



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BIO 99002 TRABALHO DE CONCLUSÃO II

**CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE UMA ASPÁRTICO PROTEASE
RECOMBINANTE DO CARRAPATO *Boophilus microplus* PRODUZIDA NA
FORMA ATIVA EM *Escherichia coli***

PAULA CRISTIANE POHL

BIO
BIO
391

Porto Alegre
2006

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCÊNCIAS

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BIO 99002 TRABALHO DE CONCLUSÃO II**

**CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE UMA ASPÁRTICO PROTEASE
RECOMBINANTE DO CARRAPATO *Boophilus microplus* PRODUZIDA NA
FORMA ATIVA EM *Escherichia coli***

Paula Cristiane Pohl

Trabalho apresentado como um dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas Ênfase Molecular, Celular e Funcional.

Orientadora: Dr^a. Aoi Masuda

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

**Porto Alegre
Novembro, 2006**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

*O sábio não se exhibe, e por isso brilha.
Ele não se faz notar, e por isso é notado.
Ele não se elogia, e por isso tem mérito.
E porque não está competindo, ninguém no
mundo pode competir com ele.*

Lao Tzu

DEDICATÓRIA

À minha família, por tudo que representam.

Ao Daniel, pelo carinho, apoio e compreensão.

AGREDECIMENTOS

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 Estrazuras Farias, pelas contribuições e pelo convívio.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Arnaldo Zaha e Dra. Ana Battastini

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal: Daniela, Raquel, Herbert, Leonara, Luis, Maria Lúcia, Carolina, Caroline, Roberta, Juliana, Ana Paula, Fernanda, Maurício, Matheus, Gabriel, Kyioko, Ísis e Letícia; obrigada pela alegria na convivência, cooperação e amizade.

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

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!

“A melhor fórmula para uma vida miserável é deixar de fazer as coisas pelas quais somos apaixonados.”

Paulo Coelho

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 O Carrapato <i>Boophilus microplus</i>	17
1.2 Ciclo biológico.....	17
1.3 Importância econômica.....	19
1.4 Métodos de controle.....	20
1.4.1 Controle químico.....	20
1.4.2. Controle biológico.....	21
1.4.3. Controle imunológico.....	23
1.5 Embriogênese e degradação dos componentes do vitelo.....	27
1.6 O metabolismo do heme no <i>B. microplus</i>	29
1.7 A proteína <i>Tick Heme-binding Aspartic Proteinase</i> (THAP).....	31
2 OBJETIVOS.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Materiais.....	34
3.1.1 Soluções e tampões.....	34
3.1.1.1 Tampões para eletroforese.....	34
3.1.1.2 Tampões e soluções para Western-blot.....	34
3.1.1.3 Soluções para extração de DNA plasmidial.....	35
3.1.1.4 Tampões para cromatografia em resina Sepharose-Ni ²⁺	35
3.1.1.5 Tampão para clivagem com Enteroquinase.....	35
3.1.1.6 Tampão para reação enzimática.....	35
3.1.2 Gel de agarose e poliacrilamida.....	35

3.1.3	Marcadores de massa molecular.....	36
3.1.4	Meios e placas de cultura.....	36
3.1.5	Antibióticos.....	36
3.1.6	Enzimas.....	36
3.1.7	Plasmídeo e Primers para clonagem.....	37
3.1.8	Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	37
3.1.9	Inibidores de proteases.....	38
3.1.10	Coluna de Cromatografia.....	38
3.2	Métodos.....	38
3.2.1	Preparação de células competentes.....	38
3.2.2	Clonagem da THAP no vetor pET43a.....	39
3.2.3	Transformação de células competentes por eletroporação.....	40
3.2.4	Extração de DNA plasmidial em pequena escala.....	40
3.2.5	Análise quantitativa e qualitativa do DNA plasmidial.....	41
3.2.6	Transformação de células competentes por choque térmico.....	41
3.2.7	Seleção de linhagens para a expressão da proteína recombinante.....	42
3.2.8	Expressão da rTHAP-NusTag em maior escala.....	43
3.2.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	43
3.2.10	Western-blot.....	43
3.2.11	Purificação da rTHAP-NusTag.....	44
3.2.12	Produção do controle de atividade enzimática (controle <i>E. coli</i>).....	44
3.2.13	Purificação da THAP nativa (nTHAP).....	45
3.2.14	Dosagem de proteína.....	45
3.2.15	Clivagem da proteína recombinante.....	45
3.2.16	Ensaio enzimáticos com substrato sintético.....	45
3.2.17	Efeito de inibidores de proteases sobre a atividade da rTHAP.....	46
4	RESULTADOS.....	47
4.1	Clonagem da THAP.....	47
4.2	Expressão da proteína recombinante.....	49
4.3	Purificação da proteína recombinante.....	50
4.4	Atividade enzimática da rTHAP.....	52

4.5 Efeito de inibidores de proteases sobre a atividade da rTHAP.....	53
5 DISCUSSÃO.....	55
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
µg	microgramas
µl	microlitros
µM	micromolar
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BYC	<i>Boophilus Yolk pro-Cathepsin</i>
cDNA	DNA complementar
DMSO	dimetil-sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
D.O.	densidade óptica
GST	glutathione S-transferase
g	grama
IPTG	<i>isopropylthio-β-D-galactoside</i>
kDa	quilodalton = 1000 daltons
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>
mA	miliampère
min	minutos
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
NBT	<i>nitroblue tetrazolium</i>
ng	nanograma
nm	nanômetro
nTHAP	<i>Tick Heme-binding Aspartic Proteinase</i> nativa
Nus-Tag	proteína de fusão NusA
PAGE	<i>polyacrylamide gel eletrophoresis</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RNA	ácido ribonucléico
RFU	unidades de fluorescência

rTHAP	<i>Tick Heme-binding Aspartic Proteinase</i> recombinante
rTHAP-NusTag	rTHAP fusionada a NusTag
SDS	dodecilsulfato de sódio
TRX	tioredoxina
VT	vitelina
VTG	vitelogenina
VTDCE	<i>vitellin-degrading cysteine endopeptidase</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato *B. microplus*.....19
- Figura 2 - Diagrama esquemático da ORF do vetor pET43a-THAP4aa.....48
- Figura 3 - Análise dos clones obtidos pelo padrão de hidrolise com *Bam*HI e *Pst*I em gel de agarose 0,8%.....48
- Figura 4 - SDS-PAGE (10%) do extrato total das linhagens de *E.coli* BL21 (DE3) testadas para a expressão da rTHAP-NusTag corado com Coomassie blue G-250.....49
- Figura 5 - SDS-PAGE (10%) da expressão da rTHAP-NusTag a 37° C e 23° C corado com Coomassie blue G-250.....50
- Figura 6 - Cromatografia da rTHAP-NusTag em resina de afinidade (sepharose-Ni²⁺).....51
- Figura 7A - SDS-PAGE (10%) da rTHAP-NusTag antes e após a purificação e rTHAP após a remoção da NusTag. B - Western-blot sondado com soro de coelho anti-nTHAP das mesmas frações.....52

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Linhagens bacterianas utilizadas no trabalho.....	37
Tabela II: Inibidores de proteases.....	38
Tabela III: Condições estabelecidas para a PCR	40
Tabela IV - Atividade da rTHAP e dos controles (nTHAP e controle <i>E.coli</i>) sobre substrato sintético Abz-AIAFFSRQ-EDDnp na ausência ou presença de pepstatina A.....	53
Tabela V - Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica da rTHAP sobre substrato sintético Abz-AIAFFSRQ-EDDnp.....	54

RESUMO

O carrapato *Boophilus microplus*, um ectoparasita hematófago, é responsável por perdas econômicas substanciais na bovinocultura, necessitando o uso intensivo de acaricidas em várias partes do mundo. 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. O controle imunológico, por meio de vacinas, é considerado o um dos métodos mais promissores, no entanto, seu desenvolvimento depende da identificação de moléculas do carrapato e caracterização de seus papéis na fisiologia desse artrópode.

Recentemente foi descrito que o *B. microplus* obtém suas moléculas de heme da hemoglobina do hospedeiro presente no sangue ingerido, sendo o primeiro organismo multicelular descrito que é incapaz de sintetizar o anel de ferro protoporfirina IX. Um importante resultado dessa descoberta, no contexto da reprodução do carrapato, é que os ovos devem conter todo o heme necessário para constituir um novo organismo. Assim, as vitelinas, principais proteínas do vitelo, além de constituírem a principal fonte de aminoácidos, fornecem o heme necessário para o desenvolvimento do embrião. A disponibilidade dessa fonte depende de várias enzimas proteolíticas, entre elas a THAP (Tick Heme-binding Aspartic Proteinase). Estudos com essa enzima mostraram que ela possui um sítio de ancoragem que reconhece heme na superfície do substrato protéico aumentando assim sua especificidade para hemeproteínas e promovendo um mecanismo de controle do estresse oxidativo. Percebendo sua importância na embriogênese do carrapato, nós realizamos a subclonagem da seqüência codificante completa da THAP após a recuperação dos doze nucleotídeos iniciais que estavam ausentes no cDNA inicialmente clonado. Através de PCR, obtivemos um amplicon de 1065 pb que foi clonado no vetor de expressão pET43a. O plasmídeo resultante (pET43a- THAP4aa) foi eletroporado em nove linhagens de *E.coli* BL21(DE3). As melhores condições estabelecidas para a produção da proteína recombinante (rTHAP associada a proteína de fusão Nus-Tag) na forma solúvel foi a expressão em *E.coli* BL21(DE3)

RIL a 23° C por 4 horas com 1 mM de IPTG. A análise da expressão foi realizada por SDS-PAGE e Western-blot com soro policlonal anti-THAP nativa. A THAP recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade em resina Sepharose-Ni²⁺. Uma fração parcialmente purificada e hidrolisada para remoção da proteína de fusão foi utilizada na realização de ensaios enzimáticos com substrato sintético fluorogênico. A atividade específica obtida sobre substrato sintético foi de 2,267 RFU/ min/ mg de proteína. Essa atividade foi inibida por pepstatina A, mas não por E-64, leupeptina ou antipainá. O sucesso da expressão da rTHAP ativa em *E.coli* oferece uma vantagem para produção e purificação dessa enzima em larga escala o que pode acelerar investigações adicionais sobre sua atividade enzimática e sobre a estrutura funcional desta enzima. Além disso, a produção de proteínas recombinantes em sistema heterólogo é um processo chave para o desenvolvimento de uma vacina para o eficiente controle do *B. microplus*, objetivo central do nosso trabalho.

Palavras-chave: *Boophilus microplus*, THAP, aspártico protease, heme, atividade enzimática.

ABSTRACT

The hard tick *Boophilus microplus* is responsible for substantial economic losses to the livestock industry, necessitating intensive use of chemical acaricides in many parts of the world. 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 and biological means. An anti-tick vaccine is considered one of the most promising methods; however, its development still depends on the identification of tick molecules and characterization of their roles in arthropod physiology.

Recently it was shown that *B. microplus* obtains its own heme from host hemoglobin present in the ingested blood, being the first multicellular organism shown to be unable to synthesize the protoporphyrin ring. An important outcome of this finding, in the context of tick's reproduction, is that the egg must provide all the heme necessary to build up a new organism. Thus, vitellins (VT), the major storage proteins from eggs, are the source of amino acids and heme used for embryo growth in this arthropod. The availability of this source is dependent of several proteolytic enzymes, among them an heme-binding aspartic proteinase (THAP). Studies with that enzyme showed that it has a docking site that recognizes heme on the surface of protein substrates increasing its specificity toward hemoproteins and providing a possible mechanism of regulating tick VT degradation preventing oxidative damage. Perceiving its importance; we have subcloned the full protein sequence after restoring of the four initial amino acids of the THAP. It was necessary since initial nucleotides of the exon were absent in the original cDNA cloned. Through PCR was obtained an amplicon with 1065 bp that was cloned in the pET43a expression vector. The resultant plasmid (pET43a- THAP4aa) was transformed by electroporation in eleven *E. coli* strains BL21 (DE3). The best conditions established for production of the recombinant protein (rTHAP with fusion protein Nus-Tag) in the soluble form was the expression in *E. coli* BL21 (DE3) RIL at 23° C and 1 mM of IPTG for 4 hours. Analysis of the expression was performed by SDS-PAGE and Western-blot using a polyclonal serum anti-THAP. For the purification of rTHAP-NusTag was used an affinity

chromatography column with Sepharose-Ni²⁺. A fraction partially purified was obtained and its enzymatic activity was assayed with fluorogenic substrate Abz-AIAFFSRQ-EDDnp after hydrolysis for removal the fusion protein (Nus-Tag). The enzymatic activity was monitored for 1 hour with F-MAX fluorometer and the specific activity obtained was 2,267 RFU/ min/ mg of protein. Its activity was inhibited by pepstatin A, but not by E-64, leupeptin or antipain. The successful expression of active recombinant THAP in *E.coli* offers an advantage for production and purification of that enzyme in wide scale that can accelerate additional investigations about its enzymatic activity and functional structure of this enzyme. Besides, the production of recombinant proteins in heterologous systems is a key process to development of an anti-tick vaccine, central objective of our work.

