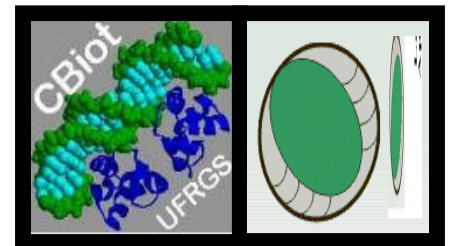


Clonagem e caracterização de uma metaloprotease do carrapato

Rhipicephalus (Boophilus) microplus



Guizzo, M.G.^{1,2}; Parizi, L.F.¹; Fabres, A.⁴; Logullo, C.⁴; Masuda, A.^{1,3}; Da Silva Vaz, I.Jr.^{1,2}

1 Centro de Biotecnologia, UFRGS, RS; 2 Faculdade de Veterinária, UFRGS, RS; 3 Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, UFRGS, RS; 4 Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos-CBB-UENF, RJ.

Introdução

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasita que causa importantes perdas produtivas na bovinocultura. As vacinas apresentam-se como um método alternativo, entretanto, seu desenvolvimento depende da caracterização de moléculas envolvidas no metabolismo do carrapato. A saliva do carrapato tem propriedades anti-hemostáticas, anti-inflamatórias e imunossupressivas, que favorece o repasto sanguíneo além de auxiliar na transmissão de patógenos. Um dos componentes salivares já descritos em outros carrapatos como participante desses processos são as metaloproteases. Cinco sequências nucleotídicas pertencentes a genes de proteínas de metaloproteases de *R. microplus* foram depositadas no Genbank, sendo duas dessas proteínas (MP2 e MP4) foram identificadas na glândula salivar.

Objetivos

Os objetivos do presente estudo são a clonagem da ORF da MP4, a expressão da proteína recombinante em sistema procarioto e a análise da transcrição relativa em diferentes tecidos.

Materiais e Métodos

Clonagem da região codificante da metaloprotease (MP4): RNA total foi extraído de larvas de *R. microplus* e o RT-PCR foi realizado com primers específicos para a ORF da MP4, amplificando um produto de 1679 pb. Esse amplicon foi clonado no vetor de clonagem pGEM-T e a linhagem TOP 10 de *Escherichia coli* foi transformada com o plasmídeo. O clone pGEM-T-MP4 foi hidrolizado com as enzimas de restrição *Nhe* I e *Bam*HI e subclonado no vetor de expressão pET5a. A construção plasmidial pET5a-MP4 foi confirmada através de PCR, hidrólise com enzimas de restrição e sequenciamento (figura 1).

Expressão da proteína recombinante em sistema procarioto: A linhagem de *Escherichia coli* BL21 (DE3) RIL foi transformada com o clone pET5a-MP4 e a expressão obtida em meio LB líquido a 37° C e DO de 0,6. A indução foi realizada com 1mM de IPTG e a proteína foi expressa de forma insolúvel (corpúsculo de inclusão) com 4 horas de indução. A expressão foi comprovada com a realização de western-blot com anticorpo anti-cauda de histidina revelando uma banda com massa molecular de 62 kDa (figura 2).

Análise da transcrição relativa do gene da MP4 através de qPCR: A caracterização dos níveis de transcrição da MP4 em ovário, intestino, corpo gorduroso e glândula salivar de partenógena e teleógena e em ovos e larvas de diferentes dias foi realizada com primers para uma região específica da MP4 e para o gene de referência 40S ribossomal (figuras 3 e 4). A ferramenta de análise REST (relative expression software tool) foi utilizada para a comparação de todas as amostras de cada grupo (Pfaffl *et al.*, 2002).

