ticks. Numbers on figure indicate the day of embryogenesis on which the egg was collected.

3.2 THAP immunolocalization

Antibodies against THAP were used to conduct the immunolocalization of the THAP protein in ovarian cells. The fluorescent immunohistochemical analyses demonstrated that THAP was identified inside the oocyte cytoplasm, surrounding the yolk granules, specially the more cortical ones (Fig. 2).

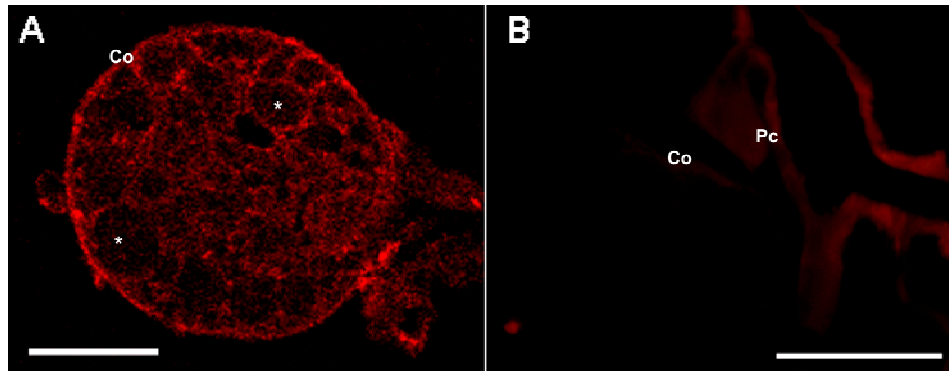


Fig. 2- Immunolocalization of THAP in the ovary. (A) Immunofluorescent image of an oocyte probed with anti-THAP antibody followed by fluorescein-conjugated goat anti-rabbit IgG (red). (B) Control with non-immune serum. Basal lamina/chorium (Co), pedicel cells (Pc) and yolk granules (asterisk). Scale bars represent 100 μ m in A and 50 μ m in B.

3.3 Cloning of THAP cDNA

In order to produce rTHAP in *E. coli*, the cDNA coding for THAP was amplified by PCR and cloned into a pET43a expression vector (pET43a-rTHAP). The comparison between THAP cDNA sequence previously cloned (Sorgine et al; 2000) and amino acid sequence of nTHAP protein obtained by Edman degradation showed that 12 nucleotides in the 5'-terminal cDNA sequence were missing in the previous clone. Therefore, we designed the forward primer to restore the full coding sequence of THAP. The recombinant plasmid contains the DNA sequence coding for the NusTag fusion protein fused in frame to the 5' end of THAP 1056-bp coding sequence in the pET43a vector. The fusion protein

THAP-NusTag contains an enterokinase recognition site between the carboxyl terminus of NusTag and the first amino acid of THAP. This construction allowed the cleavage of full-length rTHAP, without any additional amino acid, from the fusion protein. Enzyme restriction, PCR and sequencing analysis confirmed the deduced sequence of the THAP coding region cloned (data not shown).

3.4 Expression and purification of rTHAP-NusTag

Nine *E. coli* BL21(DE3) strains were tested for the expression of the rTHAP-NusTag. After induction with IPTG, the recombinant protein with approximately 98 kDa, corresponding to the predicted size, was detected by SDS-PAGE in four strains: *E. coli* BL21- CodonPlus (DE3) RIL, BL21-CodonPlus(DE3) RP, BL21Star(DE3) and BL21(DE3) pT-GroE (Fig. 3 A).

To establish the best condition for soluble expression, two temperatures were tested. The expression at 37°C produced a modest quantity of soluble protein (Fig. 3B; lane 1, 3, 5 and 7) while most of the protein can only be detected in inclusion bodies (data not shown). However, the expression at 23°C produced a large amount of soluble protein in all strains (Fig. 3B; lane 2, 4, 6 and 8), but especially in the *E. coli* BL21- CodonPlus (DE3) RIL strain (Fig. 3B, lane 8). For this reason, this strain was chosen to express the recombinant protein in larger scale.

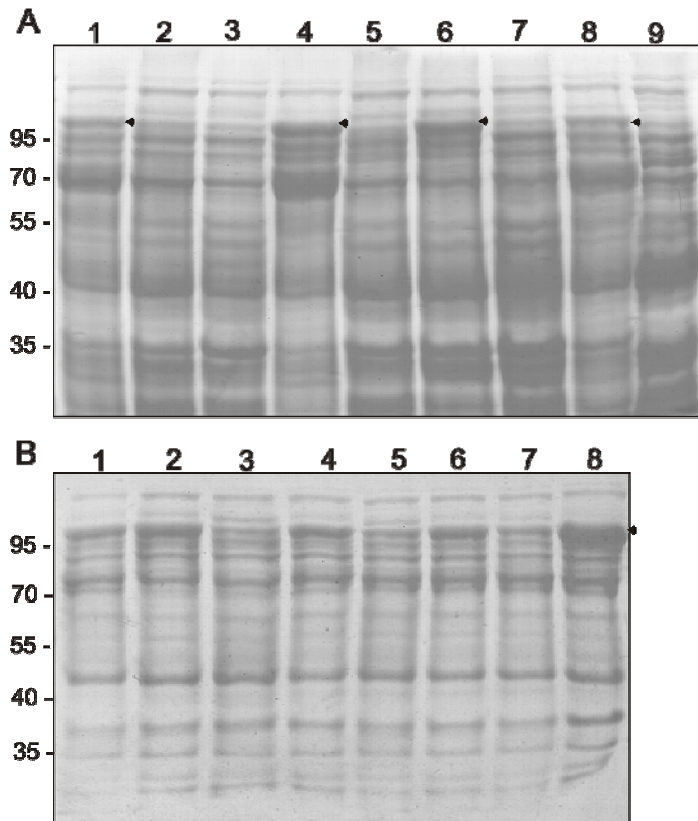


Fig. 3 – rTHAP-NusTag expression in *E. Coli* BL21 (DE3) strains. (A) Nine *E. coli* BL21 (DE3) strains were tested for protein expression at 37°C and 1 mM IPTG. Pellet cells were prepared as described in materials and methods and 600 µg protein for each samples was analyzed in 10%-SDS-PAGE stained with Coomassie blue G-250. Lane 1- *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE, lane 2- *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, lane 3- *E. coli* BL21 (DE3) pLysE, lane 4- *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) RIL, lane 5- *E. coli* BL21 (DE3) pT-TRX, lane 6- *E. coli* BL21 (DE3) Star, lane 7- *E. coli* BL21 (DE3) Rosseta, lane 8- *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) RP, lane 9- *E. coli* BL21 C43. (B) For soluble protein expression, positive strains for the rTHAP-NusTag expression were tested in two cultivation temperatures. Pellet cells were prepared as described in materials and methods and 600 µg protein for each soluble fraction samples was analyzed in 10%-SDS-PAGE stained with Coomassie blue G-250. Lane 1- *E. coli* BL21 (DE3) Star 37°C, lane 2- *E. coli* BL21 (DE3) Star 23°C, lane 3- *E. coli* BL21 (DE3) pT-GROE 37°C, lane 4- *E. coli* BL21 (DE3) pT-GROE 23°C, lane 5- *E. coli* BL21 (DE3) RP 37°C, lane 6- *E. coli* BL21 (DE3) RP 23°C, lane 7- *E. coli* BL21 (DE3) RIL 37°C, lane 8- *E. coli* BL21 (DE3) RIL 23°C. The arrows indicated rTHAP-NusTag with 98 kDa.

The cells were lysed and rTHAP-NusTag was purified from soluble fraction obtained by centrifugation. The fusion protein (NusTag) was removed by hydrolysis with enterokinase. Fig. 4 shows the purified rTHAP-NusTag with 98 kDa (lane 1) and rTHAP after release of the fusion protein with 37 kDa and 32 kDa (lane 2). Interestingly, these bands are present in both rTHAP and nTHAP (lane 3). The first peptide represents the 353-amino acid product expressed by coding sequence of THAP. The molecular size of the second band that migrated as 32 kDa is compatible with the predicted molecular size of the active form of THAP, as calculated from the nucleotide sequence.

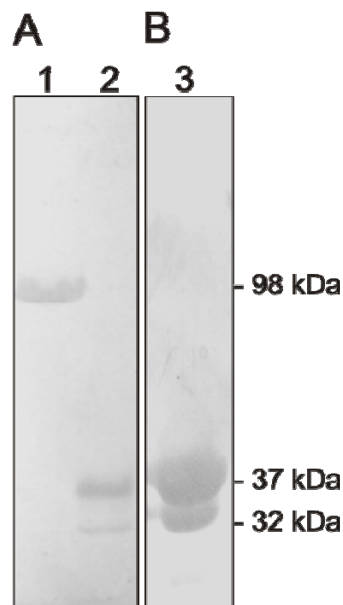


Fig 4- Analysis of the rTHAP-NusTag, rTHAP and nTHAP. (A) Purified rTHAP-NusTag and rTHAP after release of NusTag were electrophoresed in a 10%-SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and probed with anti-THAP rabbit serum and anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate as described in materials and methods. (B) Purified nTHAP was electrophoresed on 10%-SDS-PAGE and stained with Coomassie blue G-250.

3.5 Activity against fluorogenic peptide substrate and effect of inhibitor

After removal of the fusion protein, rTHAP hydrolysis of fluorogenic peptide Abz-Ala-Ile-Ala-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln-EDDnp was measured (Table 1). The specific rTHAP activity was 2.27 ± 0.09 RFU/min/mg of protein. The nTHAP showed an activity of 4.93 ± 0.71 RFU/min/mg of protein. Purified bacterial extracts showed an activity of $1.28 \pm 0,07$ RFU/min/mg; however, this activity was not inhibited by pepstatin A, a specific aspartic endopeptidase inhibitor. In the presence of the same inhibitor, rTHAP and nTHAP activities were 34 % and 28 %, respectively, when compared to the reactions without the presence of pepstatin. The effects of other inhibitors on the activity of the rTHAP were also tested and are shown in Table 2. The enzyme activity was inhibited by pepstatin A, whereas leupeptin (serine and cysteine endopeptidase inhibitor), antipain (serine and trypsin inhibitor) and E-64 (cysteine endopeptidase inhibitor) did not inhibit the enzyme activity.

Table 1- Proteolytic activity of rTHAP and nTHAP towards the synthetic substrate Abz-Ala-Ile-Ala-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln-EDDnp in presence or absence of pepstatin. The enzymatic activity was monitored for 1 hour with F-MAX fluorometer (320-430nm).