Keywords: *Boophilus microplus*, THAP, aspartic proteinase, heme, enzymatic activity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Carrapato *Boophilus microplus*

O carrapato *Boophilus microplus* (CALESTRINI, 1887) é um ectoparasita hematófago de mamíferos pertencente ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acarina e família Ixodidae. Essa família caracteriza-se pela presença de escudo quitinoso (carrapatos duros). O *B. microplus* é originário da Ásia e tem como principal hospedeiro o bovino, embora seja capaz de completar eventualmente seu ciclo de vida em outros animais, como a ovelha, o cavalo, o búfalo e o veado (GONZALES, 1995). Sua distribuição no mundo inclui os grandes rebanhos comerciais da América, África, Ásia e Oceania, entre os paralelos 32 °N e 32 °S (GONZALES, 1995), sendo considerado o carrapato de maior significado econômico e o principal alvo em programas de controle e erradicação nos rebanhos da América do Sul (NARI, 1995).

1.2 Ciclo biológico

O ciclo de vida do *B. microplus* divide-se em duas fases: a fase de vida livre e a fase de vida parasitária.

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 (teleógina) se desprende do hospedeiro e cai ao solo. As teleóginas 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, que pode chegar a 3.000 ovos por fêmea, e após morrem. Aproximadamente 7 dias após o término da postura, inicia-se a eclosão dos ovos, que em condições ideais para o desenvolvimento do *B. microplus*, ou seja, temperatura de 28 °C e umidade relativa superior a 70 % (GONZALES, 1995), tem duração média de 18 dias. 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 (WALADDE & RICE, 1982) e dióxido de carbono expirado (SONENSHINE, 1993). A temperatura e a umidade influenciam o tempo de sobrevivência das larvas no ambiente, que pode ser de vários meses (GONZALES, 1995). A fase de vida livre termina quando a larva encontra o hospedeiro.

A fase de vida parasitária do *B. microplus* desenvolve-se sobre um único hospedeiro e têm período de duração médio de 21 dias, onde passa pelos estágios de larva, ninfa e adulto. Assim que entram em contato com o bovino, as larvas migram para regiões corporais, como a região posterior das coxas e as regiões perianal e perivulvar, que são mais propícias para o seu desenvolvimento em virtude da espessura, vascularização, temperatura da pele e dificuldade de auto-limpeza do hospedeiro (CORDOVÉS, 1996). A larva passa 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 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 (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). A Figura 1 ilustra o ciclo de vida do carrapato.

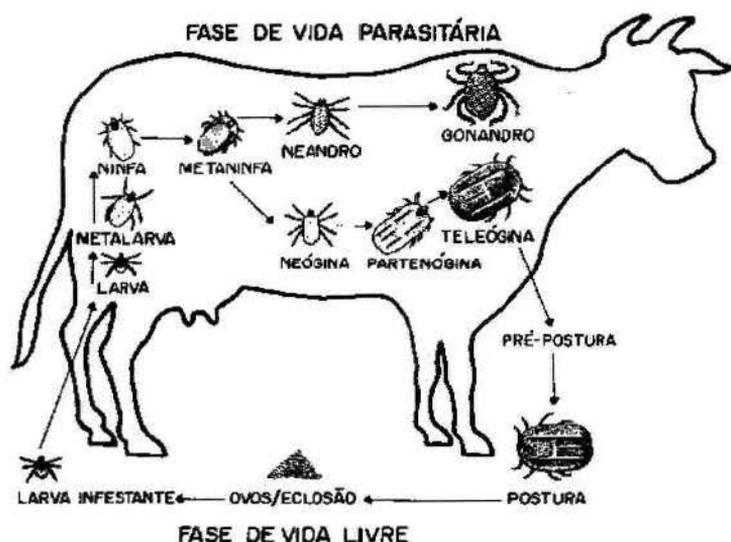


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato *B. microplus* (Fonte: Gonzales, 1995).

1.3 Importância econômica

O parasitismo do carrapato bovino acarreta significativo dano econômico à pecuária bovina (HORN & ARTECHE, 1985). Durante a fase parasitária, um único carrapato suga de 2 a 3 ml de sangue (GONZALES, 1995), o que se reflete em grandes 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). O *B. microplus* também transmite patógenos para animais e humanos que causam doenças tais como a Babesiose (*Babesia bovis* e *Babesia bigemina*), a Anaplasmose (*Anaplasma marginale*), a Teleriose (*Theileria annulata*) e a doença de Lyme (*Borrelia burdorferi*) (NARI *et al.*, 1995; NUTTALL *et al.*, 2006). Além dos prejuízos diretos causados pela infestação de carrapatos, existem as despesas com instalações e equipamentos necessários à aplicação de carrapaticidas nos rebanhos, aquisição de carrapaticidas 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. Até limitações internas de um mesmo

país constituem barreiras sanitárias que afetam o desenvolvimento e a economia regional (CORDOVÉS, 1996).

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores de carne bovina do mundo, possui um rebanho bovino de aproximadamente 200 milhões de cabeças, produzindo aproximadamente 8,5 milhões de toneladas de carne e 23 bilhões de leite por ano (CNPQ, 2005; IBGE, 2004). Estima-se que, anualmente, as perdas decorrentes da infestação pelo *B. microplus* cheguem a 1 bilhão de dólares americanos no Brasil (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 Métodos de controle

1.4.1 Controle químico

O método de controle para o carrapato bovino que mais tem sido utilizado desde a década de 50 é o uso de acaricidas (PRUETT, 1999). Apesar de ser o único método eficaz atualmente disponível, o uso de pesticidas químicos tem se tornado cada vez mais problemático por inúmeras razões. O surgimento de populações de carrapatos resistentes para as diferentes drogas introduzidas no mercado, foi descrita ao longo do século XX. 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 *B. microplus* (KOCAN, 1995). O controle químico também 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). 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 *B. microplus*.

Atualmente, os controles biológico e imunológico já constituem parte de programas de controle integrado de ectoparasitas, que ainda exigem a utilização de produtos químicos (PRUETT, 1999).

1.4.2. Controle biológico

O *B. microplus*, assim como qualquer organismo vivo, tem sua viabilidade condicionada às condições de estresse a que estiver submetido. Portanto, fatores ambientais não favoráveis, principalmente com relação à temperatura e à umidade relativa do ar, podem desempenhar papel importante no equilíbrio das populações de carrapatos no campo, reduzindo o número de larvas viáveis e, conseqüentemente, os índices de infestação dos bovinos (GONZALES, 1995).

O tipo de vegetação e a seleção de raças bovina menos sensíveis ao carrapato também podem atuar como fatores limitantes no crescimento da população de carrapatos. Pastagens nativas com vegetação arbustiva proporcionam abrigo as fêmeas em postura, enquanto que algumas pastagens, por serem tóxicas, repelentes ou por imobilizarem as larvas através de secreções ou estruturas da planta, podem limitar bastante o número de carrapatos. Em especial, o plantio de gramíneas do gênero *Stylosanthes* (SUTHERST *et al.*, 1982) e do capim gordura (*Melinis minutiflora*) (FARIAS *et al.*, 1986) podem contribuir consideravelmente para o controle do carrapato. Outra técnica que pode ser viável utilizando os conhecimentos sobre o ciclo biológico do carrapato é a rotação de pastagens que comprovadamente reduz os níveis de infestação pelo *B. microplus*, especialmente nas épocas de pico parasitário (NORTON *et al.*, 1983; ELDER *et al.*, 1980).

O controle biológico pode também ser baseado na relação do carrapato com seus inimigos naturais. Os carrapatos são alvos de uma série de predadores, dentre os quais, deve-se salientar a garça vaqueira (*Egretta ibis*), que se alimenta de larvas, neóginas e partenóginas retiradas do corpo dos bovinos ou de teleóginas que caem ao solo (ALVES-BRANCO *et al.*, 1982). Grandes populações de formigas carnívoras podem manter baixos os níveis populacionais de *B. microplus* devorando fêmeas ao solo (GONZALES, 1995). Vários microorganismos potencialmente patogênicos podem ser encontrados em carrapatos. Os fungos *Metarhizium anisopliae* e

Beauveria bassiana tem sido os mais estudados e parecem os mais promissores (SAMISH *et al.*, 2004). O *M. anisopliae*, um deuteromiceto entomopatogênico, é altamente patogênico para carrapatos *Ixodes scapularis* (ZHIOUA *et al.*, 1997), *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* (KAAYA *et al.*, 1996) e *B. microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000). No Brasil, já foram encontrados isolados de *M. anisopliae* infectando naturalmente o *B. microplus* (DA COSTA *et al.*, 2002). Avaliação *in vitro* de 12 isolados desse fungo sobre fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* mostrou que existem isolados mais patogênicos e que podem causar morte de até 100 % dos carrapatos infectados, dependendo da concentração de esporos na suspensão utilizada (FRAZZON *et al.*, 2000). Bactérias, como *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* são naturalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato e também têm sido estudadas no controle biológico. Existem relatos de uma diminuição de até 47 % na postura quando teleóginas de *B. microplus* foram submersas em suspensão de *C. lapagei* (BRUM, 1988). Outros organismos parasitas, tais como nematódeos, tem sido também avaliados como ferramentas no controle biológico de carrapatos, já que têm se mostrados eficientes no controle de insetos (SAMISH & GLAZER, 2001).

Outra estratégia envolvendo controle biológico é a utilização de compostos naturais como pesticidas. DAVEY *et al.* (2001) testaram em bovinos, diferentes concentrações de "spinosad", um acaricida natural de *Sacharopolyspora spinosa* (actinomiceto), obtendo uma drástica redução no número de fêmeas ingurgitadas, na massa de ovos e no índice de fecundidade do *B. microplus*. O extrato de *Sapindus saponaria*, uma árvore rica em saponinas e encontrada nos EUA, México, Argentina e Brasil, foi testado *in vitro* contra larvas de *B. microplus* demonstrando ação larvicida (FERNANDES *et al.*, 2005). Resultado semelhante foi obtido com óleo essencial extraído de 3 espécies de *Eucalyptus* (CHAGAS *et al.*, 2002).

O controle biológico através de um programa de manejo integrado de pragas, apesar de eficiente, nem sempre pode ser utilizado por interferir no manejo rotineiro da criação, além de poder gerar desequilíbrios ecológicos no ecossistema.

1.4.3. Controle imunológico

O controle de ectoparasitos através de vacinação tem sido estudado nas últimas cinco décadas e é considerado um dos métodos mais promissores como alternativa ao uso de acaricidas (WILLADSEN & KEMP, 1988). 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 *et al.*, 2001 e 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, citosinas, 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 artrópodos hematófagos possui propriedades anti-hemostáticas, vasodilatatórias, antiinflamatórias e imunossupressoras, facilitando a sua alimentação e a aquisição e transmissão de patógenos (RIBEIRO, 1989).

Com objetivo de induzir uma melhor resistência no animais, vários estudos vem 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 *B. microplus* é mais baixa que daqueles alimentados em bovinos não imunizados (DA SILVA VAZ JR, I *et al.*, 1998). Todas estas observações fornecem bases que justificam tentativas de utilizar vacinas no controle desse ectoparasito.