Resultados

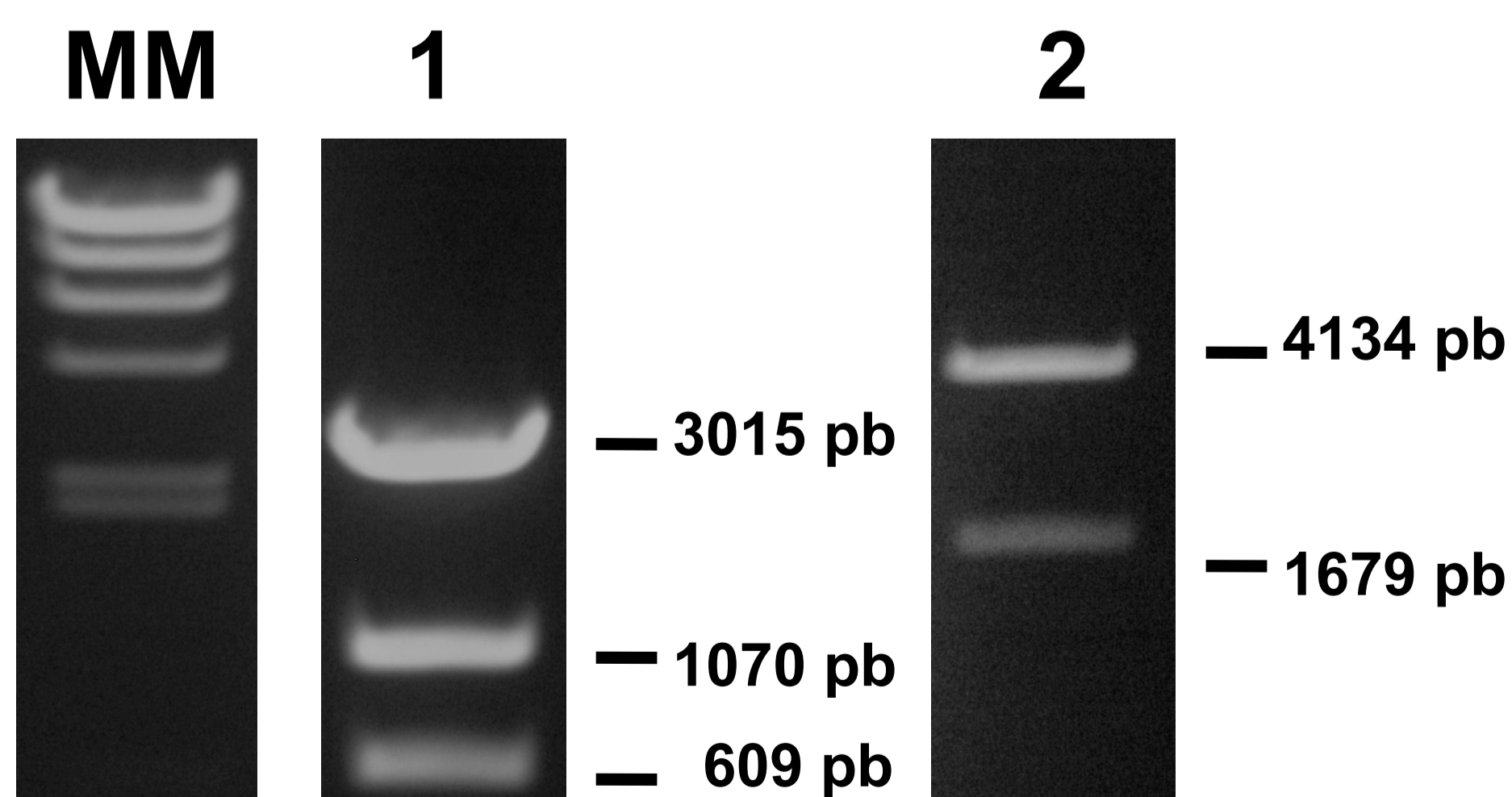


Figura 1: Hidrólise com enzimas de restrição submetida a eletroforese em gel de agarose 0,8%. MM - Marcador de massa molecular; 1, Plasmídeo pGEM-T-MP4 hidrolizado com *Eco*R I; 2, Plasmídeo pET5a-MP4 hidrolizado com *Nhe* I e *Bam*HI.