<i>Reaction</i>	<i>Specific activity (RFU/min/mg)</i>	<i>Relative activity (% control)</i>
rTHAP	2.27 ± 0.09	100
rTHAP + Pepstatin (10 µM)	0.77 ± 0.18	34
nTHAP	4.93 ± 0.71	100
nTHAP + Pepstatin	1.39 ± 0.32	28
<i>E.coli</i> control	1.28 ± 0.07	100
<i>E.coli</i> control + Pepstatin	1.17 ± 0.06	91

Table 2- Effect of proteinase inhibitors on rTHAP proteolytic activity. rTHAP was incubated with fluorogenic substrate Abz-Ala-Ile-Ala-Phe-Phe-Ser-Arg-Gln-EDDnp in presence or absence of pepstatin, leupeptin, antipain or E-64. The enzymatic activity was monitored for 1 hour with F-MAX fluorometer (320-430).

<i>Proteinase Inhibitor</i>	<i>Specificity</i>	<i>Concentration (µM)</i>	<i>Relative activity (% control)</i>
Pepstatin A	aspartic endopeptidases	10	34
E-64	cysteine endopeptidases	10	115
Leupeptin	most cysteine and trypsin- like serine endopeptidases	100	114
Antipain	trypsin-like serine and some cysteine endopeptidases	100	92
Without	-	0	100

3.6 Vitellin proteolysis

To investigate THAP participation in VT degradation, VT purified from eggs collected on the 1st, 7th and 12th days after oviposition were incubated with rTHAP in a range of pHs (3.5, 4.0, 4.5 and 5.0). SDS-PAGE analysis showed that the recombinant protein is able to hydrolyze VT from 7-day-old in pH 3.5 at 37°C (Fig. 5 A). Vitellins from eggs collected on the 1st and 12th days after oviposition were not hydrolyzed (Fig. 5 B and C), and in other pHs rTHAP activity was not efficient (data not shown).

Densitometric analyses for the four major VT subunits (120, 105, 90 and 70 kDa) showed that the THAP proteolysis against VT was reduced in the presence of pepstatin A (Fig. 5, lane 24i). Figure 5A shows that after 24 h of incubation the 120-kDa subunit was degraded around 92 %, and pepstatin A inhibited its degradation by approximately 20%. The 105-kDa subunit was degraded around 90% by rTHAP; however, pepstatin A did not prevent that degradation. The 90-kDa subunit was degraded around 74% by rTHAP and pepstatin A inhibited 49% of the degradation. The 70-kDa subunit was degraded around 65% and the presence of pepstatin A inhibited the degradation around 69%. In the presence of free heme in the reaction medium, the degradation of the 120-kDa subunits was inhibited by 47%, that of the 105-kDa subunits by 48%, that of the 90-kDa subunit by 77%, and that of the 70-kDa subunit by 75 % of control (Fig. 5, lane 24^h).

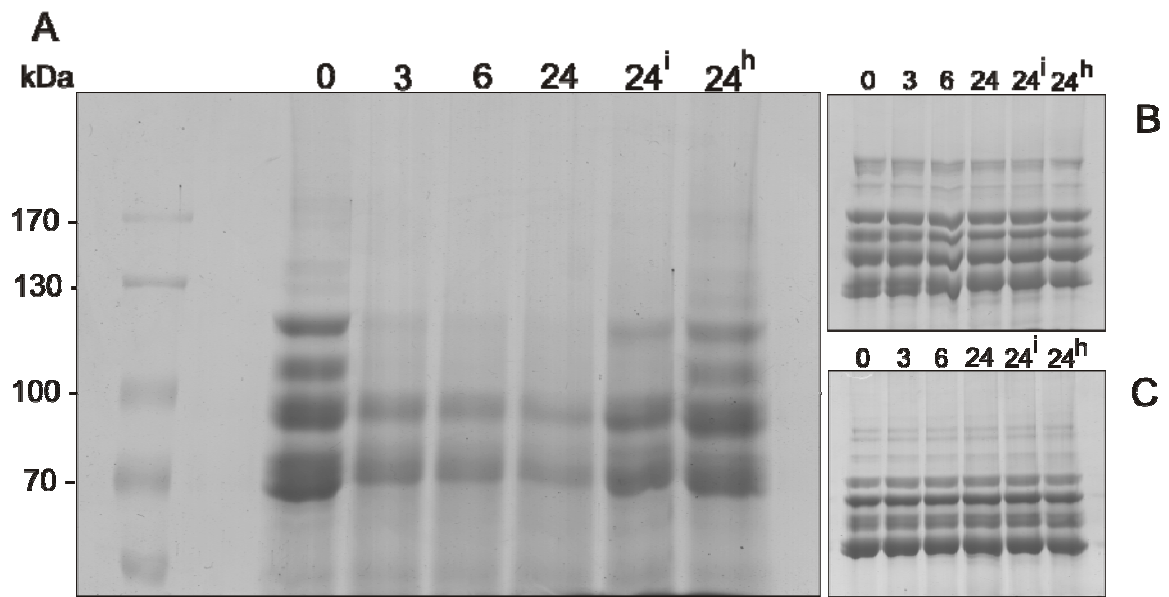


Fig 5- rTHAP proteolytic activity on VT purified from 7-day-old eggs (A), 1-day-old eggs (B) and 12-day-old eggs (C). VT (150 μ g) was incubated with rTHAP (30 μ g) in glycine/ phosphate/ sodium acetate buffer (50 mM, pH 3.5) at 37°C in presence or absence of 10 μ M pepstatin (indicated by “i”) or 5 mM hemin (indicated by “h”). Reactions were stopped at 0, 3, 6 and 24 h by addition of SDS sample buffer, boiled and analyzed by 7.5%-SDS-PAGE (25 μ g of total protein/lane) and stained with Coomassie blue G-250.

4 Discussion

Eggs of arthropods require large amounts of yolk proteins for development, most of which are synthesized outside the oocyte, mainly in the fat body, but also by ovarian follicular cells and midgut (Giogi et al., 1999). A number of haemolymph proteins are endocytosed by oocyte and stored within the yolk granules during vitellogenesis. As well as the vitellin (Canal et al., 1995), the main yolk protein from arthropod eggs, endopeptidases involved with their utilization may also be synthesized in extra-ovarian tissues (Cho et al., 1991, 1999; Logullo et al., 1998). However, a great diversity concerning the site of endopeptidases synthesis is found when different yolk degradation enzymes and arthropods are compared.

Here we show that THAP mRNA transcription takes place mainly in extra-ovarian tissues, predominantly in the fat body, in partially and fully engorged females. Moreover, the levels of THAP mRNA are higher in fully engorged females, when vitellogenesis has already begun (Fig. 1A). However, THAP protein was detected by western blot mostly in ovaries and at lower level in the midgut, fat body and haemolymph from fully engorged adult female ticks (Fig. 1B). In tissues from partially engorged females, THAP protein concentration was below the western blot detection limit. Accordingly, it is possible to suggest that THAP synthesis takes place in the three tissues, although it does not accumulate in the fat body nor in the midgut, being secreted to the haemolymph and selectively concentrated only in the growing oocytes after endocytosis by the ovary. Several of the proteolytic enzymes found in insects are synthesized by the fat body, secreted to the haemolymph and endocytosed and accumulated by the growing oocytes. This is the case of the *Aedes aegypti* carboxypeptidase and cathepsin B-like endopeptidase (Cho et al., 1991, 1999). Besides, BYC, the other aspartic endopeptidase of *R. microplus*

eggs, has been shown to be synthesized by the midgut and fat body of this tick, being secreted to the haemolymph and accumulated in the ovary (Logullo et al., 1998).

The control of endopeptidase activation through acidification of yolk granules has already been suggested in different species. Investigating the tick *Ornithodoros moubata*, Fagotto (1990) showed that VT degradation during tick embryogenesis could be attributed to a cathepsin-L like endopeptidase, which is supposed to be stored in yolk platelets as a proenzyme, being proteolytically activated after the decrease in platelet pH that occurs during embryogenesis. A very similar pattern can be found in insects, a closely related group. Both in *Bombyx mori* and *Musca domestica*, cysteine endopeptidase precursors from eggs are converted to active enzymes by autoproteolysis at acidic pHs (Takahashi et al, 1993; Ribolla and Bianchi,1995). In all these cases, this proteolytic processing has been associated with an activation of these enzymes.

In the ovary of fully engorged females and in eggs, THAP can be observed as two polypeptides (proenzyme and active enzyme) (Fig. 1B and 1C), suggesting that at least part of THAP polypeptides are converted to an active form early during vitellogenesis (between 1 and 3 days after oviposition), the remaining polypeptide chains being proteolytically processed later during embryonic development (after 3 days). This is in accordance with acidification of yolk platelets during embryogenesis in *R. microplus* that increases on the 4th day of development (Abreu et al., 2004).

In acidic pH, several precursor endopeptidases are capable of activation by autoproteolysis, such as BYC (Abreu et al., 2004) and cysteine proteinase (Renard et al., 2000) from *R. microplus*. rTHAP was shown to assume two polypeptide forms, like the nTHAP purified from tick eggs (Fig. 4). These data suggest that native and recombinant forms are able to promote autoproteolysis, though the mechanism that triggers this activity

is unknown. In the case of rTHAP, the presence of an additional endopeptidase required for purified THAP activation in the *E. coli* extract is unlikely.

In ticks, aspartic proteases have been suggested to play a key role in hemoglobin (Hb) proteolysis (Booldbaatar et al., 2006; Sojka et al., 2008) and in the degradation of VT (Logullo et al., 1998). To collect data to better characterize the role of THAP, anti-THAP antibodies were used to identify the location of this protein inside the ovary. Immunolocalization of the THAP showed its presence at the basal lamina/chorium and in the periphery of the VT granules in the oocyte cytoplasm (Fig. 2). VCB and VCP, two enzymes that have already been implicated in *A. aegypti* VT degradation, have been identified in a similar region of the oocyte by immunohistochemical methods (Cho et al., 1999) and BYC has been identified in the same region (Abreu et al., 2004). Therefore, this location supports the idea that THAP might be involved in VT degradation.

To better characterize its properties, recombinant THAP was produced in the *E. coli* system. Expression experiments at 37 °C showed that the rTHAP-NusTag fusion protein was expressed almost completely in the insoluble fraction, while at 23 °C rTHAP-NusTag exhibited greater solubility. This was expected, since both NusA fusion protein and temperature reduction have been shown to be useful to increase the solubility of recombinant proteins expressed in *E. coli* (De Marco et al., 2004; Leal et al., 2006a; Li and He, 2006; Sorensen and Mortensen, 2005). After purification and NusTag release, rTHAP proteolytic activity against fluorogenic peptide substrate was evaluated. The recombinant enzyme was active in pH 3.5 and was specifically inhibited by pepstatin A, a selective inhibitor of aspartic endopeptidases, but not by inhibitors of other classes of endopeptidases (Table 1 and 2). Similar results have previously been obtained for the native THAP (Sorgine et al., 2000). Furthermore, our results also exclude the possibility

that THAP activity previously described was due to a minor contamination of the preparation by other egg aspartic endopeptidases, such as BYC (Logullo et al., 1998).