A pesquisa de antígenos com potencial protetor constitui-se no maior desafio para o desenvolvimento de vacinas, sendo ainda hoje o objeto de pesquisa de vários grupos. 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 (NUTTALL *et al*, 2006). Este novo conceito surgiu com experimentos de vacinação contra o *B. microplus* (WILLADSEN & 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, I *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 citosinas 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. Embora essas vacinas estejam disponíveis comercialmente, elas não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas, apesar

de reduzirem o número de aplicações o que ajuda a diminuir os prejuízos econômicos (WILLADSEN, 1996; DE LA FUENTE *et al.*, 1999; VALLE *et al.*, 2004).

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 codificante 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 aumenta 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 no sucesso reprodutivo do carrapato tem sido descritas (LEAL *et al.*, 2003).

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado na caracterização de diversas proteínas do *B. microplus* presentes no intestino, nos ovários, nas glândulas salivares, nos ovos e tecidos de larvas. A detecção de imunoglobulinas funcionais na hemolinfa do *B. microplus* suporta os estudos com proteínas de órgãos internos do carrapato para uso no controle das infestações por interferirem em funções fisiológicas não exclusivamente relacionadas ao sistema digestivo (DA SILVA VAZ Jr *et al.*, 1996).

A BYC (*Boophilus* *Yolk pro-Cathepsin*), uma aspártico protease isolada de ovos do *B. microplus* foi capaz de induzir resposta imune protetora em bovinos contra infestações de *B. microplus*. 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%. O cDNA da BYC foi clonado em dois vetores plasmidiais distintos para a expressão em *E. 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(1)). Experimentos de vacinação de

bovinos com BYC recombinante produzida em *E. coli* resultaram em um índice de proteção global de 25,24% quando os bovinos foram desafiados com 20.000 larvas infestantes de *B. microplus* (LEAL *et al.*, 2006(2)). A taxa de proteção induzida pela BYC nativa e pela BYC recombinante são insuficientes para permitir um controle eficiente do *B. 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).

Inibidores de tripsina (BmTIs) foram detectados em diferentes fases de desenvolvimento do *B. microplus*, indicando um possível papel na interação parasito-hospedeiro. Esses BmTIs foram usados como antígenos para a imunização de bovinos que foram desafiados com larvas de carrapato. Esses bovinos apresentaram redução de 67,9% no número total de carrapatos, 71,3% no peso total dos ovos e 69,5% no peso total das fêmeas ingurgitadas, quando comparados aos bovinos controles. A eficácia total da vacinação foi de 72,8% (ANDREOTTI *et al.*, 2002).

O potencial imunogênico da vitelina, 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 já avaliados imunologicamente aqui descritos, várias moléculas envolvidas em processos fisiológicos essenciais para o carrapato têm sido descritas por diversos grupos de pesquisa, o estudo dessas proteínas pode permitir a identificação de novos antígenos para vacinas.

1.5 Embriogênese e degradação dos componentes do vitelo

O desenvolvimento embriogênico do *B. 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 (CAMPOS *et al.*, 2006).

O rápido desenvolvimento observado no embrião desse carrapato requer um suporte energético prontamente disponível. Durante a oogênese dos animais ovíparos grandes quantidades de proteína, lipídeos e açúcares são estocados pelos oócitos em crescimento, constituindo a fonte de nutrientes para o desenvolvimento do embrião (CAMPOS *et al.*, 2006). A principal proteína do vitelo dos ovos de artrópodes é a vitelina (VT), uma fosfoglicolipoproteína 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 pelo oócitos e armazenada em estruturas denominadas grânulos de vitelo. Estas estruturas são grandes organelas semelhantes a lisossomos que armazenam, além do substrato (VT), a maquinaria necessária para a sua utilização (FAGOTTO, 1990; SAPPINGTON & RAIKHEL, 1998).

Várias enzimas envolvidas na degradação do vitelo 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). Estas enzimas precisam ser estritamente reguladas para assegurar que a degradação da VT ocorra em sincronia com o desenvolvimento do embrião (FIALHO *et al.*, 2005). 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. Um dos mecanismos melhor descrito para regular a proteólise da VT é a ativação das proteases pela acidificação dos grânulos de vitelo. Há diversas evidências mostrando que o pH é um regulador chave da degradação do vitelo. Em diversas espécies, tais como os carrapatos *B. microplus* (ABREU *et al.*, 2004) e *Ornithodoros maubata* (FAGOTTO, 1991), a barata *Blattella germanica* (LIU *et al.*, 1996), a rã *Xenopus*

laevis (FAGOTTO & MAXFIELD, 1994) e o mosquito *Aedes 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.

A BYC, já mencionada anteriormente, é a protease mais abundante dos ovos do carrapato bovino. Ela é sintetizada como um precursor de aspártico protease no corpo gorduroso e intestino, secretada para a hemolinfa e captada pelo oócito em crescimento sendo ativada por autoproteólise em condições ácidas (LOGULLO *et al.*, 1998). Sua participação na degradação da VT foi recentemente confirmada *in vitro*, demonstrando a importância dessa enzima no processo de embriogênese (ABREU *et al.*, 2004). 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 e caracterizada a partir de ovos de *B. microplus*. 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).

Muito pouco se sabe sobre os mecanismos que controlam a suscetibilidade da VT para o ataque proteolítico. Fialho e colaboradores (2002) sugeriram pela primeira vez que a defosforilação das proteínas do vitelo pode estar relacionada com sua utilização. Eles verificaram que a fertilização dos ovos do barbeiro *Rhodnius prolixus* ativa uma fosfatase ácida que se correlaciona com a defosforilação da VT e proteólise *in vivo* (FIALHO *et al.*, 2002). Corroborando com 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 e colaboradores (2006) analisando a correlação entre a proteólise e a fosforilação da VT no *B. 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 ion 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 (SILVEIRA *et al.*, 2006). Estes dados demonstram a importância do mecanismo de defosforilação na proteólise da VT, o processo bioquímico mais importante para o desenvolvimento do embrião.

1.6 O metabolismo do heme no *B. 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 (SCHMITT *et al.*, 1993; VICENT, 1989; ALF & MULLER, 1983). 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 em uma única refeição. Mosquitos e barbeiros triatomídeos ingerem de três a dez vezes seu próprio peso em sangue do seu hospedeiro vertebrado. No caso dos carrapatos duros, 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 (LARA *et al.*, 2005; GRAÇA-SOUZA *et al.*, 2006). 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 *Rhodnius 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 *Rhodnius prolixus* (GRAÇA-SOUZA *et al.*, 2006). No mosquito *Aedes 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 *Rhodnius 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 *B. 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 necessitou o 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 *B. microplus* ocorre no interior das células intestinais levando a liberação de grandes quantidades de heme dentro das células (LIYOU *et al.*, 1996; LARA *et al.*, 2005). 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 e colaboradores (2003) também descreveram uma nova via de detoxificação intracelular do heme no *B. microplus*. Eles observaram que a maioria do heme produzido pela degradação da hemoglobina é acumulado como um agregado não-cristalino - diferentemente a 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 *B. microplus*, realiza o transporte do heme da hemolinfa aos tecidos onde este será utilizado na síntese de hemeoproteínas (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 *B. microplus* parecem atuar também como proteínas ligadoras de heme, funcionando não somente como fonte de heme, mas também como moléculas antioxidantes. Logullo e colaboradores (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.

1.7 A proteína *Tick Heme-binding Aspartic Proteinase* (THAP)

A THAP foi isolada dos ovos do *B. microplus* e constitui o primeiro relato de uma aspártico protease capaz de ligar heme e ter sua atividade regulada por essa molécula (SORGINE *et al.*, 2000). A THAP apresentou atividade proteolítica sensível

a pepstatina contra substratos sintéticos e protéicos. 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. Como descrito anteriormente, a VT do *B. microplus* é uma hemeproteína. 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 *B. microplus*, e esta fonte energética é subsequentemente 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 protéico, aumento sua especificidade para hemeproteínas e fornecendo um possível mecanismo de regulação da degradação da VT no *B. microplus* (SORGINE *et al.*, 2000).

2 OBJETIVOS

Visto a importância da THAP para o desenvolvimento embrionário desse carrapato e visando um melhor entendimento das suas funções o presente trabalho consiste dos seguintes objetivos:

- a) restauração da seqüência codificadora codificante completa da THAP com a recuperação dos 12 nucleotídeos iniciais ausentes no cDNA inicialmente clonado;
- b) sub-clonagem do cDNA da THAP em vetor de expressão em procarioto;
- c) expressão em sistema heterólogo;
- d) purificação da THAP recombinante (rTHAP);
- e) caracterização enzimática da rTHAP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Soluções e tampões

3.1.1.1 Tampões para eletroforese

Tampões para gel de agarose:

- TAE 1X - 24,2 g de Tris-base, 5,71 ml de ácido acético glacial, 10 ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0) e água destilada q.s.p 1 litro;
- Tampão de amostra - azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%.

Tampões para gel de poliacrilamida:

- Tampão de corrida pH 8,3: Tris-base 0,3%, glicina anidra 1,44% e SDS 0,01% ajustar pH 8,3 e água destilada q.s.p 1 litro;
- Tampão de amostra para SDS-PAGE: Tris-HCl (pH 8,0) 62,5mM , SDS 2%, glicerol 10%, beta-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,001%, uréia 10 M;
- Coomassie-blue G-250: comassie G-250 0,1%, metanol 25%, ácido acético 5%;
- Solução de poliacrilamida: acrilamida 30% e bisacrilamida 0,8% em água destilada.

3.1.1.2 Tampões e soluções para Western-blot

- Tampão de transferência: NaHCO_3 13 mM, Metanol 20%, pH 9,9;
- Tampão PBS 1X: NaCl 150mM, NaH_2PO_4 25 mM, pH 7,5;
- Tampão de revelação fosfatase (TRF): Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM;
- Solução de bloqueio 5%: 5 g de leite Molico em 100 ml de água destilada;
- NBT: 0,05 g em 1 ml de DMF 70%
- BCIP: 0,05 g em DMF 100%
- Solução de Ponceau: ponceau S 2%, TCA 30%, ácido sulfossalicílico 30% em água destilada.

3.1.1.3 Soluções para extração de DNA plasmidial

- Solução I – Glicose 50mM, Tris-HCl (pH 8,0) 25mM, EDTA (pH 8,0) 10mM;
- Solução II – NaOH 0,2 N e SDS 1%;
- Solução III – 60 ml acetato de potássio 5M, 11,5 ml de ácido acético glacial, água destilada q.s.p 100 ml.

3.1.1.4 Tampões para cromatografia em resina Sepharose-Ni²⁺

- Tampão de ligação – Fosfato 20mM, NaCl 500mM, imidazol 60mM;
- Tampão de eluição 1 - Fosfato 20mM, NaCl 500mM, imidazol 80mM;
- Tampão de eluição 2 - Fosfato 20mM, NaCl 500mM, imidazol 120mM;
- Tampão de eluição 3 - Fosfato 20mM, NaCl 500mM, imidazol 480mM.

3.1.1.5 Tampão para clivagem com Enteroquinase

- Tris-HCl 500 mM pH 8,0, CaCl₂ 20 mM e Tween-20 0,1 %

3.1.1.6 Tampão para reação enzimática

- Acetato de sódio 200 mM pH 3,5

3.1.2 Gel de agarose e poliacrilamida

Gel de agarose 0,8%: 0,8g de agarose diluída em 100 ml de TAE 1X (item 3.1.1.1), brometo de etídeo 5µg/ml.

Gel de poliacrilamida desnaturante: gel de empilhamento (5%)- 1 ml de solução de poliacrilamida, 780 µl de Tris-HCl 1M (pH 6,8), 60 µl de SDS 10%, 4,124 ml de H₂O destilada, 30 µl de Persulfato de amônio 10%, 6 µl de TEMED; gel de separação (10%) - 3,333 ml de solução de poliacrilamida, 3,733 µl de Tris-HCl 1M (pH 8,8), 100 µl de SDS 10%, 2,773 ml de H₂O destilada, 50 µl de Persulfato de amônio 10%, 10 µl de TEMED.