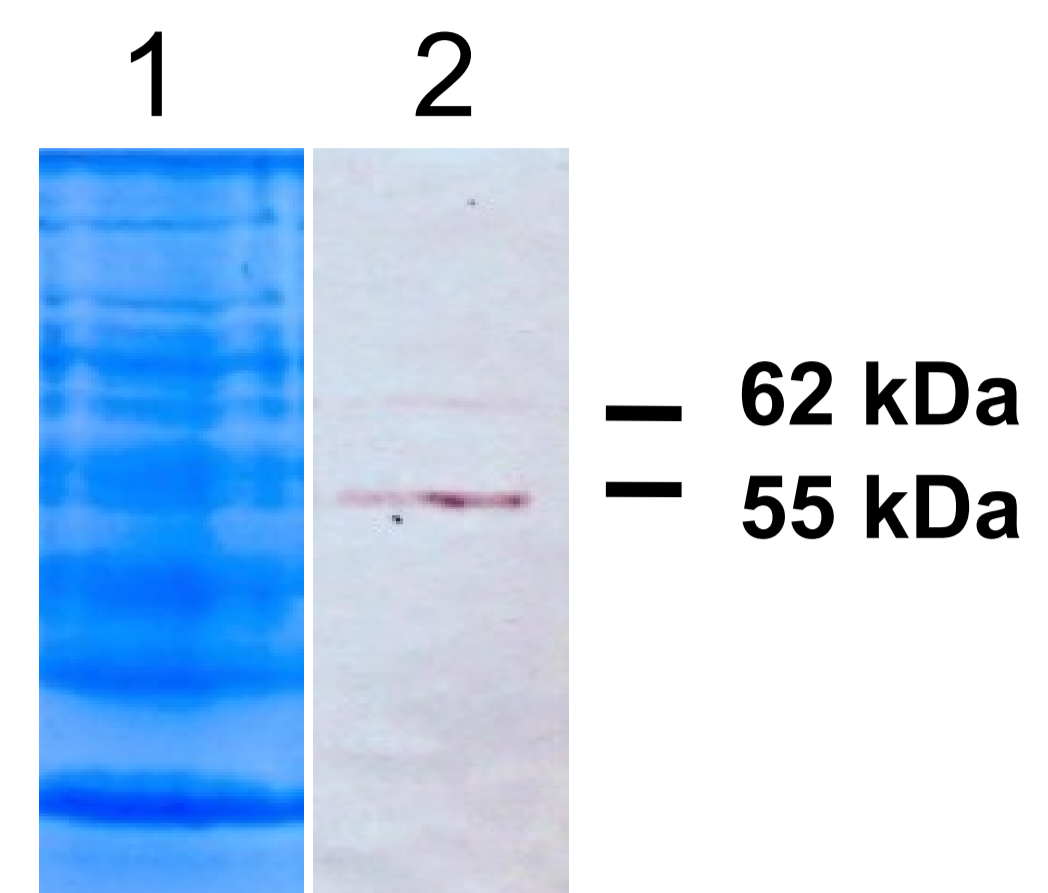


Figura 2: Expressão da MP4 recombinante em sistema procarioto. 1, Perfil de expressão proteica da linhagem de *E. Coli* BL21 (DE3) RIL; 2, Western-blot com anticorpo anti-cauda de histidina.