Vitellins (VT) are the major storage proteins of arthropod eggs and are degraded during embryogenesis to provide raw materials/substrates for embryo development (Postlethwait and Giorgi, 1985). Logullo et al. (2002) showed that only 40% of total VT is consumed during *R. microplus* embryogenesis, suggesting that this is a very slow and controlled process. Besides THAP, two other yolk endopeptidases from *R. microplus* eggs have already been described: a cysteine endopeptidase VTDCE (vitellin degrading cysteine endopeptidase) (Seixas et al., 2003) and BYC, the other aspartic endopeptidase already mentioned (Logullo et al., 1998).

rTHAP capacity of VT hydrolysis was also investigated. Four pH conditions in the enzymatic reaction were tested, but VT hydrolysis was observed only in pH 3.5. In many species, such as the tick *Ornithodoros moubata* (Fagotto, 1991), the cockroach *Blattella germanica* (Liu et al., 1996), the mosquito *Aedes aegypti* (Cho et al., 1999) and the tick *R. microplus* (Abreu et al., 2004), VT degradation is triggered by a developmentally regulated acidification of the yolk granules. This acidification, in turn, activates different endopeptidases involved in arthropod yolk digestion. In *R. microplus*, Abreu et al. (2004) screened the optimum pH for proteolytic activity in egg homogenates and detected an acidic peak between pH 2.5 - 4.0. It is noteworthy that the range for optimum proteolysis with egg homogenate *in vitro* is not very far from the optimum pH for rTHAP activity against VT. We suggest that the acid environment in eggs favors THAP activation, an aspartic protease whose main biochemical properties include an acidic pH required for optimal activity.

rTHAP was active only against VT from eggs collected on the 7th day after oviposition. Interestingly, a large part of THAP polypeptides is converted to active enzyme 7 days after oviposition (Fig. 1C), which probably indicates the major role they play in VT proteolyses. Moreover, the 120-kDa and 105-kDa VT subunits were preferably degraded and degradation was less inhibited by pepstatin A (Fig. 5 A), showing that THAP is an enzyme selective towards such subunits, which are heterogeneous in composition (Canal et al., 1995). This suggests that (i) THAP acts in VT degradation pathway, where preliminary VT modification may be necessary for THAP activity, and that (ii) THAP could act in cooperation with other proteases like BYC (Abreu et al., 2004) and VTDCE (Seixas et al., 2003; 2008) in VT degradation.

Susceptibility of VT itself to proteolytic attack was investigated by Silveira et al. (2006), in a study that showed that dephosphorylation of tick VT increases the rate of its degradation by a commercial aspartyl endopeptidase. During *R. microplus* egg development, the two larger VT subunits are the main proteolytically degraded targets (Logullo et al., 2002) in a reaction blocked by pepstatin A (Abreu et al., 2004). Corroborating these results, the same subunits were also degraded in rTHAP *in vitro* assay (Fig. 5 A).

Recently, VT-degradation by BYC was investigated and shown to be a highly specific and slow process (Nascimento-Silva et al., 2008). This makes sense because if the activity of the egg proteolytic system was not tightly controlled, VT would probably be degraded much faster than it actually occurs *in vivo*. Therefore, the comprehension of the mechanisms by which each of these enzymes is regulated is important not only because it affords a better understanding of tick embryogenesis, but also because it represents a very

interesting model to increase our knowledge on substrate-enzyme interactions, and could be useful for the development of new parasite control methods.

Previously, it has been shown that THAP vitellin-degrading activity is heme-regulated (Sorgine et al., 2000). In this work we show that the activity of the recombinant enzyme is also influenced by the presence of free-heme in reaction medium (Fig 5 A- lane 24^h). It has been shown that *R. microplus* obtains its heme from host hemoglobin present in the ingested blood (Braz et al., 1999), being the first multicellular organism shown to be unable to synthesize the protoporphyrin ring. An important consequence of THAP heme-binding characteristic is related to the heme cytotoxicity. During oocyte growth, large amounts of VT containing heme are internalized by the oocytes of ticks, and this VT is subsequently degraded during embryogenesis (Fagotto, 1995). The rate of VT degradation must match that of heme utilization to avoid the formation of a potentially dangerous pool of free heme (Sorgine et al., 2000). In this manner, the regulation of THAP activity may provide a possible mechanism of regulating tick VT degradation and may be a suitable candidate for drug and vaccine development.

Acknowledgments

We are grateful to Josiana Gomes de Andrade and Leonardo Abreu for technical assistance in the qPCR experiments, Dr. Luiz Juliano for kindly providing the fluorogenic peptide substrate, and Francisco Javier Medrano for kindly providing *E. coli* strains. This work was supported by grants from HHMI, PRONEX, CAPES, CNPq, FAPERJ and FAPERGS.

References

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Inter.* 11, 36-42.
- Abreu, L. A., Valle, D., Manso, P., Façanha, A., Palejo-Machado, M., Masuda, H., Masuda, A., Vaz Jr, I., Lenzi, H., Oliveira, P. L., Logullo, C., 2004. Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 443-449. Doi: 10.1016/j.ibmb.2004.01.006.
- Boldbaatar, D., Sikalizyo Sikasunge, C., Battsetseg, B., Xuan, X., Fujisaki, K., 2006. Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 25-36.
- Braz, G., Coelho, H., Masuda, H., Oliveira, P. L., 1999. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Curr. Biol.* 9, 703-706. Doi: 10.1016/S0960-9822(99)80312-1
- Campos, E., Moraes, J., Façanha, A. R., Moreira, E., Valle, D., Abreu, L., Manso, P. P. A., Nascimento, A., Palejo-Machado, M., Lenzi, H., Masuda, A., Vaz Jr, I., Logullo, C., 2006. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Vet. Parasitol.* 138, 349-357. Doi: 10.1016/j.vetpar.2006.02.004.
- Canal, C. W., Maia, H. M., Vaz Jr, I., Chies, J. M., Farias, N., Masuda, A., Gonzales, J. C. Ozaki, L.S., Dewes, H., 1995. Changing patterns of vitellin-related peptides during development of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.* 19, 325- 336. Doi: 10.1007/BF00052390.

- Cho, W. L., Deitsch, K. R., Raikhel, A. G., 1991. An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 10821-10824.
- Cho, W. L., Tsao, S. M., Hays, A. R., Walter, R., Chen, J. S., Snigirevskaya, E. S., Raikhel, A. S., 1999. Mosquito cathepsin B-like proteinase involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J Biol. Chem.* 274(19), 13311-13321.
- De Marco, V., Stier, G., Blandin, S., de Marco, A., 2004. The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 766-771. Doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.189
- Diehl, P. A., Aeschlimann, A. and Obenchain, F. D., 1982. Tick reproduction: oogenesis and ovoposition. *Physiology of ticks* (ed. Obenchain F. D. and Galun, R.), 277-350. Pergamon Press, Oxford.
- Fagotto, F., 1990. Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 14, 217 - 235.
- Fagotto, F., 1991. Yolk degradation in ticks eggs: III. Developmentally regulated acidification of the yolk spheres. *Develop. Growth Different.* 33, 57-66.
- Fagotto, F., 1995. Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes, *J. Cell Sci.* 108, 3645- 3647.
- Fialho, E., Nakamura, A., Juliano, L., Masuda, H., Silva-Neto, M. A., 2005. Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* 436, 246-253. DOI:10.1016/j.abb.2005.01.005.
- Giorgi, F., Bradley, J. T., Nordin, J. H., 1999, Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos. *Micron* 30, 579-596.

- Graef J.F., Gongolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G.A., Molento, M.B., Bordin, E.L., Arantes, G.J., 2004. Tick control: an industry point of view. *Parasitology* 129, 427-442. DOI: 10.1017/S0031182004006079
- Ikeda, M., Sasaki, T. and Yamashita, S., 1990. Purification and characterization of proteases responsible for vitellin degradation of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 20, 725 - 734.
- Kunz, S. E., Kemp, D. H., 1994. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Ver. Sci. Tech.* 13(4), 1249-86.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Leal, A. T., Pohl, P. C., Ferreira, C. A., Nascimento-Silva, M. C., Sorgine, M. H., Logullo, C., Oliveira, P. L., Farias, S. E., da Silva Vaz, I., Masuda, A., 2006. Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 45, 107-114. Doi:10.1016/j.pep.2005.07.009
- Li, M.; He, S., 2006. Purification and characterization of recombinant human interleukin-29 expressed in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 122, 334-340. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.11.019
- Liu, X., McCarron, R.C., Nordin, J. H., 1996. A cysteine protease that processes insect vitellin. Purification and partial characterization of the enzyme and the proenzyme. *J Biol. Chem.* 271, 33344-51.
- Logullo, C., Vaz, I., Sorgine, M. H., Paiva-Silva, G. O., Faria, F. S., Zingali, R. B., De Lima, M. F., Abreu, L., Oliveira, E. F., Alves, E. W., Masuda, H., Gonzales, J. C., Masuda, A., Oliveira, P. L., 1998. Isolation of an aspartic proteinase precursor from

- the egg of the hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology* 116, 525-532. Doi: 10.1017/S0031182098002698
- Logullo, C., Moraes, J., Dansa-Petretski, M., Vaz, I. S., Masuda, A., Sorgine, M. H., Braz, G. R., Masuda, H., Oliveira, P. L., 2002. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1805-11. Doi: 10.1016/S0965-1748(02)00162-5
- Medina M., León P. and Vallejo C. G., 1988. *Drosophila* cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* 263, 355 - 363.
- Nascimento-Silva, M. C., Leal, A. T., Daffre, S., Juliano, L., Da Silva Vaz, I. Jr., Paiva-Silva, G. O., Oliveira, P. L., Sorgine, M. H., 2008. BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs. *Comp. Biochem. Physiol. B* 149, 599-607. Doi:10.1016/j.cbpb.2007.12.007.
- Nussenzveig, R. H., Oliveira, P. L. and Masuda, H., 1992. Identification of yolk platelet-associated hydrolases in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 21, 253 - 262.
- Pfaffl, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45, 2002-2007.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30(9):e36, 01-10.
- Postlethwait, J. H. and Giorgi, F., 1985. Vitellogenesis in insects. *Develop. Biol.* 1, 85-126.
- Renard, G., Garcia, J. F., Cardoso, F. C., Richter, M. F., Sakanari, J. A., Ozaki, L. S., Termignoni, C., Masuda, A., 2000. Cloning and functional expression of a *Boophilus*