3.1.3 Marcadores de massa molecular

- Marcador de massa molecular DNA Lambda *HindIII*: DNA de fago lambda *gt118* (Amersham Pharmacia Biotech) digerido com endonuclease de restrição *HindIII* (Amersham Pharmacia Biotech).
- Marcador de massa molecular pré-corado: Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

3.1.4 Meios e placas de cultura

- LB líquido: NaCl 0,5%, extrato de levedura 0,5% e triptona 1%, pH 7,5;
- LB sólido: LB líquido acrescido de 1,5% de agar bacteriológico;
- SOC: triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 2,5, MgCl₂ 10mM, glicose 20% na concentração final de 20mM.
- GYT: glicerol 10%, extrato de levedura 0,125% e Triptona 0,25%

Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada e autoclavados a 121 °C por 15 min e mantidos à temperatura ambiente até o uso.

- placas de cultura: LB sólido foi fundido, o antibiótico de interesse foi adicionado e o meio foi distribuído em placas de *Petri* estéreis sob fluxo laminar. Após a solidificação do meio, as placas foram acondicionadas a - 4 °C.

3.1.5 Antibióticos

- Ampicilina: 50 mg/ml (concentração de estoque); 100 µg/ml (concentração de uso);
 - Cloranfenicol: 34 mg/ml (concentração de estoque); 34 µg/ml (concentração de uso);
 - Tetraciclina: 5 mg/ml (concentração de estoque); 12,5 µg/ml (concentração de uso).
- Soluções preparadas em água destilada.

3.1.6 Enzimas

Todas as reações foram feitas de acordo com as especificações do fabricante.

- Endonuclease de Restrição: *BamHI* (Gibco), *PshAI* (Invitrogen), *PstI* (Invitrogen);
- DNA Polimerase: *Elongase* (Invitrogen);
- Enzima de ligação: *T4-DNA-ligase* (Invitrogen);
- Serino protease: *Enteroquinase* (Invitrogen);

3.1.7 Plasmídeo e Primers para clonagem

- Plasmídeo: O plasmídeo pET-43a (Novagen) foi utilizado como vetor de expressão e possui as seguintes características genotípicas: promotor T7, operador *lac*, seqüência de fusão N-terminal Nus-Tag™, seqüências internas His-Tag® e S-Tag™, sítios de clivagem para trombina e enteroquinase, múltiplos sítios de clonagem, *bla* (β-lactamase: Amp^r), *lacI* (repressor *lac*), origem de replicação ColE1, origem *f1*.

- Primers: iniciador 5' agaatttgcgctgcagtaggctggcagcacc

iniciador 3' aaaaaaaggatccctagaccgtggcaaac

3.1.8 Linhagens de *Escherichia coli*

Tabela I: Linhagens bacterianas utilizadas no trabalho

<i>Linhagem</i>	<i>Características</i>	<i>Marca</i>
XL1-BLUE MRF	Δ(<i>mcrA</i>)183, Δ(<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , F' [<i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Δ <i>M15</i> , Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene
BL21 Star (DE3)	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>rne131</i> , (DE3)	Invitrogen
BL21(DE3) pLysE	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3), pLysE, Cam ^R	Invitrogen
BL21(DE3) pLysS	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3), pLysS, Cam ^R	Invitrogen
Rosseta (DE3)	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lacY1</i> , (DE3), pRARE (Cam ^R)	Novagen
BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i>), <i>dcm+</i> , Tet ^R , <i>gal</i> , λ (DE3), <i>endA</i> , <i>Hte</i> , [<i>argU</i> , <i>ileY</i> , <i>leuW</i> , Cam ^R]	Stratagene
BL21-CodonPlus (DE3)-RP	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i>), <i>dcm+</i> , Tet ^R , <i>gal</i> , λ (DE3), <i>endA</i> , <i>Hte</i> , [<i>argU</i> , <i>proL</i> , Cam ^R]	Stratagene
BL21(DE3)pT-GroE	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3), pT-GroE (Cam ^R)	Yasukawa <i>et al</i> , 1995
BL21(DE3) pT-TRX	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3), pT-TRX (Cam ^R)	Yasukawa <i>et al</i> , 1995
C43 (DE3)	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , C43, (DE3)	Avidis

3.1.9 Inibidores de proteases

Tabela II: Inibidores de proteases

<i>Inibidor</i>	<i>Especificidade</i>	<i>Modo de ação</i>	<i>Concentração efetiva</i>	<i>Marca</i>
Antipapaína	Inibidor de papaína e tripsina	Reversível	1-100 µM	Sigma
E-64	Inibidor de papaína e outras cisteíno proteases como catepsina B e L	Irreversível	1-10 µM	Sigma
Leupeptina	Inibidor de serino e cisteíno proteases como tripsina, papaína, plasmina e catepsinas B	Irreversível	10-100 µM	Sigma
Pepstatina	Inibidor de aspártico proteases como pepsina, renina, catepsina D, quimosina e muitas proteases ácidas microbiais	Irreversível	1-10 µM	Sigma

(BEYNON & BOND, 1989)

3.1.10 Coluna de Cromatografia

- Cromatografia de afinidade: HiTrap™HP (5 X 1 ml) Sepharose-Ni²⁺ (Amersham Biosciences)

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação de células competentes

Células competentes para transformação por eletroporação (SAMBROOK *et al*, 1989): Uma colônia bacteriana de *E. coli* XL1-Blue MRF^r (item 3.1.8) isolada em placas de cultura foi pré-inoculada em 25 ml de LB líquido (item 3.1.4) contendo tetraciclina (item 3.1.5) e crescido por 16 h a 37 °C sob agitação. A partir deste pré-inóculo inoculou-se 500 ml de LB líquido sem antibiótico (proporção 1:20) que foi crescido sob agitação a 37 °C até atingir a DO_(600 nm) 0,4. A cultura foi incubada em banho de gelo por 15 a 30 min e centrifugada a 5.000 g por 15 min a 4 °C. O

precipitado foi ressuspensionado em 250 ml de H₂O e novamente centrifugado, sendo então ressuspensionado em 125 ml de glicerol 10% para nova centrifugação. Este foi então ressuspensionado em 10 ml de glicerol 10% e centrifugado. E por último, ressuspensionado em 1 ml de GYT (item 3.1.4). Alíquotas de 40 µl foram feitas, submergidas em nitrogênio líquido e armazenadas em -70 °C.

Células competentes para transformação por choque térmico (SAMBROOK *et al.*, 1989): Todas as demais linhagens bacterianas (item 3.1.8) foram preparadas segundo o seguinte protocolo. Uma única colônia bacteriana isolada em placas de cultura foi pré-inoculada em 3 ml de LB líquido e crescida por 16 h a 37 °C sob agitação. A partir deste pré-inóculo inoculou-se 100 ml de LB líquido sem antibiótico na proporção 1:100 que foi crescido sob agitação a 37 °C até atingir a D.O._(600 nm) 0,4-0,5. A cultura foi incubada em banho de gelo por 10 min e centrifugada a 5.000 g por 10 min a 4 °C. O precipitado foi suavemente ressuspensionado em 60 ml de CaCl₂ 20mM, MgCl₂ 80mM e novamente centrifugado. O precipitado foi então ressuspensionado em 2 ml de CaCl₂ 0,1M. 140 µl de DMSO foram adicionados e a suspensão de células foi incubada por 15 min no gelo. Mais 140 µl de DMSO foram acrescentados à suspensão que foi novamente incubada no gelo. Alíquotas de 100 µl foram feitas, submergidas em nitrogênio líquido e armazenadas em -70 °C.

3.2.2 Clonagem da THAP no vetor pET43a

O cDNA codificador da THAP foi previamente clonado por RT-PCR a partir de RNA total de ovário (SORGINE *et al.*; 2000) em vetor de clonagem pT7-Blue. Nesse trabalho novos primers foram projetados para clonagem no vetor de expressão pET43a (item 3.1.7) utilizando como enzimas de restrição *Bam*HI e *Psh*AI. A partir de 80 ng de DNA molde (pT7-Blue-THAP) foi realizada uma PCR com *Elongase*. As condições de reação estão descritas na tabela III. O produto de amplificação obtido foi então hidrolisado, juntamente com o vetor, com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Psh*AI. Para a ligação, inserto e vetor já digeridos foram purificados em uma coluna MicroSpin S-400 HR (Amersham Biosciences) e ligados com *T4*-DNA ligase numa

proporção inserto e vetor 3:1. A reação foi mantida a 16 °C por 18h originando o plasmídeo pET43a-THAP4aa.

Tabela III: Condições estabelecidas para a PCR

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo (min)</i>	
1	94	3	
2	94	0,5	
3	53,5	0,5	
4	68	2	
5	Voltar ao passo 2 32X		-
6	53,5	0,5	
7	68	5	

3.2.3 Transformação de células competentes por eletroporação

O plasmídeo resultante (pET43a-THAP4aa) foi transformado em células *E.coli* XL1-Blue MRF^r pelo método de eletroporação de acordo com SAMBROOK *et al* (1989). Em uma cubeta de eletroporação, foram misturados 40 µl de células competentes (item 3.2.1) e 2 µl da reação de ligação (item 3.2.2). Após um pulso elétrico de 25 µF (2500 V), 1 ml de meio SOC (item 3.1.4) foi adicionado as células e a suspensão foi distribuída em placas de meio de cultura LB (item 3.1.4) contendo ampicilina (item 3.1.5) para seleção das colônias bacterianas transformantes. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h. Os clones obtidos foram submetidos à extração de DNA plasmidial e a presença e integridade do cDNA da THAP foi confirmada pelo padrão de clivagem com enzimas de restrição (*Bam*HI e *Pst*II) visualizado em gel de agarose 0,8 %.

3.2.4 Extração de DNA plasmidial em pequena escala

Quatro colônias bacterianas transformantes obtidas (item 3.2.3) foram inoculados em 2 ml de LB contendo ampicilina e crescidas por 16 h a 37 °C sob agitação constante. A cultura foi centrifugada a 12.000 g por 1 min e o precipitado de células foi ressuspenso em 100 µl de Solução I (item 3.1.1.3) e incubado por 10

min no gelo. Foram adicionados 200 µl de solução II (item 3.1.1.3) homogenizando a suspensão por inversão do tubo de 5 a 6 vezes. 150 µl de Solução III (item 3.1.1.3) foram adicionados e a suspensão foi novamente homogeneizada por inversão do tubo que foi então, incubado por 20 min no gelo. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g por 5 min e o sobrenadante foi transferido para novos recipientes. Um volume de fenol-clorofórmio foi adicionado ao sobrenadante e centrifugado 12.000 g por 2 min. A fase superior da solução foi transferida para novos recipientes e adicionado 1 volume de etanol absoluto e 0,1 volume de acetato de sódio 3M. A solução foi incubada por 1 h a -20 °C e centrifugada a 12.000 g por 20 min a 4 °C. O precipitado foi lavado (sem ressuspender) com 1 ml de etanol 70% que foi descartado deixando o precipitado secar completamente. Para ressuspensão foram adicionados 50 µl de H₂O contendo 2 µg RNaseA. A suspensão foi incubada por 1 hora a 37 °C para a digestão do RNA.

3.2.5 Análise quantitativa e qualitativa do DNA plasmidial

A concentração e pureza do DNA plasmidial obtido de cada clone (item 3.2.4) foram determinadas por espectrofotometria pela relação entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm. Este foi então hidrolisado com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Pst*I para liberação do inserto correspondente a THAP. O produto das reações e o marcador de massa molecular DNA Lambda *Hind*III foram aplicados em gel de agarose 0,8% (item 3.1.2) juntamente com o tampão de amostra (item 3.1.1.1). O gel foi submetido à eletroforese em TAE 1X (item 3.1.1.1) por 20 min e os ácidos nucleicos foram visualizados pela exposição à luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos gerados na reação foi determinado pela comparação com o marcador de massa molecular.