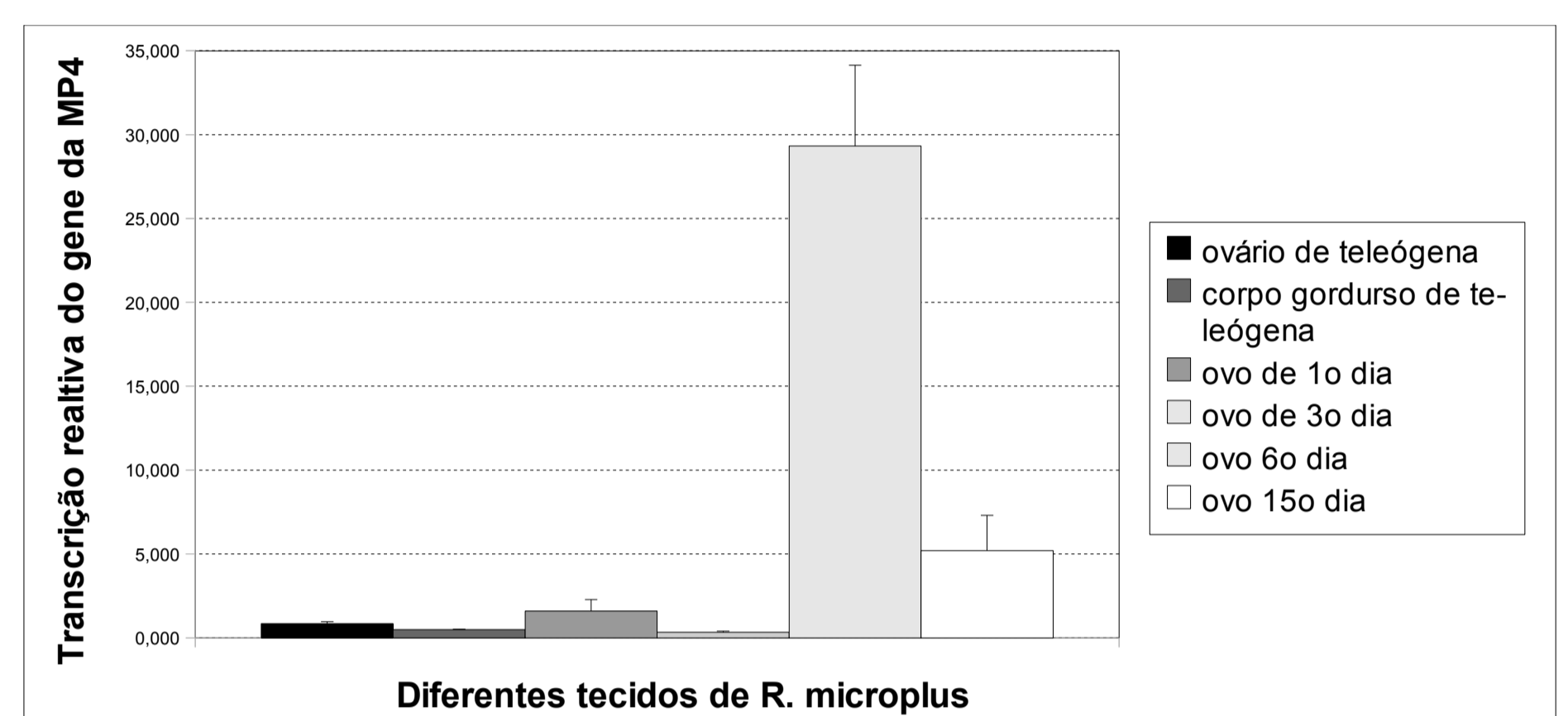


Figura 3: Análise da transcrição relativa do gene da MP4 através de qPCR em ovário e corpo gorduroso de teleógena e em ovos de diferentes dias após a postura.