- microplus* cathepsin L-like enzyme. Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 1017-1026. Doi:10.1016/S0965-1748(00)00070-9.
- Ribolla, P. E. M., Bianchi, A. G., 1995. Processing of procathepsin from *musca domestica* eggs. Insect Biochem. Mol. Biol. 25, 1011-1017. Doi:10.1016/0965-1748(95)00036-U
- Sappington, T. W., Raikhel, A. S., 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. Insect Biochem. Mol. Biol. 28, 277-300.
- Seixas, A., Dos Santos, P. C., Velloso, F.F., Da Silva Vaz, I. Jr., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C., 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase, Parasitology 126, 155-163. Doi: 10.1017/S0031182002002731.
- Seixas, A., Leal, A.T., Nascimento-Silva, M.C.L., Masuda, A., Termignoni, C., da Silva Vaz Jr., I., 2008. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). Vet. Immunol. Immunopathol. 124, 332-340. Doi:10.1016/j.vetimm.2008.04.001
- Silveira, A. B., Castro-Santos, J., Senna, R., Logullo, C., Fialho, E., Silva-Neto, M. A., 2006. Tick vitellin is dephosphorylated by a protein tyrosine phosphatase during egg development: Effect of dephosphorylation on VT proteolysis. Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 200-209. Doi: 10.1016/j.ibmb.2006.01.015
- Sojka D, Franta Z, Horn M, Hajdusek O, Caffrey CR, Mares M, Kopáček P., 2008. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. Parasit Vectors. 18, 1-7.
- Sonenshine, D.E., Kocan, K.M., de la Fuente, J. 2006. Tick control: further thoughts on a research agenda. Trends Parasitol. 12, 550-551. Doi: 10.1016/j.pt.2006.09.003

- Sorensen, H. P., Mortensen, K. K., 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 4(1), 1-8. Doi: 10.1186/1475-2859-4-1.
- Sorgine, M. H., Logullo, C., Zingali, R. B., Paiva-Silva, G. O., Juliano, L., Oliveira, P. L., 2000. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of hard tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 275, 28659-65. Doi:10.1074/jbc.M005675200
- Takahashi, S. Y., Yamamoto, Y., Shionoya, Y., Kageyama, T., 1993. Cysteine proteinase from the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*: identification of a latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing *in vivo* and *in vitro*. *J. Biochem.* 114, 267 - 272.
- Willadsen, P., 2004. Anti-tick vaccines. *Parasitology* 129, 367-387. Doi: 10.1017/S0031182003004657.
- Willadsen, P., 2006. Tick control: thoughts on a research agenda. *Vet. Parasitol.* 138 (1-2), 161-168. Doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.050.

4 DISCUSSÃO

Nos organismos ovíparos, incluindo carrapatos, o desenvolvimento embrionário ocorre fora do corpo materno. Assim, a sobrevivência dos ovos e o desenvolvimento do embrião dependem da utilização de fontes energéticas previamente estocadas, o vitelo. Este material é composto por proteínas, lipídeos, açúcares, enzimas e outros componentes menores que são estocados de maneira organizada nos ovos. Após a fertilização dos ovos inicia-se o desenvolvimento de um novo organismo, onde os componentes do vitelo são gradualmente utilizados de acordo com as necessidades específicas de cada célula impostas pelo programa genético do embrião (Atella et al., 2005; Sappington e Raikel, 1998).

Nos insetos e nos carrapatos, durante a vitelogênese, um grande número de proteínas, incluindo vitelogeninas e endopeptidases, é sintetizado nos ovários e em tecidos extra-ovarianos e estocadas pelos oócitos em desenvolvimento (Giorgi et al., 1999). A síntese e o acúmulo dessas proteínas está sobre controle hormonal (revisado por Raikhel e Dhadialla, 1992; Raikhel et al., 2002; Seixas et al., 2008) e é induzida, por sua vez, pela cópula e pela alimentação sanguínea (Kaufman, 2004) que induz profundas mudanças fisiológicas.

Neste trabalho, nós estudamos a transcrição e a síntese da THAP em tecidos e ovos do carrapato *R. microplus*. A transcrição da THAP ocorre principalmente em tecidos extra-ovarianos, predominantemente no corpo gorduroso e em menor quantidade no intestino, e é aumentada em fêmeas completamente ingurgitadas (teleóginas), onde o processo de vitelogênese está em andamento. A proteína, por sua vez, é predominantemente encontrada no ovário de teleóginas e foi visualizada em menor quantidade no corpo gorduroso, intestino e na hemolinfa das teleóginas. Estas observações sugerem que esta enzima é

sintetizada predominantemente em tecidos extra-ovarianos, mas acumulada nos oócitos em desenvolvimento, como confirmado também pela imunolocalização.

Como revisado neste trabalho, a síntese extra-ovariana de enzimas relacionadas com a digestão do vitelo é comum entre diferentes espécies de carrapatos e insetos, assim como em organismos vertebrados (Cho et al., 1991 e 1999; Giorgi et al., 1999; Logullo et al., 1998). As pesquisas têm estabelecido que estas endopeptidases são sintetizadas, quase que exclusivamente, como pró-enzimas precursoras que são ativadas com o início da embriogênese (Fagotto, 1995; Ribolla e Bianchi, 1995, Yamahama et al., 2003). Estas formas latentes de endopeptidases são essenciais no controle da degradação dos componentes do vitelo (Fagotto, 1995), assegurando que elas funcionem apenas quando são necessárias.

Tipicamente, as endopeptidases isoladas do vitelo são essencialmente inativas em pH neutro, mas ativas em pH de 3 a 5 (Liu et al., 1996; Logullo et al., 1998; Seixas et al., 2003; Sorgine et al., 2000). Os resultados de várias investigações indicam que a acidificação dos grânulos de vitelo é o evento chave no controle dessa ativação (Abreu et al., 2004; Fagotto e Maxfield, 1994; Fausto et al., 2001). Embora os grânulos de vitelo compartilhem uma semelhança funcional com os lisossomos clássicos, eles apresentam a característica única de poder regular o pH em uma ampla faixa (Fagotto, 1991; Nordin et al., 1991). Esta capacidade parece ser um fenômeno geral tendo sido observado em artrópodes (Fagotto, 1991; Nordin et al., 1991), equinodermos (Mallya et al., 1992) e no anfíbio *X. laevis* (Fagotto e Maxfield, 1994).

Em pH ácido, várias endopeptidases precursoras são ativadas por autoproteólise, como é o caso da BYC (Abreu et al., 2004) e da BmCL1, uma cisteíno-endopeptidase do *R. microplus* (Renard et al., 2000). A análise da presença da THAP durante o

desenvolvimento embrionário demonstrou a presença de dois polipeptídeos, correspondentes a pró-enzima e a enzima madura. Estas duas formas já haviam sido identificadas anteriormente quando a THAP foi purificada de ovos (Sorgine et al., 2000). Nossa análise mostrou que parte dos polipeptídeos é convertida à forma ativa ainda durante a vitelogênese (como visto no ovário) e durante o início da embriogênese (como visto em ovos de 1 a 3 dias após a ovoposição). No entanto, a maior parte dos polipeptídeos é convertida à forma ativa em uma fase mais avançada da embriogênese (após o terceiro dia). Estas observações estão de acordo com a acidificação dos grânulos de vitelo que aumentam no quarto dia de desenvolvimento embrionário no *R. microplus* (Abreu et al., 2004).

A rTHAP purificada apresentou-se sob a forma de dois polipeptídeos, assim como a THAP nativa purificada de ovos, o que sugere que ambas as formas sejam capazes de realizar autoproteólise. A autoproteólise é característica de aspártico-endopeptidases. Estas endopeptidases são sintetizadas como zimogênios inativos (pró-enzima) inibidos pela ligação de seus pró-peptídeos N-terminais no sítio ativo, que podem ser auto-ativados à sua forma madura pela acidificação do ambiente em que se encontram (Mása et al., 2006). Assim, é possível sugerir pelos resultados obtidos, que, durante a embriogênese, a forma inativa da THAP sofra autoproteólise originando a forma madura e que este processo seja impulsionado pela acidificação dos grânulos de vitelo.

Em carrapatos, aspártico-endopeptidases têm sido caracterizadas como tendo papéis importantes na degradação da hemoglobina (Booldbaatar et al., 2006; Sojka et al., 2008) e na degradação da VT (Logullo et al., 1998), participando dessa forma da digestão sanguínea e da embriogênese. Para melhor caracterizar as propriedades da THAP, uma enzima recombinante foi produzida.

A maioria das proteínas, enzimas em especial, é encontrada em pequena quantidade em suas fontes naturais e sua purificação é, em geral, difícil e dispendiosa. A produção de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos constitui uma importante ferramenta para obtenção de grande quantidade de proteína (Manzur et al., 2006) o que pode auxiliar e facilitar a caracterização funcional e estrutural desses alvos. Existe um grande número de opções para a expressão de proteínas heterólogas, entre as quais a expressão em *E. coli* é o mais conveniente e frequentemente usado (Sorensen e Mortensen, 2005). No entanto, a expressão de genes exógenos em *E. coli* frequentemente leva a produção de proteínas como agregados insolúveis, conhecidos como corpos de inclusão (Villaverde e Carrio, 2003), que são em geral formados por proteínas incorretamente dobradas e assim, biologicamente inativas. Várias estratégias têm sido empregadas para aumentar a expressão das proteínas alvo na forma solúvel, tais como o desenvolvimento de linhagens bacterianas específicas, co-expressão de chaperonas e modificação das condições de crescimento das bactérias (Sorensen e Mortensen, 2005). Um dos métodos de maior sucesso na produção de proteínas heterólogas solúveis em *E. coli* é a adição de proteínas de fusão (Leal et al., 2006 a; Sachdev e Chirgwin, 1998; Xiao et al., 2006).

Para a produção da proteína recombinante solúvel, o DNA codificador da THAP foi clonado no vetor pET43a. Este vetor é designado para a expressão da proteína de interesse fusionada à proteína NusTag e com resíduos de histidina na porção N-terminal. Estas características aumentam a solubilidade da proteína e facilitam sua purificação através de cromatografia de afinidade. O polipeptídeo produzido também apresenta um sítio de hidrólise por enteroquinase, entre a NusTag e a proteína alvo, que permite a separação das proteínas. Das nove linhagens de *E. coli* BL21(DE3) testadas, quatro produziram a rTHAP-NusTag. Em todas elas foi possível observar a expressão da rTHAP-NusTag na

forma solúvel, no entanto, a indução a 23 °C, em comparação a indução à 37 °C, aumentou a solubilização da proteína. A redução da temperatura de indução tem sido descrita como um fator importante para diminuir a agregação de proteínas recombinantes (Li e He, 2006; Schein e Noteborn, 1988; Xiao et al., 2006). Uma súbita diminuição da temperatura de cultivo reduz as taxas de replicação, transcrição e tradução. Com isso, a velocidade de síntese e a concentração celular da proteína recombinante diminuem, favorecendo o dobramento da mesma em sua estrutura tridimensional correta. Além disso, a atividade e expressão de algumas chaperonas de *E. coli* aumentam em temperaturas ao redor de 30 °C (Sorensen e Mortensen, 2005).