3.2.6 Transformação de células competentes por choque térmico

Para a expressão da THAP recombinante (rTHAP-NusTag) o plasmídeo (pET43a-THAP4aa) foi transformado em 9 linhagens derivadas de *E. coli* BL21(DE3) (item 3.1.8) por choque térmico de acordo com SAMBROOK *et al* (1989). 50 ng de DNA plasmidial foram adicionados a 100 µl de células competentes de cada

linhagem (item 3.2.1) e incubados a 4 °C por 30 min. As células foram submetidas ao choque térmico a 42 °C por 2 min, seguido pela adição de 200 µl de LB líquido (item 3.1.4). Após incubação a 37 °C por 1 h, 100 µl da suspensão foram distribuídos em placas de meio de cultura LB contendo ampicilina para seleção das colônias bacterianas transformantes. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h.

3.2.7 Seleção de linhagens para a expressão da proteína recombinante

Para pré-seleção das linhagens produtoras da rTHAP-NusTag, uma única colônia de cada linhagem de células transformadas (item 3.2.6) foi inoculada em 1 ml de meio LB líquido contendo ampicilina e crescidas por 16 h a 37° C sob agitação constante. 160 µl dessa cultura foram usados para inocular 4 ml de LB que foram crescidos a 37° C sob agitação até atingirem uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) entre 0,7 e 0,8. Uma amostra de 2 ml foi retirada e o restante foi induzido com isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) numa concentração final de 1 mM e a cultura foi incubada a 37° C por 4 horas. A cultura de células foi centrifugada a 10,000 g por 10 min a 4° C e o precipitado de células foi ressuscitado em 300 µl de H₂O e 300 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE (item 3.1.1.1) e fervido por 5 min. 600 µg de proteínas de cada amostra, determinado por $DO_{280\text{ nm}}$, foram analisadas para a presença da rTHAP-NusTag por eletroforese em SDS-PAGE 10% (item 3.2.9) corado com Coomassie-blue G-250 (item 3.1.1.1) e Western-Blot (item 3.2.10). As linhagens positivas foram testadas para a expressão da rTHAP-NusTag na forma solúvel. Uma única colônia de cada linhagem positiva foi inoculada em 2,5 ml de meio LB líquido contendo ampicilina e crescida por 16 h a 37° C sob agitação constante. Duplicadas de 25 ml de LB foram inoculadas com 1 ml da cultura original de cada linhagem e crescidas a 37° C sob agitação até atingirem DO_{600} entre 0,7 e 0,8. Para indução foi utilizada a mesma concentração de IPTG. Uma das duplicadas foi incubada a 37° C e a outra a 23° C, ambas por 4 horas. A cultura de células foi centrifugada a 10,000 g por 10 min a 4° C e o precipitado de células foi ressuscitado em 2,5 ml de tampão PBS 1X (item 3.1.1.2). Para lise das células, as suspensões foram congeladas e descongeladas por 2 vezes e sonicadas em gelo. Frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação a 10,000 g por 10 min a 4° C. 400 µg de

proteínas de cada amostra, determinado por $DO_{280\text{ nm}}$, foram analisadas para a presença da rTHAP-NusTag por eletroforese em SDS-PAGE 10% (item 3.2.9) corado com Coomassie-blue G-250 (item 3.1.1.1) e Western-Blot (item 3.2.10).

3.2.8 Expressão da rTHAP-NusTag em maior escala

Uma colônia de *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformada com o plasmídeo pET43a-THAP4aa foi inoculada em 20 ml de LB líquido contendo ampicilina e crescida por 16 h a 37° C sob agitação constante. A suspensão de células foi centrifugada a 5.000 g por 5 min e o precipitado de células foi ressuspendido em 20 ml de meio fresco e inoculado em 500 ml de LB em frascos de 2 litros. Os frascos foram incubados a 37° C sob agitação até atingirem DO_{600} entre 0,7 e 0,8. Para indução, foi adicionado IPTG numa concentração final de 1 mM e a cultura foi incubada a 23° C por 4 horas. A cultura de células foi centrifugada e o precipitado foi ressuspendido em tampão de ligação (item 3.1.1.4). Para a lise das células a suspensão foi congelada e descongelada por 2 vezes e prensada em prensa Francesa. O lisado da cultura foi centrifugado a 10,000 g por 30 min e o sobrenadante foi usado para a purificação da proteína recombinante.

3.2.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Amostras dos lisados de células e da purificação da rTHAP-NusTag foram analisadas por SDS-PAGE 10% (item 3.1.2). As frações protéicas de interesse foram misturadas a 25% do volume de tampão de amostra para SDS-PAGE (item 3.1.1.1), fervidas por 5 min e aplicadas no gel. Como controle foi utilizado um marcador de massa molecular pré-corado (item 3.1.3). O gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida (item 3.1.1.1) com corrente de 10 mA e posteriormente corado com Coomassie Blue G-250 (item 3.1.1.1).

3.2.10 Western-blot

As frações protéicas de interesse foram submetidas a SDS-PAGE 10% (item 3.2.9) e eletro-transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (item 3.1.1.2) a 190 mA por 60 minutos. A transferência foi monitorada

corando-se a membrana com vermelho de Ponceau 0,5% (p/v) em PBS 1X (item 3.1.1.2) por 10 minutos. Posteriormente, a membrana foi descorada por lavagem com PBS 1X. A membrana foi então bloqueada com solução de bloqueio (item 3.1.1.2) por 60 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi incubada com soro de coelho imunizado com THAP nativa (SORGINE *et al.*, 2000) diluído 1:2500 na solução de bloqueio por 60 min e lavada 3 vezes por 10 min com solução de bloqueio. A membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:2500 em solução de bloqueio. A membrana foi então lavada 3 vezes por 10 min com PBS 1X e revelada com uma solução de NBT 0,03 % (p/v) e BCIP 0,015 % (p/v) em tampão de revelação fosfatase (item 3.1.12).

3.2.11 Purificação da rTHAP-NusTag

A fração protéica solúvel obtida na expressão (item 3.2.8) foi utilizada na purificação da rTHAP-NusTag por cromatografia de afinidade a histidina em resina Sepharose-Ni²⁺ (item 3.1.10). A amostra foi aplicada na coluna previamente equilibrada com 20 ml de tampão de equilíbrio (item 3.1.1.4). Em seguida, a coluna foi lavada com 50 ml de tampão de equilíbrio e eluída com 60 ml de um gradiente descontínuo de imidazol (80, 120, e 480 mM) (item 3.1.1.4). A fração contendo a rTHAP-NusTag foi identificada em SDS-PAGE 10 % (item 3.2.9) corado com Coomassie-blue G-250 (item 3.1.1.1) e Western-Blot (item 3.2.10).

3.2.12 Produção do controle de atividade enzimática (controle *E. coli*)

O plasmídeo pET43a sem inserto foi transformado por choque térmico (item 3.2.6) na mesma linhagem de *E. coli* escolhida para a expressão da rTHAP-NusTag, BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Uma colônia de células transformadas foi crescida, induzida para a expressão de proteínas e processadas conforme protocolo definido para a rTHAP-NusTag (item 3.2.8). A fração protéica solúvel foi purificada por cromatografia de afinidade (item 3.2.11) e a fração eluída na mesma condição que a rTHAP-NusTag foi utilizada como controle negativo nos ensaios de atividade enzimática.

3.2.13 Purificação da THAP nativa (nTHAP)

Conforme protocolo estabelecido por Sorgine e colaboradores (2000), 25 g de ovos de carrapato de 1 dia pós-postura foram macerados em 25 ml de Tris-HCl 20 mM pH 8,4. O macerado foi centrifugado e o sobrenadante foi aplicado em coluna DEAE-Sepharose. Esta foi eluída com gradiente descontínuo de NaCl 75, 150 e 400 mM. A nTHAP foi identificada na fração eluída com 75 mM de NaCl por SDS-PAGE.

3.2.14 Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi estimada por espectrometria a 280nm, considerando que a DO_{280nm} igual a 1 corresponde a 1 mg/ml de proteína ou pelo método de Bradford (1976) usando Albumina Sérica Bovina como padrão.

3.2.15 Clivagem da proteína recombinante

Uma fração parcialmente purificada de rTHAP-NusTag foi dialisada contra tampão de clivagem (item 3.1.1.5). Para a remoção da NusTag com liberação da proteína recombinante rTHAP, 1 unidade de *Enteroquinase* foi utilizada para a hidrólise de cada 20 µg de rTHAP-NusTag. A reação foi incubada por 16 horas a 37°C.

3.2.16 Ensaios enzimáticos com substrato sintético

Para avaliar a atividade enzimática, 15 µg de rTHAP clivada (item 3.2.15), 15 µg de THAP nativa (nTHAP) purificada de ovos (item 3.2.13) e 15 µg de controle *E. coli* (item 3.2.12); foram incubados, separadamente, em 100µl de tampão de reação (item 3.1.1.6) a 37° C por 15 min (condições estabelecidas para atividade da THAP nativa). As reações foram iniciadas com a adição de 5,1 µM de substrato sintético fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp. A atividade enzimática foi monitorada por 1 hora em fluorímetro F-MAX (320-430 nm). Os ensaios foram repetidos 4 vezes utilizando preparações diferentes de rTHAP.

3.2.17 Efeito de inibidores de proteases sobre a atividade da rTHAP

rTHAP previamente clivada (15 µg) foi incubada separadamente, com 10 µM de pepstatina A, 10 µM de E-64, 100 µM de leupeptina e 100 µM de antipaína (item 3.1.7) em 100µl de tampão de reação (item 3.1.1.6) a 37° C por 15 min. A reação foi iniciada com a adição de 5,1 µM de substrato sintético fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp. A atividade enzimática foi monitorada por 1 hora em fluorímetro F-MAX (320-430 nm). Os ensaios foram repetidos 4 vezes utilizando preparações diferentes de rTHAP.

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem da THAP

Comparando a seqüência parcial de aminoácidos da THAP (SORGINE *et al.*, 2000) com o cDNA inicialmente clonado em pT7-Blue, verificou-se que este não continha os códons correspondentes aos 4 resíduos de aminoácidos N-terminais da proteína. Assim, novos *primers* foram projetados incluindo uma seqüência para a recuperação dos aminoácidos correspondentes. Os nucleotídeos adicionados foram baseados na seqüência de aminoácidos da proteína e na freqüência de uso de códons (*codon bias*) de *E. coli* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Sítios para as enzimas de restrição *PshAI* e *BamHI* também foram colocados nos primers para permitir a clonagem no vetor pET43a. O amplicon de 1065 pb obtido na PCR foi clonado no vetor originando o plasmídeo pET43a- THAP4aa com uma região aberta de leitura (ORF) de 2703 pb. Esta ORF inclui seqüência codificadora da proteína de fusão Nus-Tag™, seqüências para His-Tag® (6 histidinas) e S-Tag™, sítios de clivagem para trombina e enteroquinase e a seqüência codificadora da rTHAP (figura 2). A massa molecular estimada para a proteína é de 98,64 kDa.

A hidrólise do DNA plasmidial com as endonucleases *BamHI* e *PstI* confirmou a presença de um inserto com tamanho esperado (1065 pb) para 3 dos 4 clones obtidos (figura 3). A enzima *PstI* possui sítio de clivagem próximo ao final da porção 5' do inserto (figura 2), o que corrobora para a confirmação da clonagem e recuperação dos 12 nucleotídeos da extremidade 5' da seqüência codificadora da rTHAP.

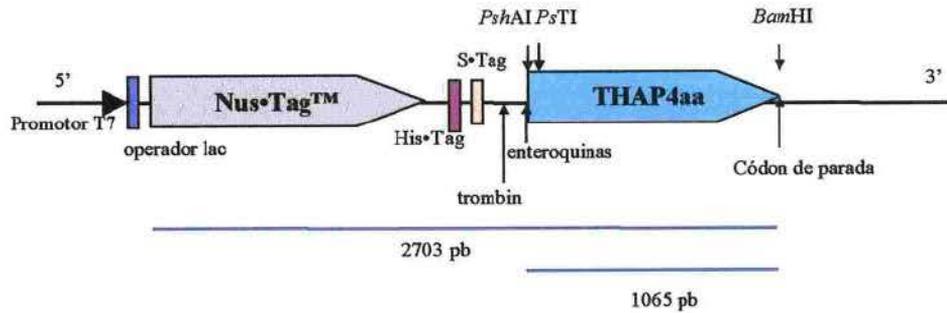


Figura 2 - Diagrama esquemático da ORF do vetor pET43a-THAP4aa. A seqüência codificadora da THAP com 1065 pb foi clonada no vetor pET43a entre os sítios de clivagem das enzimas *PshAI* e *BamHI* originando uma ORF de 2703 pb.