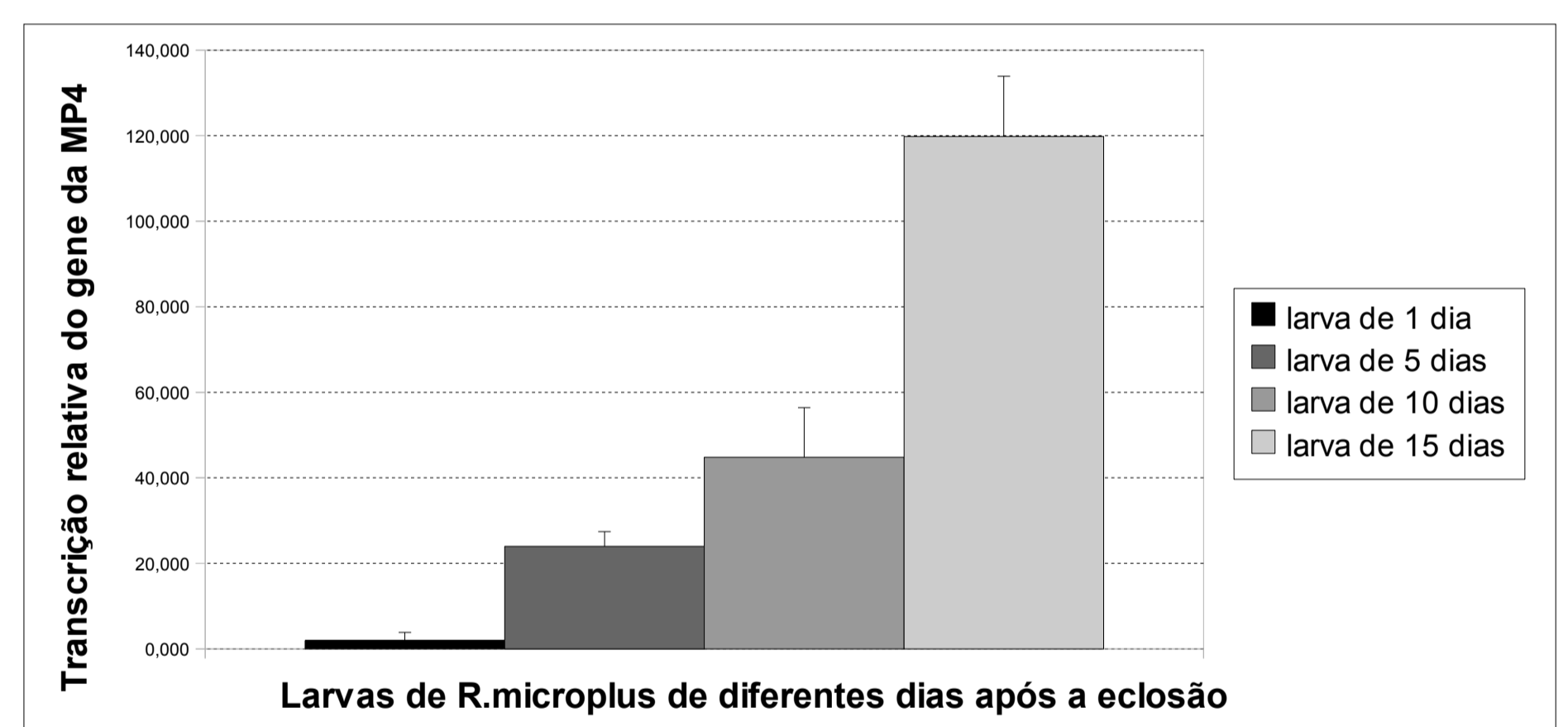


Figura 4: Análise da transcrição relativa do gene da MP4 através de qPCR em larvas de diferentes dias após a eclosão.

Discussão e Perspectiva

A região codificante do gene da MP4 foi clonada em vetor de expressão apresentando 1679 pb.

A expressão da proteína recombinante foi obtida na linhagem BL21 (DE3) RIL de *Escherichia coli* apresentando uma massa molecular de 62 kDa. A solubilização da proteína recombinante está em progresso e será seguida da purificação.

Através de PCR quantitativo demonstrou-se que a transcrição do gene ocorreu em ovário e corpo gorduroso de teleógena. Na embriogênese houve um pico de transcrição no sexto dia e durante o desenvolvimento da larva ocorreu aumento da transcrição ao longo dos dias. A presença da transcrição em diferentes tecidos sugere que a MP4 tenha importância nas diferentes etapas de vida do *R. microplus* com potencial de ser um alvo para o controle do carrapato.

Um experimento inicial de silenciamento do gene por RNA de interferência foi realizado e seus resultados estão sendo analisados o que permitirá obter mais informações sobre o papel da MP4 na fisiologia do *R. microplus*.

Referências Bibliográficas:

PFÄFFL, W.M., HORGAN, W. G., DEMPLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. (30): 1-10.
TRINDADE LEAL, A., REIS JOAQUIM DE FREITAS, D., DA SILVA VAZ, I.JR. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*. (31): 01-11, 2003.