Após a purificação e remoção da proteína de fusão, que permitiu a formação da proteína madura, a rTHAP apresentou atividade sobre substrato sintético fluorogênico em pH 3,5. Sua atividade é comparável à da THAP nativa purificada de ovos, apesar de ser menor. Essa divergência pode ser devida a uma menor quantidade de polipeptídeos na forma ativa da rTHAP. Isto também poderia se dever a ausência de processamentos pós-traducionais, tal como glicosilações que não ocorrem em *E. coli*, no entanto, a análise da sequência de aminoácidos não revelou a presença de sítios de glicosilação na proteína madura (Sorgine et al., 2000). Apenas pepstatina A apresentou efeito inibitório sobre a atividade da rTHAP, enquanto que inibidores de outras classes de endopeptidases não tiveram efeito detectável. Esse perfil inibitório foi também caracterizado para a nTHAP (Sorgine et al., 2000), sugerindo que a enzima recombinante produzida em *E. coli* é similar à enzima nativa.

Vitelinas são o principal estoque de proteínas nos ovos de artrópodes e sua degradação durante a embriogênese fornece o material necessário para o desenvolvimento do embrião (Postlethwait e Giorgi, 1985). Logullo et al. (2002) mostraram que somente

40% do total de VT é consumida durante a embriogênese do *R. microplus*, sugerindo que este é um processo lento e estritamente controlado. Neste trabalho, nós também investigamos a capacidade da rTHAP de hidrolisar VT. A hidrólise da VT pela rTHAP foi testada em diferentes condições de pH, porém a hidrólise foi observada apenas em pH 3,5. No *R. microplus* foi observado que o pico de atividade proteolítica no homogenado de ovos ocorre entre os pH 2,5 e 4,0 (Abreu et al., 2004). A acidificação dos grânulos de vitelo além de atuar na conversão autocatalítica de pró-enzimas inativas, fornece o pH ótimo para a atividade catalítica de endopeptidases. Assim, o pH 3,5 ótimo para a rTHAP reforçam novamente o papel da acidificação dos grânulos de vitelo no controle da atividade das endopeptidases envolvidas com a degradação da VT.

Interessantemente, a rTHAP foi ativa apenas sobre VT purificada de ovos coletados 7 dias após a postura. Não foi observada hidrólise de VT purificada de ovos coletados 1 dia e 12 dias após a postura. Além disso, algumas subunidades de VT foram preferivelmente degradadas e sua degradação foi menos inibida por pepstatina A, mostrando que a THAP é uma enzima altamente seletiva a estas subunidades.

Trabalhos têm mostrado que existem heterogenicidades entre as diferentes subunidades de VT e que estas são diferentemente processadas. Nos ovos de *B. mori* são identificadas três proteínas de vitelo diferentes e cada uma delas apresenta uma metabolização diferente durante o desenvolvimento embrionário (Yamashita e Indrasith, 1988). Em *P. americana* duas VT imunologicamente distintas foram identificadas cada uma delas formada por subunidades de diferente massa molecular. Durante o desenvolvimento embrionário cada uma dessas subunidades sofre hidrólises específicas que resultam na geração de polipeptídeos menores com a perda concomitante de vários determinantes imunogênicos (Storella et al., 1985). Em *R. microplus* foi demonstrado que

polipeptídeos relacionados à VT sofrem modificações durante o desenvolvimento do carrapato e são possivelmente heterogêneos na seqüência de aminoácidos (Canal et al., 1995). Além da possível heterogeneidade, as diferentes subunidades de VT podem sofrer modificações durante o desenvolvimento do embrião, como defosforilações (Silveira et al., 2006), que alterem sua suscetibilidade à proteólise, inibindo clivagens aleatórias ou facilitando a ação das endopeptidases. A acidificação dos grânulos de vitelo pode também alterar a conformação nativa da VT expondo resíduos susceptíveis da cadeia polipeptídica à ação de endopeptidases (Giorgi et al., 1999).

Desse modo, podemos sugerir que a THAP tem um papel importante na degradação da VT do carrapato, onde modificações preliminares da VT parecem ser necessárias para a atuação da THAP, já que não observamos atividade proteolítica sobre VT purificada de ovos coletados 1 dia após a postura, tão pouco, sobre VT purificada de ovos coletados 12 dias após a postura, onde os sítios alvos da enzima podem já ter sido alterados anteriormente, pela ação da enzima no ovo. Além disso, a THAP pode estar atuando em cooperação com outras endopeptidases como a BYC (Abreu et al., 2004; Logullo et al., 1998) e a VTDCE (Seixas et al., 2003 e 2008) em uma cascata enzimática para a degradação da VT de forma coordenada.

A atividade da rTHAP sobre VT purificada foi também influenciada pela presença de heme livre no meio de reação que reduziu a taxa de proteólise da VT, reforçando o papel antioxidante da THAP na embriogênese do carrapato, como já havia sido sugerido anteriormente por Sorgine et al. (2000).

Concluindo, nosso trabalho permitiu aumentar o entendimento sobre a síntese, acúmulo e processamento da THAP e a caracterização da participação dessa enzima na embriogênese do carrapato *R. microplus*. Entender melhor o processo da degradação dos

componentes do vitelo e os mecanismos pelos quais as enzimas envolvidas nesse processo são reguladas é importante não somente para entender melhor a embriogênese nessa espécie, mas também para o desenvolvimento de novas estratégias de controle.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L. A., VALLE, D., MANSO, P., FAÇANHA, A., PALEJO-MACHADO, M., MASUDA, H., MASUDA, A., VAZ JR, I., LENZI, H., OLIVEIRA, P. L. & LOGULLO, C. Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 443-449, 2004.
- AFT, R.L. & MUELLER, G.C. Hemin-mediated DNA strand scission. *J. Biol. Chem.*, 258: 12069-12072, 1983.
- AGBEDE, R.I. & KEMP, D.H. *Boophilus microplus* (ixodid tick): fine structure of the gut basophilic cell in relation to water and ion transport. *Ex.p Appl. Acarol.* 3(3): 233-42, 1987.
- ANDREOTTI, R., GOMES, A., MALAVAZI-PIZA, K.C., SASAKI, S.D., SAMPAIO, C.A. & TANAKA, A.S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *Int. Immunopharmaco.*, 2: 557-563, 2002.
- ATELLA, G.C., GONDIM, K.C., MACHADO, E.A., MEDEIROS, M.N., SILVA-NETO, M.A. & MASUDA, H. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *An Acad Bras Cienc.* 77(3): 405-30, 2005
- BALASHOV Y.S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea)—vectors of diseases of man and animals. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America.* pp. 161-376, 1972.

- BARRÉ, N., LI, A.Y., MILLER, R.J., GAÑA, H., DELATHIÈRE, J.M., DAVEY, R.B. & GEORGE, J.E. In vitro and in vivo evaluation of deltamethrin and amitraz mixtures for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in New Caledonia. *Vet. Parasitol.* 155(1-2):110-9, 2008.
- BARRIGA, O. Evidence and mechanisms of immunosuppression in tick infestations. *Genetic Analysis*, 15: 139-142, 1999.
- BRAZ, G.R., COELHO, H.S., MASUDA, H. & OLIVEIRA, P.L. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Curr. Biol.*, 9: 703-706, 1999.
- BOCTOR, F.N. & KAMEL, M.Y. Purification and Characterization of 2 Lipovitellins from Eggs of Tick, *Dermacentor andersoni*. *Insect Biochem.* 6, 233-240, 1976.
- BOLDBAATAR, D., SIKALIZYO SIKASUNGE, C., BATTSETSEG, B., XUAN, X. & FUJISAKI, K. Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 25-36, 2006.
- CAMPOS, E., MORAES, J., FAÇANHA, A. R., MOREIRA, E., VALLE, D., ABREU, L., MANSO, P. P. A., NASCIMENTO, A., PELAJO-MACHADO, M., LENZI, H., MASUDA, A., VAZ JR, I. & LOGULLO, C. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Vet. Parasitol.* 138, 349-357, 2006.
- CANAL, C. W., MAIA, H. M., VAZ JR, I., CHIES, J. M., FARIAS, N., MASUDA, A., GONZALES, J. C. OZAKI, L.S. & DEWES, H. Changing patterns of vitellin-related peptides during development of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.* 19: 325- 336, 1995.

- CHEN, T. T., HILLEN, L. J. Expression of the vitellogenin genes in insects. *Gamete Res.* 7: 179–196, 1983.
- CHINZEI, Y., CHINO, H., & TAKAHASHI, K. Purification and Properties of Vitellogenin and Vitellin from A Tick, *Ornithodoros moubata*. *J. Comp.Physiol.* 152: 13-21, 1983.
- CHO, W. L., DEITSCH, K. R. & RAIKHEL, A. G. An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 10821-10824, 1991.
- CHO, W. L., TSAO, S. M., HAYS, A. R., WALTER, R., CHEN, J. S., SNIGIREVSKAYA, E. S. & RAIKHEL, A. S. Mosquito cathepsin B-like proteinase involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J Biol. Chem.* 274(19): 13311-13321, 1999.
- COONS, L.B., L'AMOREAUX, W.J., ROSELL-DAVIS, R. & STARR-SPIRES, L. Fine structure of the fat body and nephrocytes in the life-stages of *Dermacentor variabilis*. *Exp Appl Acarol.* 8(1-2):125-42, 1990.
- CORDOVÉS. C.O. Carrapato: controle ou erradicação. Alegrete: Gralha, 1996.
- DA SILVA VAZ JR, I, MARTINEZ, R.H., OLIVEIRA, A., HECK, A., LOGULLO, C., GONZALES, J.C., DEWES, H. & MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet. Parasitol.* 62: 155-160, 1996.
- DA SILVA VAZ JR, I., LOGULLO, C., SORGINE, M., VELLOSO, F.F., ROSA DE LIMA, M.F., GONZALES, J.C., MASUDA, H., OLIVEIRA, P.L. & MASUDA, A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet Immunol Immunopathol.*, 66: 331-341, 1998.

- DA SILVA VAZ JR, I.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. & OLIVEIRA, P. Vacina contra o carrapato. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 18-22, 2002.
- DE LA FUENTE, J., ALMAZÁN, C., CANALES, M., PÉREZ DE LA LASTRA, J.M., KOCAN, K. M., WILLADSEN, P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res Rev.* 8(1):23-8, 2007.
- DE ROSE, R., MCKENNA, R.V., COBON, G., TENNENT, J., ZAKRZEWSKI, H., GALE, K., WOOD, P. R., SCHEERLINCK, J. P. & WILLADSEN, P. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. *Vet Immunol Immunopathol.*, 71: 151-160, 1999.
- DENARDI, S.E., BECHARA, G.H. & MATHIAS, M. I. New morphological data on fat bodies of semi-engorged females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Micron.* 39(7): 875-83, 2008.
- DETERDING, L. J., RAMIREZ, D. C., DUBIN, J. R., MASON, R. P. & TOMER, K. B. Identification of free radicals on hemoglobin from its selfperoxidation using mass spectrometry and immuno-spin trapping: observation of a histidinyl radical. *J Biol Chem.*, 279: 11600-11607, 2004.
- DIEHL, P. A., AESCHLIMANN, A. & OBENCHAIN, F. D. Tick reproduction: oogenesis and ovoposition. *Physiology of ticks* (ed. Obenchain F. D. and Galun, R.), Pergamon Press, Oxford, 277-350, 1982.
- ESTRELA, A., SEIXAS, A. & TERMIGNONI, C. A cysteine endopeptidase from tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) larvae with vitellin digestion activity. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* 148, 410-416, 2007.