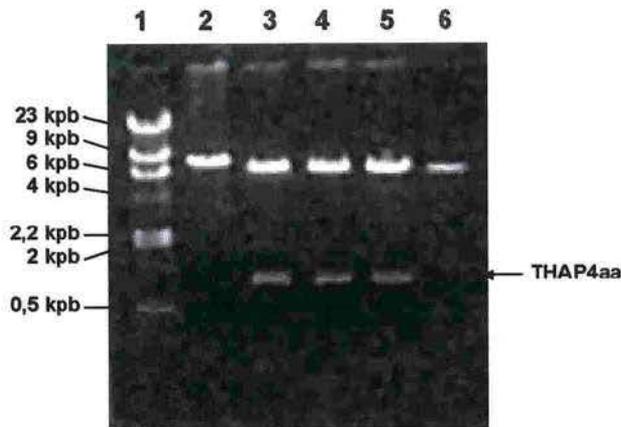


Figura 3 - Análise dos clones obtidos pelo padrão de hidrolise com *BamHI* e *PstI* em gel de agarose 0,8%. O DNA plasmidial de clones obtidos na transformação foi extraído e hidrolisado com enzimas de restrição. O produto das reações foi aplicado em gel de agarose 0,8%. 1- marcador de massa molecular DNA Lambda *HindIII*, 2- clone 1, 3- clone 2, 4- clone 3, 5- clone 4 e 6- DNA de pET43.a. A seta indica o fragmento correspondente a THAP4aa liberado pela hidrolise.

4.2 Expressão da proteína recombinante

Novas linhagens derivadas de *E.coli* BL21(DE3) foram testadas para a expressão da rTHAP-NusTag. Destas, quatro expressam a proteína: *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3) RIL, BL21-CodonPlus(DE3)RP, BL21 Star(DE3) e BL21(DE3) pT-GroE (figura 4). A indução a 37° C e 1 mM de IPTG produziu pouca proteína solúvel, a maior parte foi detectada no precipitado das células lisadas (dados não mostrados). Para melhorar a expressão e solubilização da rTHAP-NusTag, foi avaliada a indução a 23° C. Por SDS-PAGE observou-se que a indução a 23° C e 1 mM de IPTG produz mais proteína solúvel quando comparado a 37° C (figura 5). Esses dados foram confirmados por Western-blot sondado com soro policlonal de coelho imunizado com nTHAP (dados não mostrados). A massa molecular aparente da rTHAP-NusTag foi de aproximadamente 98 kDa (figura 4 e 5). A linhagem *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3) RIL aparentou expressar a rTHAP-NusTag na forma solúvel em maior quantidade quando induzida a 23° C e 1 mM de IPTG (figura 5) sendo por isso escolhida para a expressão da proteína em maior escala para a purificação.

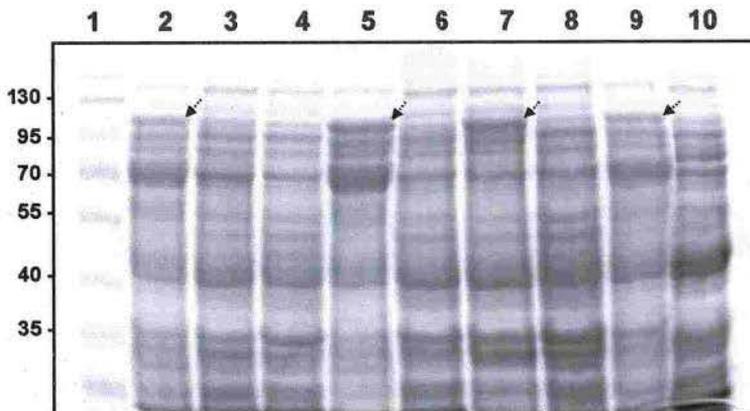


Figura 4 - SDS-PAGE (10%) do extrato total das linhagens de *E.coli* BL21 (DE3) testadas para a expressão da rTHAP-NusTag corado com Coomassie blue G-250. Nove linhagens de *E.coli* BL21 (DE3) foram testadas para a expressão da rTHAP-NusTag a 37° C e 1 mM de IPTG. A cultura foi centrifugada e o precipitado de células foi preparado conforme descrito em materiais e métodos. Igual quantidade de proteína (600 µg) foi aplicada no gel

para cada amostra. 1- Marcador de massa molecular para SDS-PAGE 2- *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE, 3- *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, 4- *E. coli* BL21 (DE3) pLysE, 5- *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) RIL, 6- *E. coli* BL21 (DE3) pT-TRX, 7- *E. coli* BL21 (DE3) Star, 8- *E. coli* BL21 (DE3) Rosseta, 9- *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) RP, 10- *E. coli* BL21 C43. As setas indicam a rTHAP-NusTag com aproximadamente 98 kDa.

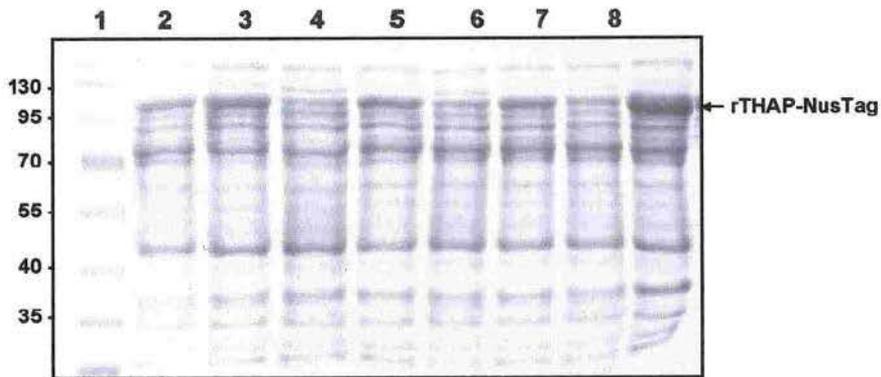


Figura 5- SDS-PAGE (10%) da expressão da rTHAP-NusTag a 37° C e 23° C corado com Coomassie blue G-250. A expressão da rTHAP-NusTag na forma solúvel foi analisada nas 4 linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) que produzem a proteína sob duas condições de temperatura diferentes. A cultura de células foi centrifugada e o precipitado de células foi lisado conforme descrito em materiais e métodos. Igual quantidade de proteína (400 µg) do sobrenadante foi aplicada no gel para cada amostra. 1- Marcador de massa molecular para SDS-PAGE 2- *E. coli* BL21 (DE3) Star induzido 37° C, 3- Star induzido 23° C, 4- *E. coli* BL21 (DE3) pT-GROE 37° C, 5- pT-GROE 23° C, 6- *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) RP 37° C, 7- RP 23° C, 8- *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) RIL 37° C, 9- RIL 23° C.

4.3 Purificação da proteína recombinante

Devido a presença de 6 resíduos de histidina na proteína recombinante (His-Tag), uma cromatografia de afinidade a histidina (Sephacrose-Ni²⁺) foi escolhida para a purificação da rTHAP-NusTag. Por meio de gradiente de eluição descontínuo foi obtido uma fração concentrada de proteína quando da eluição com 480 mM de

imidazol (figura 6). Essa fração foi analisada por SDS-PAGE 10% e a presença da rTHAP-NusTag foi confirmada em Western-blot (figura 7). A purificação da rTHAP-NusTag do sobrenadante do lisado das células resultou num rendimento de aproximadamente 6 mg de proteína por litro de cultura de células.

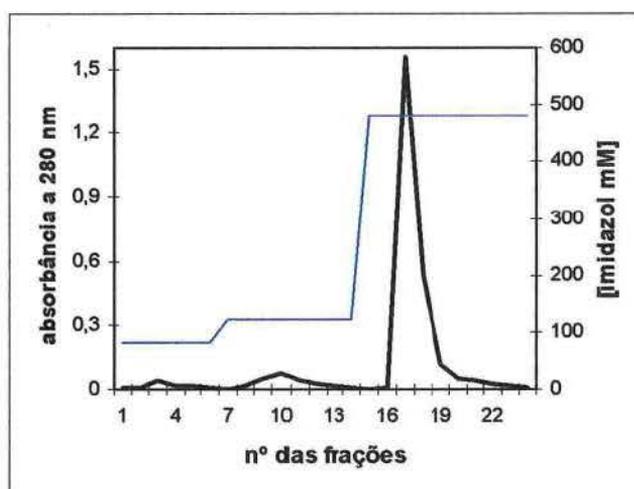


Figura 6- Cromatografia da rTHAP-NusTag em resina de afinidade (sepharose-Ni²⁺). A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio e após a aplicação da amostra, eluída com gradiente descontínuo de imidazol. (—) concentração de imidazol, (—) absorbância a 280nm.

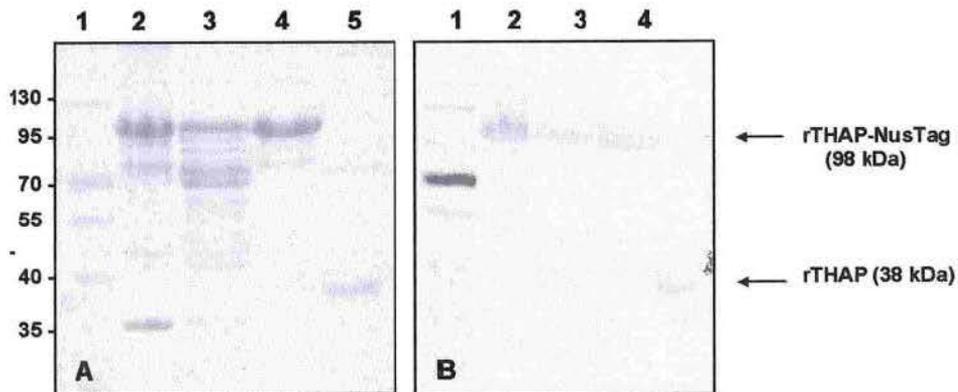


Figura 7- SDS-PAGE (10%) (A) e Western blot (B) das etapas de purificação e hidrólise com enteroquinase da rTHAP-NusTag. Frações solúvel e insolúvel da expressão da rTHAP-NusTag na linhagem bacteriana selecionada foram avaliadas para a presença da proteína. rTHAP-NusTag purificada a partir da fração solúvel da expressão foi hidrolisada com enteroquinase para a remoção da proteína de fusão 1- Marcador de massa molecular para SDS-PAGE, 2- fração insolúvel da expressão da rTHAP-NusTag em *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) RIL, 3- sobrenadante da expressão, 4- fração purificada em coluna de afinidade, 5- rTHAP após clivagem com enteroquinase.

4.4 Atividade enzimática da rTHAP

Após a remoção da proteína de fusão (NusTag), a atividade enzimática da rTHAP e dos controles (nTHAP e controle *E.coli*) foi mensurada pela hidrólise de substrato sintético fluorogênico Abz-AIAFFSRQ-EDDnp baseado na seqüência alvo de enzimas tais como pepsina e aspártico proteases relacionadas (tabela IV). A atividade específica da rTHAP foi de 2,267 RFU/min/mg de proteína. nTHAP purificada de ovos, como descrito em materiais e métodos, foi usado como um controle positivo e apresentou atividade específica de 4,930 RFU/min/mg de proteína, maior que o encontrado para a rTHAP. O controle *E.coli* produzido nas mesmas condições da rTHAP-NusTag, conforme descrito em materiais e métodos, foi utilizado para mensurar a atividade de possíveis contaminantes. Este controle apresentou atividade específica de 1,267 RFU/min/mg de proteína, no entanto, esta

atividade não foi inibida por pepstatina A. Na presença deste mesmo inibidor a atividade relativa da rTHAP foi de apenas 32,33 %, comparável a atividade relativa da nTHAP (29,74%).