- FAGOTTO, F. Yolk degradation in ticks eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Arch Insect Biochem Physiol.*, 14(4): 217-235, 1990.
- FAGOTTO, F. Yolk degradation in ticks eggs: III. Developmentally regulated acidification of the yolk spheres. *Develop. Growth Different.* 33, 57-66, 1991.
- FAGOTTO, F. Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes, *J. Cell Sci.* 108: 3645- 3647, 1995.
- FAGOTTO, F. & MAXFIELD, F. R. Changes in yolk platelet pH during *Xenopus laevis* development correlate with yolk utilization. A quantitative confocal microscopy study. *J Cell Sci.*, 107: 3325-3337, 1994.
- FAUSTO, A. M.; GAMBELLINI, G.; MAZZINI, M.; CECCHETTINI, A.; MASETTI, M. & GIORGI, F. Yolk granules are differentially acidified during embryo development in the stick insect *Carausius morosus*. *Cell Tissue Res.* 305(3): 433-43, 2001.
- FIALHO, E., SILVEIRA, A. B., MASUDA, H. & SILVA-NETO, M. A. Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. *Insect Biochem Mol Biol.*, 32: 871-880, 2002.
- FIALHO, E., NAKAMURA, A., JULIANO, L., MASUDA, H. & SILVA-NETO, M. A. Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* 436: 246-253, 2005.
- FRIESEN, K. J. & REUBEN KAUFMAN W. Quantification of vitellogenesis and its control by 20-hydroxyecdysone in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *J Insect Physiol.* 48(8):773-782, 2002.
- GEORGE, J.E.; POUND, J.M. & DAVEY, R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129: 353-S366, 2004.

- GIORGI, F., BRADLEY, J. T., NORDIN, J. H. Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos. *Micron*, 30: 579-596, 1999.
- GOMES, A. Carrapato-de-boi: Prejuízos e controle. Embrapa. Campo Grande (MS), Dez, n. 42, 2000. [online] Disponível na internet via WWW. URL: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD42.html> Arquivo capturado em 28 de agosto de 2008.
- GONZALES, J.C. O controle do carrapato do boi. 2ed. Porto Alegre: Edição do autor, 1995.
- GONZALES, J. C. & SERRA-FREIRE, N. M. O couro dos bovinos no Rio Grande do Sul: riqueza há muito maltratada. *A Hora Veterinária*, 12(69):14-6, 1992.
- GRAÇA-SOUZA, A. V., MAYA-MONTEIRO, C., PAIVA-SILVA, G. O., BRAZ, G. R., PAES, M. C., SORGINE, M. H., OLIVEIRA, M. F. & OLIVEIRA, P. L. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol.*, 26: 322-335, 2006.
- GUERRERO, F. D.; NENE, V. M.; GEORGE, J. E.; BARKER, S. C.; WILLADSEN, P. Sequencing a new target genome: the *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) genome project. *J Med Entomol.*, 43(1):9-16, 2006.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Pecuária Municipal- 2005, Rio de Janeiro, v. 33, p. 1-35, 2005. [online] Disponível na internet via WWW. URL: <http://www.ibge.gov.br>. Arquivo capturado em 25 de agosto de 2008.
- IKEDA, M., YAGINUMA, T., KOBAYASHI, M. & YAMASHITA, O. cDNA cloning, sequencing and temporal expression of the protease responsible for vitellin degradation in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp.Biochem.Physiol.* 99, 405-411, 1991.

- INDRASITH, L.S.; SASAKI, T. & YAMASHITA, O. A unique protease responsible for selective degradation of a yolk protein in *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 263: 1045–1051, 1988.
- JAMES, A. M. & OLIVER, J. H. JR. Purification and partial characterization of vitellin from the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 27(7):639-49, 1997.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. *Parasitology*, 129, S3-14, 2004.
- JONSSON, N. N. The productivity effects of the cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol.*, 137: 1-10, 2006.
- JONSSON, N. N. & HOPE, M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.*, 146(3-4):193-8, 2007.
- KAUFMAN, W. R. Assuring paternity in a promiscuous world: are there lessons for ticks among the insects? *Parasitology*, 129: S145-60, 2004.
- KOCAN, K. M. Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle. *Vet. Parasitol.*, 57: 121-151, 1995.
- KOCAN, K. M.; MANZANO-ROMAN, R. & DE LA FUENTE, J. Transovarial silencing of the subolesin gene in three-host ixodid tick species after injection of replete females with subolesin dsRNA. *Parasitol Res.* 100(6): 1411-5, 2007.
- KUNZ, S. E. & KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: Resistance and environmental impact. *Rev Sci Tech.*, 13: 1249–1286, 1994.
- LARA, F. A.; LINS, U.; PAIVA-SILVA, G.; ALMEIDA, I. C.; BRAGA, C. M.; MIGUENS, F. C., OLIVEIRA, P. L. & DANSA-PETRETSKI M. A new intracellular

- pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. *J Exp Biol*, 206: 1707-1715, 2003.
- LARA, F. A.; LINS, U.; BECHARA, G. H. & OLIVEIRA, P. L. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J Exp Biol*, 208: 3093-3101, 2005.
- LEAL, A. T.; POHL, P. C.; FERREIRA, C. A.; NASCIMENTO-SILVA, M. C.; SORGINE, M. H.; LOGULLO, C., OLIVEIRA, P. L., FARIAS, S. E.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. *Protein Expr Purif.*, 45: 107-114, 2006 (a).
- LEAL, A. T.; SEIXAS, A.; POHL, P. C.; FERREIRA, C. A., LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P. L., FARIAS, S. E.; TERMIGNONI, C.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin. *Vet Immunol Immunopathol.*, 114: 341-345, 2006 (b).
- LI, A. Y.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J. & GEORGE, J. E. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. 41(2):193-200, 2004.
- LI, M. & HE, S. Purification and characterization of recombinant human interleukin-29 expressed in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.*, 122: 334-340, 2006.
- LIMA, C. A.; SASAKI, S. D.; TANAKA, A. S. Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 347(1): 44-50, 2006.

- LIU, X.; MCCARRON, R. C. & NORDIN, J. H. A cysteine protease that processes insect vitellin. Purification and partial characterization of the enzyme and the proenzyme. *J Biol. Chem.* 271, 33344-51, 1996.
- LIU, X. & NORDIN, J. H. Localization of the proenzyme form of the vitellin-processing protease in *Blattella germanica* by affinity-purified antibodies. *Arch Insect Biochem Physiol.*,38(3):109-18, 1998.
- LIYOU, N.; HAMILTON, S.; WATTERS, D. J.; TELLAM, R. & WILLADSEN, P. Endocytosis by digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*: regulation by protein Kinase C. *Insect Biochem Mol Biol.*, v. 26(2): 147-154, 1996.
- LOGULLO, C.; VAZ, I., SORGINE, M. H., PAIVA-SILVA, G. O., FARIA, F. S., ZINGALI, R. B., DE LIMA, M. F., ABREU, L., OLIVEIRA, E. F., ALVES, E. W., MASUDA, H., GONZALES, J. C., MASUDA, A. & OLIVEIRA, P. L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of the hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology* 116, 525-532, 1998.
- LOGULLO, C.; MORAES, J.; DANSA-PETRETSKI, M.; VAZ, I. S.; MASUDA, A.; SORGINE, M. H.; BRAZ, G. R.; MASUDA, H. & OLIVEIRA, P. L. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol*, 32: 1805-11, 2002.
- MALLYA, S. K.; PARTIN, J. S.; VALDIZAN, M. C. & LENNARZ, W. J. Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. *J.Cell Biol.* 117, 1211-1221, 1992.
- MANZUR M.J.; MUÑOZ, R. V.; LUCERO, A. A.; AYUB, M. J.; ALVAREZ, S. E. & CIUFFO, G. M. Production of recombinant enzymes of wide use for research. *Electr. J. Biotechnol.*, v. 9(3): 291-296, 2006.

- MARTINS, J. R. & FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet Rec.*, 149(2): 64, 2001.
- MÁSA, M.; MARESOVÁ, L.; VONDRÁSEK, J.; HORN, M.; JEZEK, J. & MARES, M. Cathepsin D propeptide: mechanism and regulation of its interaction with the catalytic core. *Biochemistry*. 45(51):15474-82, 2006.
- MAYA-MONTEIRO, C. M.; DAFFRE, S.; LOGULLO, C.; LARA, F. A.; ALVES, E. W.; CAPURRO, M. L.; ZINGALI, R.; ALMEIDA, I. C. & OLIVEIRA, P. L. HeLp, a Heme Lipoprotein from the Hemolymph of the Cattle Tick, *Boophilus microplus*. *J Biol Chem*. 275: 36584-36589, 2000.
- MAYA-MONTEIRO, C. M.; ALVES, L. R.; PINHAL, N.; ABDALLA, D. S. & OLIVEIRA, P. L. HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. *Insect Biochem Mol Biol*, 34: 81-87, 2004.
- MURRELL, A. & BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol*. 56(3):169-72, 2003.
- NAGAR, S. K. On the significance of the duration of preoviposition and oviposition periods in ixodid ticks. *Acarology*, 10: 621-629, 1968.
- NARI, A. Strategies for control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet Parasitol.*, 57: 153-165, 1995.
- NASCIMENTO-SILVA, M. C.; LEAL, A. T.; DAFFRE, S.; JULIANO, L.; DA SILVA VAZ, I. JR.; PAIVA-SILVA, G. O.; OLIVEIRA, P. L. & SORGINE, M. H. BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs. *Comp. Biochem. Physiol. B* 149, 599-607, 2008.