Tabela IV - Atividade da rTHAP e dos controles (nTHAP e controle *E.coli*) sobre substrato sintético Abz-AIAFFSRQ-EDDnp na ausência ou presença de pepstatina A. As reações foram iniciadas pela adição do substrato (5,1 μ M) e a atividade enzimática foi monitorada por 1 hora em fluorímetro F-MAX (320-430 nm). Os resultados representam a média de 4 ensaios independentes.

Reação	Atividade específica (RFU/min/mg)	Atividade relativa (% do controle)
rTHAP	2,267	100
rTHAP + pepstatina (10 μM)	0,733	32,33
nTHAP	4,930	100
nTHAP + pepstatina	1,466	29,74
Controle <i>E.coli</i>	1,267	100
Controle <i>E.coli</i> + pepstatina	1,2	94,71

4.5 Efeito de inibidores de proteases sobre a atividade da rTHAP

O efeito de diferentes inibidores de proteases, tais como E-64 (inibidor de catepsinas B e L), leupeptina (inibidor de serino e cisteíno proteinases), antipaina (inibidor de papaína e tripsina) e pepstatina A (inibidor de aspártico proteinase) sobre a atividade enzimática da rTHAP foi testado. Somente pepstatina A foi capaz de reduzir a atividade da rTHAP sobre substrato sintético, E-64, leupeptina e antipaina não apresentaram efeito detectável (tabela IV e V).

Tabela V - Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica da rTHAP sobre substrato sintético Abz-AIAFFSRQ-EDDnp. Quantidade apropriada de inibidor foi adicionada as reações que foram iniciadas pela adição do substrato (5,1 μM). A atividade enzimática foi monitorada por 1 hora em fluorímetro F-MAX (320-430 nm). Os resultados representam a média de 4 ensaios independentes.

<i>Inibidor de protease</i>	<i>Atividade relativa (% do controle)</i>
Sem inibidor	100
Pepstatina A (10 μM)	32,33
E-64 (10 μM)	103,47
leupeptina (100μM)	136,10
antipaina (100μM)	135,42

5 DISCUSSÃO

A dependência de heme na dieta do carrapato *B. microplus* requer mecanismos seguros de absorção, transporte e reciclagem do heme de forma a evitar o estresse oxidativo gerado pela liberação dessa molécula. Logullo e colaboradores (2002) mostraram que somente um terço do total de vitelinas dos ovos é degradada durante a embriogênese desse carrapato, sugerindo que este é um processo lento e estritamente controlado, sendo a protólise regulada das hemeproteínas do vitelo uma adaptação importante para a espécie. A caracterização de uma aspártico protease ligadora de heme, a THAP, nos ovos desse carrapato suportam a importância desse mecanismo para a sobrevivência e desenvolvimento do embrião.

A maioria das proteínas, enzimas em especial, são encontradas em pequenas quantidades 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.

A bactéria *E. coli* é o hospedeiro mais frequentemente usado por ser um organismo de genética relativamente simples, bem caracterizado, com alta taxa de crescimento e com um grande número de ferramentas moleculares disponíveis (SORENSEN & MORTENSEN, 2005). No entanto, a *E. coli* é incapaz de realizar modificações pós-traducionais como glicosilações, algumas vezes essenciais para a atividade biológica da proteína alvo (TERPE, 2006). Outra desvantagem da expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* é que estas são frequentemente expressadas como agregados insolúveis conhecidos como corpúsculos de inclusão (VILLAVERDE & CARRIO, 2003). Estes agregados são em geral formados por proteínas incorretamente dobradas e assim biologicamente inativas. Isto pode ser devido a taxa de tradução da proteína exógena exceder a capacidade da célula de dobrar as novas proteínas sintetizadas em suas estruturas tridimensionais corretas, pelas características da própria proteína alvo que podem aumentar sua propensão a

agregação e/ou pela incompatibilidade de códons usados (KIEFHABER *et al.*, 1991; SORENSEN & MORTENSEN, 2005).

Proteínas expressadas em corpúsculo de inclusão podem ser recuperadas e purificadas pela solubilização com agentes desnaturantes tais como uréia, hidrocloreto de guanidina e *N*-lauroil sarcosina (LEAL *et al.*, 2006(1); SINGH & PANDA, 2005). No entanto, as condições de solubilização precisam ser padronizadas para cada proteína e, além disso, o rendimento pode ser baixo e o procedimento pode afetar a integridade da proteína alvo (HARRISON, 2000). Em adição, a purificação de proteínas expressadas na forma solúvel é mais barata e consome menos tempo. 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 & MORTENSEN, 2005). Um dos métodos de maior sucesso nos últimos anos na produção de proteínas heterólogas solúveis em *E. coli* é a adição de proteínas de fusão, especialmente para aspártico proteases que normalmente são expressadas em corpúsculo de inclusão (SACHDEV & CHIRGWIN, 1998; LEAL *et al.*, 2006(1); XIAO *et al.*, 2006).

Exemplos de proteínas que têm sido também utilizadas como proteínas de fusão para aumentar a solubilidade de proteínas expressadas em *E. coli* incluem a tioredoxina (TRX), a proteína ligadora de maltose (MBP) e a glutatona S-transferase (GST) (HARRISON, 2000; SACHDEV & CHIRGWIN, 1998; LEAL *et al.*, 2006(1); XIAO *et al.*, 2006). Baseado nas suas características favoráveis de solubilidade citoplasmática, outras proteínas de *E. coli* têm sido usadas para aumentar a solubilidade de proteínas heterólogas quando fusionadas. Estudos comparativos mostram que os melhores resultados na produção de proteínas heterólogas solúveis são obtidos pela fusão com a proteína NusA de *E. coli* (DAVIS *et al.*, 1991; MARCO *et al.*, 2004; LI & HE, 2006).

Dadas às justificativas, o vetor pET43a, comercialmente disponível (Novagen), foi utilizado para a expressão da proteína recombinante. Este vetor é designado para a clonagem e expressão da proteína de interesse fusionada a proteína Nus-Tag™ e com resíduos de histidina na porção N- terminal. Além de induzir um alto nível de

expressão pela presença de promotor T7 estas características aumentam a solubilidade da proteína e facilitam sua purificação através de cromatografia de afinidade. O polipeptídeo produzido também apresenta um sítio de clivagem entre a NusTag e a proteína alvo para a separação destas pela hidrólise por enteroquinase. A expressão da proteína recombinante (rTHAP-NusTag) foi obtida em quatro linhagens derivadas de *E.coli* BL21 (DE3) testadas (figura 4). Em todas elas foi possível observar a expressão da rTHAP-NusTag na forma solúvel, no entanto, a indução a 23 °C aumentou a solubilização da proteína (figura 5). A redução da temperatura de indução tem sido descrito como um fator importante para diminuir a agregação de proteínas recombinantes (SCHEIN & 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 & MORTENSEN, 2005). Mesmo com a redução da temperatura a rTHAP-NusTag foi ainda encontrada em corpúsculos de inclusão nas quatro linhagens (dados não mostrados) sugerindo que não houve redução na taxa de síntese da proteína. No entanto, maior quantidade de proteína foi corretamente dobrada possivelmente pelo aumento da expressão ou atividade de chaperonas moleculares favorecido pela redução da temperatura. Alguns trabalhos que usam esse sistema têm descrito a expressão de proteínas recombinantes quase completamente na forma solúvel. Davis e colaboradores (1991) analisaram a expressão das proteínas interleucina-3 humana, interferon-gama humano e hormônio de crescimento bovino fusionados a NusA e obtiveram índices de proteína recombinante solúvel de 97%, 87% e 89%, respectivamente. Por outro lado, outros trabalhos encontram resultados mais semelhantes aos nossos. Douette e colaboradores (2005) fusionaram a UCP1, uma proteína de membrana mitocondrial a MBP e a NusA e obtiveram 40% de proteína solúvel somente quando a temperatura de indução foi reduzida a 16 °C nos dois casos.

A rTHAP-NusTag presente na fração solúvel do lisado de células foi parcialmente purificada por cromatografia de afinidade a histidina, sendo reconhecida por soro policlonal contra a enzima nativa (figura 7). Após a remoção da proteína de fusão a rTHAP apresentou atividade sobre substrato sintético quando incubada em tampão acetato de sódio 200 mM pH 3,5 (Tabela IV). Essa atividade foi inibida pela adição de pepstatina A, mas não por outros inibidores de proteases (tabela IV e V), o que confirma os resultados previamente obtidos para a nTHAP (SORGINE *et al.*, 2000). No entanto, a atividade enzimática específica da rTHAP é menor que a encontrada para a nTHAP (tabela IV), sugerindo que a enzima recombinante foi corretamente dobrada no citoplasma da bactéria mas que algum processamento pós-traducional, tal como glicosilação, que não ocorre em *E. coli* seja necessário para o funcionamento da mesma. Essa discrepância pode também ser resultado das diferenças no processamento da rTHAP comparada a enzima nativa. A reação de remoção da proteína de fusão por ação da enteroquinase que ocorre a 37 °C por 16 h pode estar inativando a enzima recombinante. Ainda assim, esses dados sugerem que a enzima recombinante produzida em *E. coli* é similar à enzima nativa em imunoreatividade e atividade hidrolítica contra substrato.

O sucesso da expressão da rTHAP ativa em *E.coli* elimina a necessidade de grandes quantidades de fontes naturais (ovos) para sua purificação e oferece uma vantagem para produção e purificação dessa enzima em larga escala o que pode acelerar investigações adicionais sobre sua atividade enzimática e sobre a estrutura funcional desta enzima, um objetivo bastante interessante já que a THAP é a primeira protease descrita que é regulada por heme. Como descrito anteriormente, a degradação das vitelinas nos ovos é um processo lento e extremamente controlado e se a atividade das enzimas proteolíticas que realizam este processo não fosse estritamente controlada, muito provavelmente as vitelinas seriam degradadas mais rapidamente do que de fato é observado *in vitro*. Isto pode justificar a baixa atividade da rTHAP observada em nosso trabalho e da nTHAP como já descrito por Sorgine e colaboradores (2000). Outra aspártico protease envolvida com a degradação das vitelinas, a BYC, também apresentou lenta taxa de digestão enzimática de substratos

naturais e sintéticos *in vitro*. O mesmo foi observado para a proteína recombinante (Nascimento, M.C.; informação pessoal).

A produção de proteínas recombinantes em sistema heterólogo é também um processo chave para o desenvolvimento de uma vacina para o eficiente controle do *B. microplus*, objetivo central do nosso trabalho. Assim, a expressão da proteína recombinante em *E. coli* também prove uma valiosa fonte de THAP, que pode ser um potencial candidato para uma vacina.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.; *et al.* **Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cthepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34: 443-449, 2004.

AFT, R.L. & MUELLER, G.C. **Hemin-mediated DNA strand scission.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 258: 12069-12072, 1983.

ALVES-BRANCO, F. P.; ECHEVARRIA, F. A. M.; SIQUEIRA, A. S. **Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*.** *Comunicado técnico da EMBRAPA*, v. 1: 1-4, 1983.

ANDREOTTI, R.; *et al.* **BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick.** *International Immunopharmacology*, v. 2: 557-563, 2002.

BARRIGA, O. O. **Evidence and mechanisms of immunosuppression in tick infestations.** *Genetic Analysis*, v. 15: 139-142, 1999.

BRAZ, G.; *et al.* **A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*.** *Current Biology*, v. 9: 703-706, 1999.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytic Biochemistry*, v. 7: 248-254, 1976.

BEYNON, R. J. & BOND, J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach.** 2nd Edition. USA: IRL Press, 1990.

BRUM, J. G. W. **Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei*: etiopatogenia e sazonalidade.** Tese (Doutor em ciências). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1988.

CAMPOS, E.; *et al.* **Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development.** *Veterinary Parasitology*, v. 138: 349-357, 2006.

CANAL, C.W.; *et al.* **Changing patterns of vitellin-related peptides during development of the cattle tick *Boophilus microplus*.** *Experimental Appl. Acarology*, v. 19(6): 325-336, 1995.

CHAGAS, A. C. S.; *et al.* **O. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* ssp. em *Boophilus microplus*.** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39: 247-253, 2002.

CHO, W.L.; *et al.* **Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor.** *Journal of biological Chemistry*, v. 274: 13311-13321, 1999.

CNPC, Conselho Nacional da Pecuária de corte. **Balanço da Pecuária Bovídea de corte- 1994 a 2005.** [online] Disponível na internet via WWW. URL: <http://www.abiec.com.br/estatisticas/14.pdf>. Arquivo capturado em 14 de abril de 2006.

CORDOVÉS. C.O. **Carrapato: controle ou erradicação.** Alegrete: Gralha, 1996.

DA COSTA, G. L.; *et al.* **Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil.** *Mycopathologia*, v. 154: 207- 209, 2002.

DA SILVA VAZ JR, I.; *et al.* **Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph.** *Veterinary Parasitology*, v. 62: 155-160, 1996.

DA SILVA VAZ JR, I.; *et al.* **Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 66: 331-341, 1998.

DA SILVA VAZ JR, I.; *et al.* **Vacina contra o carrapato.** *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 18-22, 2002.

DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; SNYDER, D. E. **Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle.** *Veterinary Parasitology*, v. 99: 41- 52, 2001.

DAVIS, G.D.; *et al.* **New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*.** *Biotechnology*, v. 9(1): 47-52, 1991.

DE LA FUENTE, J.; *et al.* **Vaccination against ticks (*Boophilus* spp): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac.** *Genetic Analysis Biomolecular Engineering*, v. 15: 143-148, 1999.

DE ROSE, R.; *et al.* **Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 71: 151-160, 1999.

DETERDING, L. J.; *et al.* **Identification of free radicals on hemoglobin from its selfperoxidation using mass spectrometry and immuno-spin trapping: observation of a histidinyl radical.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 279: 11600-11607, 2004.

DOUETTE, P.; *et al* **Escherichia coli fusion carrier proteins act as solubilizing agents for recombinant uncoupling protein 1 through interactions with GroEL.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 333: 686–693, 2005.

ELDER, J. K.; *et al*. **A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistant cattle and pasture spelling.** *Australian Veterinary journal*, v. 56: 219-223, 1980.

FAGOTTO, F. **Yolk degradation in ticks eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres.** *Archive Insect Biochemistry and Physiology*, v. 14(4): 217-235, 1990.

FAGOTTO, F. **Yolk degradation in ticks eggs: III. Developmentally regulated acidification of the yolk spheres.** *Development Growth and Differentiation*, v. 33:57-66, 1991.

FAGOTTO, F.; MAXFIELD, F. R. **Changes in yolk platelet pH during *Xenopus laevis* development correlate with yolk utilization.** *Journal of Cell Science*, v. 107: 3325-3337, 1994.

FARIAS, N. A. R.; GONZALES, J. C.; SAIBRO, J. C. **Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 21: 1313-1320, 1986.

FERNANDES, F. F.; *et al*. **Larvicidal potential of *sapindus saponaria* to control the cattle tick *Boophilus microplus*.** *Pesquisa agropecuária brasileira*, v. 40: 1243-1245, 2005.

FIALHO, E.; *et al*. **Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32: 871-880, 2002.

FIALHO, E.; *et al.* **Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 462: 246-253, 2005.

FRAZZON, A. P.; *et al.* **In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*.** *Veterinary Parasitology*, v. 94: 117-125, 2000.

GEORGE, J.E.; POUND, J.M.; DAVEY, R.B. **Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides.** *Parasitology*, v. 129: S353-S366, 2004.

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/publicações/divulga/GCD42.html>. Arquivo capturado em 14 de abril de 2006.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi.** 2ed. Porto Alegre: Edição do autor, 1995.

GRAÇA-SOUZA, A.V.; *et al.* **Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 26: 322-335, 2006.

HARRISON, R. **Expression of soluble heterologous proteins via fusion with NusA protein.** *Novagen in Novation Newsletter*, junho: 4-7, 2000.

HORN, S. C., ARTECHE, C.C.P. **Situação parasitária da pecuária no Brasil.** *A Hora Veterinária*, v. 23: 12-32, 1985.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 1-35, 2004. [online] Disponível na internet via WWW. URL: <http://www.ibge.gov.br>. Arquivo capturado em 14 de abril de 2006.

KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N.; OUNA, E. A. **Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae***. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 67: 15-20, 1996.

KIEFHABER, T.; *et al.* **Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation**. *Biotechnology*, v. 9: 825-829, 1991.

KOCAN, K. M. **Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle**. *Veterinary Parasitology*, v. 57: 121-151, 1995.

LARA, F.L.; *et al.* **A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome**. *The Journal of Experimental Biology*, v. 206: 1707-1715, 2003.

LARA, F.A.; *et al.* **Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus***. *The Journal of Experimental Biology*, v. 208: 3093-3101, 2005.

LEAL, A. T.; FREITAS, D.; DA SILVA VAZ JR, I; **Perspectivas para o controle do carrapato bovino**. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31 (1): 01-11, 2003.

LEAL, A.L.; *et al.* **Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies**. *Protein Expression and Purification*, v. 45: 107-114, 2006 (1).

LEAL, A.L.; *et al.* Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 114: 341-345, 2006 (2).

LI, M.; HE, S. Purification and characterization of recombinant human interleukin-29 expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, v. 122: 334-340, 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. *Journal of Biological Chemistry*. V. 271: 33344-33351, 1996.

LIYOU, N.; *et al.* Endocytosis by digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*: regulation by protein Kinase C. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 26(2): 147-154, 1996.

LOGULLO, C.; *et al.* Isolation of na aspartic proteinase precursor from the egg of the hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*, v. 116: 525-532, 1998.

LOGULLO, C.; *et al.* Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect biochemistry and Molecular Biology*, v. 32: 1805-11, 2002.

MANZUR M.J.; *et al.* Production of recombinant enzymes of wide use for research. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 9(3): 291-296, 2006.

MARCO, V.; *et al.* The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 322: 766-771, 2004.

MAYA-MONTEIRO, C.M.; *et al.* **HeLp, a Heme Lipoprotein from the Hemolymph of the Cattle Tick, *Boophilus microplus*.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275: 36584-36589, 2000.

MAYA-MONTEIRO, C.M.; *et al.* **HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34: 81-87, 2004.

McCOSKER, P.L. **The global importance of babesiosis.** In: RISTIC, M. & KREIR, J.P. (Eds.) *Babesiosis*. New York: Academic Press, 1981.

MIROUX, B. & WALKER, J.E. **Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels.** *Journal of Molecular Biology*, v. 260:289-298, 1996.

NAGAR, S. K. **On the significance of the duration of preoviposition and oviposition periods in ixodid ticks.** *Acarology*, v. 10: 621-629, 1968.

NARI, A. **Strategies for control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America.** *Veterinary Parasitology*, v. 57: 153-165, 1995.

NORTON, G.A.; SUTHERST, R. W.; MAYWALD, G. F. **A framework for integrating control methods against the cattle tick, *Boophilus microplus*, in Australia.** *Journal of Applied Ecology*, v. 20: 489-505, 1983.

NUTTALL, P. A.; *et al.* **Exposed and Concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases.** *Parasite Immunology*, v. 28: 155-163, 2006.

OLIVEIRA, G. P.; *et al.* **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.; *et al.* **Haem detoxification by an insect.** *Nature*, v. 400: 517-518, 1999.

OLIVEIRA, M. F.; *et al.* **Haemozoin in *Schistosoma mansoni*.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 111: 217-221, 2000.

OLIVEIRA, P. L.; *et al.* **A Heme-binding Protein from Hemolymph and Oocytes of the Blood-sucking, *Rhodnius prolixus*.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270 (18): 10897-10901, 1995.

PASCOA, V.; *et al.* ***Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32: 517-523, 2002.

PATARROYO, J.H.; *et al.* **Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86).** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 88: 163-172, 2002.

PRUETT, J.H. **Immunological control of arthropods ectoparasites – a review.** *International Journal for Parasitology*, v. 29: 25-32, 1999.

RIBEIRO, J. M. C. **Role saliva in tick/ host interactions.** *Experimental and Applied Acarology*, v. 7: 15-20, 1989.

RIDING, G. A.; *et al.* **A protective “concealed” antigen from *Boophilus microplus*: Purification, localization and possible function.** *Journal of Immunology*, v. 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.** *Journal of Parasitology*, v. 54: 667-673, 1968.

SACHDEV, D.; CHIRGWIN, J.M. **Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin.** *Protein expression and Purification*, v. 12: 122- 132, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning- a laboratory manual.** 2nd Edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMISH, M. & GLAZER, I. **Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks.** *Trends in Parasitology*, v. 17: 368- 371, 2001.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. **Biological control of ticks.** *Parasitology*, v. 129: S389-S403, 2004.

SAPPINGTON, T. W.; RAIKHEL, A. S. **Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 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.** *European Journal of Biochemistry*, v. 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.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 307: v. 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.; *et al.* **A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase,** *Parasitology*, v. 126: 155-163, 2003.

SILVEIRA, A. B.; *et al.* **Tick vitellin is dephosphorylated by a protein tyrosine phosphatase during egg development: Effect of dephosphorylation on VT proteolysis.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36: 200-209, 2006.

SINGH, S.M.; PANDA, A.K. **Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins.** *Journal from Bioscience and Bioengineering*, v. 99 (4):303-310, 2005.

SONENSHINE, D.E. **Biology of Ticks.** New york: Oxford University Press Inc., vol.2, 1993.

SORENSEN, H.P.; MORTENSEN, K.K. **Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*.** *Microbial Cell Factories*, v. 4(1): 1-8, 2005.

SORGINE, M.; *et al.* **A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of hard tick *Boophilus microplus*.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 275: 28659-65, 2000.

SUTHERST, R. W.; JONES, R. J.; SCHNITZERLING, H.J. **Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks.** *Nature*, v. 295: 320-321, 1982.

SUTHERST, R.W.; *et al.* **The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers.** *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 34: 317-327, 1983.

TELLAM, R. L.; *et al.* **Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin.** *Veterinary Parasitology*, v. 103: 141-156, 2002.

TERPE, K. **Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2):211-22, 2006.

VALLE, M. R.; *et al.* **Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba base don vaccination with the anti-tick vaccine Gavac.** *Experimental and Applied Acarology*, v. 34: 375-382, 2004.

VICENT, S.H. **Oxidative effects of heme and porphyrins on proteins and lipids.** *Seminars in Hematology*, v. 26(2):105-113, 1989.

VILLAVERDE, A.; CARRIO, M.M. **Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies.** *Biotechnology Letters*, v. 25: 1385-1395, 2003.

WIKEL, S. K. **Tick Modulation of host Cytokines.** *Experimental Parasitology*, v. 84: 304-309, 1996.

WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. **Vaccination with 'concealed' antigens for tick control.** *Parasitology Today*, v. 4: 196-198, 1988.

WILLADSEN, P.; *et al.* **Immunologic control of a parasitic arthropod: Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*.** *Journal of Immunology*, v. 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 Immunology*, v. 18: 214-246, 1996.

WILLADSEN, P. **The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites.** *Veterinary Parasitology*, v. 101:353-367, 2001.

WILLADSEN, P. **Anti-tick vaccines.** *Parasitology*, v. 129: S367-S387, 2004.

XIAO, H.; *et al.* **Recombinant expression and partial characterization of an active soluble histo-aspartic protease from *Plasmodium falciparum*.** *Protein Expression and Purification*, 49: 88- 94, 2006.

YASUKAWA, T.; *et al.* **Increase of Solubility of Foreign Proteins in *Escherichia coli* by Coproduction of the Bacterial Thioredoxin.** *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 25328-25331, 1995.

YOUNG, A.S.; MORZARIA, S.P. **Biology of *Babesia*.** *Parasitology Today*, v. 2: 211-219, 1986.

ZHIOUA, E.; *et al.* **Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae).** *Journal for Parasitology*, v. 83: 815-818, 1997.