- NORDIN, J.H.; BEAUDOIN, E.L. & LIU, X.D. Acidification of yolk granules in *Blattella germanica* eggs coincides with proteolytic processing of vitellin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 18, 177–192, 1991.
- NUÑES, J. L.; MUÑOZ COBENAS, M. E. & MOLTEDO, H. L. Buenos Aires, Hemisfério Sur, 1982.
- NUTTALL, P. A.; TRIMNELL, A. R.; KAZIMIROVA, M. & LABUDA, M. Exposed and Concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.*, 28: 155-163, 2006.
- OLIVEIRA, G. P.; COSTA, R. P.; MELLO, R. P. & MENEGUELLI, C. A.. Estudo ecológico da fase não parasítica do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina; Ixodidae) no estado do Rio de Janeiro. *Arq. Univ. Fed. Rural R. Janeiro*, v. 4: 1-10, 1974.
- OLIVEIRA, M. F.; SILVA, J. R.; DANSA-PETRETSKI, M.; DE SOUZA, W.; LINS, U.; BRAGA, C. M.; MASUDA, H. & OLIVEIRA, P. L. Haem detoxification by an insect. *Nature*, 400: 517-518, 1999.
- OLIVEIRA MF, D'AVILA JC, TORRES CR, OLIVEIRA PL, TEMPONE AJ, RUMJANEK FD, BRAGA CM, SILVA JR, DANSA-PETRETSKI M, OLIVEIRA MA, DE SOUZA W, FERREIRA ST. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Bioch. Parasitol.*, 111: 217-221, 2000.
- OLIVEIRA, P.L.; KAWOOYA, J. K.; RIBEIRO, J. M.; MEYER, T.; POORMAN, R.; ALVES, E. W.; WALKER, F. A.; MACHADO, E. A.; NUSSENZVEIG, R. H.; PADOVAN, G. J. & MASUDA, H. A Heme-binding Protein from Hemolymph and Oocytes of the Blood-sucking, *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem.*, 270 (18): 10897-10901, 1995.

- OPDEBEECK, J.P.; WONG, J.Y.M.; DOBSON, C. Hereford cattle protected against *Boophilus microplus* with antigens purified by immunoaffinity chromatography from larval and adult ticks. *Immunology* 67: 388-393, 1989.
- PASCOA, V.; OLIVEIRA, P. L.; DANSA-PETRETSKI, M.; SILVA, JR; ALVARENGA, P. H.; JACOBS-LORENA, M. & LEMOS, F. J. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Bioch. Mol. Biol.*, 32: 517-523, 2002.
- PATARROYO, J. H.; PORTELA, R. W.; DE CASTRO, R. O.; PIMENTEL, J. C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; VARGAS, M. I.; PRATES, A. A. & MENDES, M. A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 88: 163-172, 2002.
- PECONICK, A. P.; SOSSAI, S.; GIRÃO, F. A.; RODRIGUES, M. Q.; SOUZA E SILVA, C. H.; GUZMAN, Q. F.; PATARROYO, V. A. M.; VARGAS, M. I. & PATARROYO, J. H. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. *Exp Parasitol.*, 119(1): 37-43, 2008.
- POSTLETHWAIT, J. H. & GIORGI, F. Vitellogenesis in insects. *Dev. Biol.*, 1:85-126, 1985.
- PRUETT, J. H. Immunological control of arthropods ectoparasites – a review. *Inter. J. Parasitol.*, 29: 25-32, 1999.
- RAIKHEL, A.S. & DHADIALLA, T.S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 217–251, 1992.

- RAIKHEL, A. S.; KOKOZA, V. A.; ZHU, J.; MARTIN, D.; WANG, S. F.; LI, C.; SUN, G.; AHMED, A.; DITTMER, N. & ATTARDO, G. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect Biochem Mol Biol.* 32(10): 1275-86, 2002.
- RECK, J. JR.; BERGER, M.; TERRA, R. M.; MARKS, F. S.; DA SILVA VAZ, I. JR.; GUIMARÃES, J. A. & TERMIGNONI, C. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Res Vet Sci.*, (no prelo).
- RENARD, G.; GARCIA, J. F.; CARDOSO, F. C.; RICHTER, M. F.; SAKANARI, J. A.; OZAKI, L. S.; TERMIGNONI, C. & MASUDA, A. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Bioch. Mol. Biol.* 30: 1017-1026, 2000.
- RIBEIRO, J. M. C. Role saliva in tick/ host interactions. *Exp. Appl. Acarol.*, 7: 15-20, 1989.
- RIBOLLA, P. E. & DE BIANCHI, A. G. Processing of procathepsin from *Musca domestica* eggs. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 25, 1011-1017, 1995.
- RIDING, G. A.; JARMEY, J.; MCKENNA, R. V.; PEARSON, R.; COBON, G. S. & WILLADSEN, P. A protective “concealed” antigen from *Boophilus microplus*: Purification, localization and possible function. *J Immunol.*, 153: 5158-5166, 1994.
- ROBERTS, J.A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. Stages of the cycle of the parasite against which resistance is manifest. *J. Parasitol.*,54: 667-673, 1968.
- ROSELL, R. & COONS, L. B. Purification and Partial Characterization of Vitellin from the Eggs of the Hard Tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Bioch.* 21, 871-885, 1991.

- SACHDEV, D. & CHIRGWIN, J.M. Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin. *Protein Expr. Purif.*, 12: 122-132, 1998.
- SAITO, K. C.; BECHARA, G. H.; NUNES, E. T.; DE OLIVEIRA, P. R.; DENARDI, S. E. & MATHIAS, M. I. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.*, 129(3-4): 299-311, 2005.
- SAPPINGTON, T. W. & RAIKHEL, A. S. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Bioch. Mol. Biol.*, 28: 277-300, 1998.
- SCHEIN, C. H. & NOTEBORN, M. H. M. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies. *Euro. J. Bioch.*, 229: 533-539, 1988.
- SCHMITT, T. H.; FREZZATTI, W.A. & SCHREIER, S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch. Bioch. Bioph.*, 307: 96-103, 1993.
- SEIFERT, G. W.; SPRINGELL, P.H. & TATCHELL, R. J. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilis microplus* (Canestrini). *Parasitology*, v. 58: 415-430, 1968.
- SEIXAS, A.; DOS SANTOS, P. C.; VELLOSO, F. F.; DA SILVA VAZ, I. JR.; MASUDA, A.; HORN, F. & TERMIGNONI, C. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase, *Parasitology*, 126: 155-163, 2003.
- SEIXAS, A.; LEAL, A.T.; NASCIMENTO-SILVA, M. C. L.; MASUDA, A.; TERMIGNONI, C. & DA SILVA VAZ JR., I. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 124: 332-340, 2008.

- SHANBAKY, N. M.; MANSOUR, M. M.; MAIN, A. J.; & HELMY, N. Vitellogenic and Nonvitellogenic Proteins in Hemolymph, Ovaries, and Eggs of *Argas (Argas) hermanni* (Acari: Argasidae). *J.Med.Entomol.*, 27: 986-992, 1990.
- SILVEIRA, A. B.; CASTRO-SANTOS, J.; SENNA, R.; LOGULLO, C.; FIALHO, E. & SILVA-NETO, M. A. Tick vitellin is dephosphorylated by a protein tyrosine phosphatase during egg development: Effect of dephosphorylation on VT proteolysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 200-209, 2006.
- SOJKA, D.; FRANTA, Z.; HORN, M.; HAJDUSEK, O.; CAFFREY, C. R.; MARES, M. & KOPÁČEK, P. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasit Vectors*. 18: 1-7, 2008.
- SONENSHINE D. E. Biology of Ticks. In: *Oxford University Press*, Oxford, UK, 1991.
- SORENSEN, H. P. & MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.*, 4(1):1-8, 2005.
- SORGINE, M. H., LOGULLO, C., ZINGALI, R. B., PAIVA-SILVA, G. O., JULIANO, L., OLIVEIRA, P. L. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of hard tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.*, 275: 28659-65, 2000.
- STORELLA, J.R.; WOJCHOWSKI, D.M. & KUNKEL, J.G. Structure and embryonic degradation of two native vitellins in the cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.*, 15: 259–275, 1985.
- SUTHERST, R.W.; MAYWALD, G. F.; KERR, J. D.; SIEGEMAN, D. A. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Aust. J. Agr. Res.*, 34: 317-327, 1983.

- TAKAHASHI, S. Y.; YAMAMOTO, Y.; SHIONOYA, Y. & KAGEYAMA, T. Cysteine proteinase from the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*: identification of a latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing *in vivo* and *in vitro*. *J. Biochem.*, 114: 267-272, 1993.
- TARNOWSKI, B. I. & COONS, L. B. Ultrastructure of the midgut and blood meal digestion in the adult tick *Dermacentor variabilis*. *Exp Appl Acarol.*, 6(4): 263-89, 1989.
- TELLAM, R. L.; KEMP, D.; RIDING, G.; BRISCOE, S.; SMITH, D.; SHARP, P.; IRVING, D. & WILLADSEN, P. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Vet. Parasitol.*, 103: 141-156, 2002.
- VICENT, S.H. Oxidative effects of heme and porphyrins on proteins and lipids. *Semin. Hemat.*, 26(2): 105-113, 1989.
- VILLAVERDE, A. & CARRIO, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.*, 25: 1385-1395, 2003.
- WIKEL, S. K. Tick Modulation of host Cytokines. *Exp. Parasitol.*, 84: 304-309, 1996.
- WILLADSEN, P. & KEMP, D. H. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. *Parasitol. Today*, 4: 196-198, 1988.
- WILLADSEN, P.; RIDING, G. A.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H.; TELLAM, R. L.; NIELSEN, J. N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G. S. & GOUGH, J. M. Immunologic control of a parasitic arthropod: Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J. Immunol.*, 143:1346-1351, 1989.
- WILLADSEN, P.; COBON, G. & MCKENNA, R. V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol.*, 18: 214-246, 1996.

- WILLADSEN, P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Vet. Parasitol.*, 101: 353-367, 2001.
- WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. *Parasitology*, 129: S367-S387, 2004.
- WILLADSEN, P. Tick control: thoughts on a research agenda. *Vet.Parasitol.*, 138: 161-168, 2006.
- WILLADSEN P. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? *Trends Parasitol.*, 24(4): 164-7, 2008.
- XIAO, H.; SINKOVITS, A. F.; BRYKSA, B. C.; OGAWA, M.; YADA, R. Y. Recombinant expression and partial characterization of an active soluble histo-aspartic protease from *Plasmodium falciparum*. *Protein Expr. Purif.*, 49: 88- 94, 2006.
- YAMAHAMA Y, UTO N, TAMOTSU S, MIYATA T, YAMAMOTO Y, WATABE S, TAKAHASHI SY. In vivo activation of pro-form *Bombyx* cysteine protease (BCP) in silkworm eggs: localization of yolk proteins and BCP, and acidification of yolk granules. *J Insect Physiol.*,49(2): 131-40, 2003.
- YAMAMOTO, Y.; ZHAO, X.; SUZUKI, A. & TAKAHASHI, S.Y. Cysteine proteinase from the eggs of the silkworm *Bombyx mori*: site of synthesis and a suggested role in yolk degradation. *J. Insect Physiol.*, 40: 447–454, 1994.
- YAMASHITA, O. & INDRASITH, L.S. Metabolic fates of yolk proteins during embryogenesis in arthropods. *Dev. Growth Differ.*, 30: 337–346, 1988.
- YIN, L.; NORDIN, J. H.; LUCCHES, P. & GIORGI, F. Cysteine proprotease colocalizes with vitellogenin in compound granules of the cockroach fat body. *Cell Tissue Res.*, 304(3): 391-9, 2001.

YOUNG, A. S. & MORZARIA, S. P. Biology of *Babesia*. *Parasit. Today*, 2: 211-219, 1986.

ZHAO, X. F.; WANG, J. X.; XU, X. L.; SCHMID, R. & WIECZOREK, H. Molecular cloning and characterization of the cathepsin B-like proteinase from the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Mol Biol.*, 6: 567-75, 2002.

6 ANEXOS

6.1 CURRICULUM VITÆ resumido

POHL, P. C.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Paula Cristiane Pohl

Local e data de nascimento: Três de Maio, Rio Grande do Sul, Brasil, 20/11/1982

Endereço profissional: Centro de Biotecnologia- UFRGS, Av. Bento Goncalves 9500

Predio 43421 - Campus do Vale, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone profissional: (51) 3308- 6078

E-mail: paula@cbiot.ufrgs.br

2. FORMAÇÃO:

Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Título da dissertação: CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE UMA ASPÁRTICO PROTEASE RECOMBINANTE DO CARRAPATO *Boophilus microplus* PRODUZIDA NA FORMA ATIVA EM *Escherichia coli*.

Orientador: Aoi Masuda.

Co-orientador: Itabajara Da Silva Vaz Jr

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Período: 2002 a 2006

Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Título: Função da THAP na embriogênese do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Orientador: Aoi Masuda.

Co-orientador: Itabajara Da Silva Vaz Jr

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Período: 2007

3. ESTÁGIOS:

Estágio de iniciação científica, Laboratório de Imunologia Aplicada a Sanidade Animal, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Orientador: Aoi Masuda

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Período: 08/2003 a 01/2007

Mestrado-sanduíche, Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Universidade Estadual do norte Fluminense, UENF.

Orientador: Aoi Masuda (UFRGS)

Co-orientadores: Itabajara Da Silva Vaz Jr (UFRGS) e Carlos Logullo (UENF)

Auxílio financeiro: Programa Nacional De Cooperação Acadêmica (PROCAD), Brasil.

Período: 10/2007 a 12/2007

4. ARTIGOS COMPLETOS

4.1 Artigos completos publicados:

LEAL, A. T.; POHL, P. C.; FERREIRA, C. A.; NASCIMENTO-SILVA, M. C.; SORGINE, M. H.; LOGULLO, C., OLIVEIRA, P. L., FARIAS, S. E.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. *Protein Expr Purif.*, 45: 107-114, 2006.

LEAL, A. T.; SEIXAS, A.; POHL, P. C.; FERREIRA, C. A., LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P. L., FARIAS, S. E.; TERMIGNONI, C.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A.

Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin. *Vet Immunol Immunopathol.*, 114: 341-345, 2006.

FREITAS, D.; POHL, P. C. & DA SILVA VAZ, I. JR. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33 (2): 109-117, 2005.

POHL, P. C.; SORGINE, M.; LEAL, A. T.; LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P. L.; DA SILVA VAZ, I. JR.; & MASUDA, A. An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol*, 2008 (no prelo). [Acho que pode colocar a referencia completa](#)

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

5.1 Resumos expandidos publicados em anais de congressos

SIMIONATTO, S.; HARTWIG, D.; LUERCE, T.D.; POHL, P. C.; MARCHIORO, S. B.; DELLAGOSTIN, O. A. Clonagem, expressão e purificação de antígenos recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: XV Congresso de Iniciação Científica, Pelotas-RS. Livro de Resumos do XV Congresso de Iniciação Científica, 2006.

HARTWIG, D.; GALLI, V.; SIMIONATTO, S.; LUERCE, T.D.; POHL, P. C.; DELLAGOSTIN, O. A. Mutação sítio-específica de genes de *Mycoplasma hyopneumoniae* para clonagem e expressão em *Escherichia coli*. In: XV Congresso de Iniciação Científica, Pelotas-RS. Livro de Resumos do XV Congresso de Iniciação Científica, 2006.

GALLI, V.; HARTWIG, D.; SIMIONATTO, S.; LUERCE, T.D.; POHL, P. C.; DELLAGOSTIN, O. A. Clonagem direcional de antígenos secretados de *Mycoplasma hyopneumoniae* em pET200D-TOPO. In: XV Congresso de Iniciação Científica, Pelotas-RS. Livro de Resumos do XV Congresso de Iniciação Científica, 2006.

5.2 Resumos publicados em anais de congressos:

POHL, P. C.; LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P. L.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. THAP, an aspartic protease involved in tick embryogenesis: detection of the gene and protein expression. In: XXXVII SBBq and XI PABMB, Águas de Lindóia, São Paulo.

- Abstracts of the XI Congress of the Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB), 11: 8199, 2008.
- COSTA, E.; CAMPOS, E.; ANDRADE, C.; POHL, P. C.; FACANHA, A.; MASUDA, A.; DA SILVA VAZ, I. JR.; LOGULLO, C. Partial biochemistry and molecular study about inorganic pyrophosphatase of cattle tick *Rhipicephalus microplus* embryos. In: XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and XI Congress of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB), Águas de Lindóia-SP. Abstracts of the XI Congress of the Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB), 11: 8812, 2008.
- POHL, P. C.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Clonagem e caracterização imunogênica da THAP recombinante. In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre. Livro de Resumos do XIX Congresso de Iniciação Científica da UFRGS, 19: 413, 2007.
- ALMEIDA, P. G.; POHL, P. C.; MASUDA, A. & DA SILVA VAZ, I. JR. Clonagem do cDNA completo de um transportador ABC de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre-RS. Livro de Resumos do XIX Congresso de Iniciação Científica da UFRGS, 19: 197, 2007.
- POHL, P. C.; SORGINE, M.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Recombinant expression and partial characterization of an aspartic proteinase from *Boophilus microplus*. In: 8th International Veterinary immunology Simposium, Ouro Preto- MG. Program and Book of abstracts of the International Veterinary Immunology Symposium, 1: 101, 2007.
- SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S. B.; GALLI, V.; POHL, P. C.; HARTWIG, D.; DINIZ, T. & DELLAGOSTIN, O. A. Clonagem, purificação e caracterização imunológica de antígenos recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Brasília. Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.
- POHL, P. C.; SORGINE, M.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Partial characterization of a recombinant aspartic proteinase involved in *Boophilus microplus* embryogenesis. In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia

- Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, Porto Alegre- RS. Livro de resumos da IX reunião anual do PPGBCM da UFRGS, v. 9, 2007.
- LEAL, A. T.; SEIXAS, A.; POHL, P. C.; FERREIRA, C. A. S.; LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P.; FARIAS, S. E.; TERMIGNONI, C.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Vaccination of bovines with a recombinant *Boophilus microplus* pro-Cathepsin (BYC). In: I Simpósio Brasileiro de Acarologia, Viçosa, MG. Anais do I Simpósio Brasileiro de Acarologia, 1:160, 2006.
- POHL, P. C.; LEAL, A.T.; SORGINE, M.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Expressão e Caracterização de uma Aspártico Protease Recombinante do *Boophilus microplus*. In: XVIII Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre-RS. Livro de Resumos do XVIII Salão de Iniciação Científica, 18:439, 2006.
- POHL, P. C.; LEAL, A. T.; SORGINE, M.; MEDRANO, F. J.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Enzymatic characterization of a recombinant aspartic proteinase from *Boophilus microplus*. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia- São Paulo. Livro de Resumos da XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 35: 8087, 2006.
- SEIXAS, A.; LEAL, A. T.; POHL, P. C.; FERREIRA, C. A. S.; LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P. L.; FARIAS, S. E.; TERMIGNONI, C.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Bovine vaccination with a recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin (rBYC). In: XXXV Reunião Anual da Sociedade de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia, São Paulo. Livro de Resumos da XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 35: 8272, 2006.
- POHL, P. C.; LEAL, A. T.; SORGINE, M.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Complete amino acid sequence of the recombinant THAP of the *Boophilus microplus*: cloning and expression. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia- SP. Livro de Resumos da XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 34: 45, 2006.
- LEAL, A. T.; FERREIRA, C. A. S.; LOGULLO, C.; SORGINE, M.; FARIAS, S. E.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Influence of thioredoxin fusion protein in solubilization, refolding and antigenicity of an aspartic proteinase of *Boophilus*

- microplus* expressed in inclusion bodies. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia- SP. Livro de Resumos da XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 34: 45, 2005.
- POHL, P. C.; LEAL, A. T.; SORGINE, M.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Atividade enzimática de uma proteinase aspártica recombinante do *Boophilus microplus*. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, Porto Alegre- RS. Revista de Patologia Tropical - edição especial - resumos, 2005.
- POHL, P. C.; LEAL, A.T.; SORGINE, M.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Clonagem e expressão da THAP recombinante do carrapato *Boophilus microplus* para estudos enzimáticos e de imunogenicidade. In: XVII Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre- RS. Livro de Resumo do XVI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2005.
- POHL, P. C.; LEAL, A. T.; SORGINE, M.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Produção da THAP recombinante do carrapato *Boophilus microplus* para a caracterização enzimática e imunogênica. In: VII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular UFRGS, Porto Alegre- RS. Livro de Resumos da VII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular UFRGS, 7: 75, 2005.
- POHL, P. C.; LEAL, A. T.; SORGINE, M.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Restauração da seqüência completa da THAP recombinante do carrapato *Boophilus microplus*. In: XVI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre- RS. Livro de Resumo do XVI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 16: 471, 2004.
- LEAL, A. T.; POHL, P. C.; LOGULLO, C.; SORGINE, M.; FARIAS, S. E.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. *Boophilus microplus* Yolk Pro-Cathepsin Cloning, Expression and Analysis of Immunogenicity. In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu- MG. Resumos da XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 33: 1, 2004.
- POHL, P. C.; LEAL, A. T.; SORGINE, M.; DA SILVA VAZ, I. JR & MASUDA, A. Seqüência completa de aminoácidos da THAP recombinante do carrapato *Boophilus microplus*: clonagem e expressão. In: VI Reunião Anual do Programa de Pós-

graduação em Biologia Celular e Molecular UFRGS, Porto Alegre- RS. Livro de Resumos da VI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular UFRGS, 6: 65, 2004.

LEAL, A. T.; POHL, P. C. & FERREIRA, C. A. S. Clonagem, expressão, purificação e antigenicidade de uma aspártico proteinase recombinante de *Boophilus microplus*. In: VI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular UFRGS, Porto Alegre- RS. Livro de Resumos da VI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular UFRGS, 6: 50, 2004.