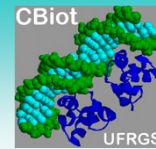


Produção da Cisteíno Endopeptidase Degradadora de Vitelina recombinante para uso em vacina anti-carrapato

Oldiges DP^{1,4}; Seixas A¹; Parizi LF¹; Lorenzini DM¹; Da Silva Vaz Jr I^{1,3}; Termignoni C.^{1,2}

¹ Centro de Biotecnologia - UFRGS; ² Departamento de Bioquímica - UFRGS; ³ Faculdade de Veterinária - UFRGS; ⁴ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre



INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um artrópode hematófago de grande importância econômica. Seu controle é feito através do uso de acaricidas químicos, que podem contaminar a carne e o leite. Tais problemas acentuam a busca por um método de controle alternativo, sendo o uso de vacinas bastante promissor. Para tanto, torna-se necessário a identificação de moléculas com potencial protetor, caracterização de seus papéis na fisiologia do carrapato e produção destes antígenos na forma recombinante, etapa fundamental para a produção de uma vacina economicamente viável.

A obtenção de aminoácidos necessários para o desenvolvimento do embrião do carrapato é feita através da degradação de vitelina (Vt). Até hoje foram descritas 3 enzimas do carrapato *R. microplus* envolvidas na degradação de Vt em ovos BYC (*Boophilus* Yolk pro-Cathepsin) (Logullo et al, 2008) THAP (Tick Heme-binding Aspartic Protease) (Sorgine et al, 2000) e VTDC (Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase) (Seixas et al, 2003). A VTDC está associada à Vt, e é a mais ativa dentre as três, reforçando a hipótese de que a VTDC desempenha um papel importante no desenvolvimento do artrópode (Seixas et al, 2006).

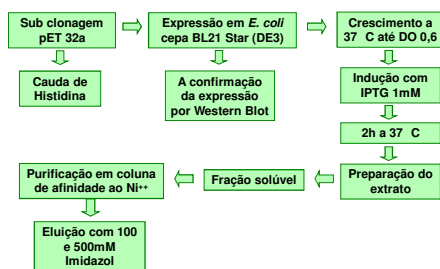
A imunização de bovinos com a VTDC nativa conferiu proteção parcial contra infestações pelo carrapato *R. microplus*. Em função da dificuldade de obtenção da proteína a partir de carrapatos sua produção na forma recombinante impõem-se como alternativa de escolha para obtê-la nas quantidades necessárias para avançar com os estudos de imunoproteção.

O presente trabalho tem por objetivo expressar, purificar e verificar a imunogenicidade da VTDC recombinante (rVTDC) em coelho e bovino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção da VTDC nativa – A forma nativa da VTDC foi obtida através de processos cromatográficos descritos previamente por Seixas et al (2003).

Produção da VTDC recombinante



Solubilização dos corpos de inclusão – A VTDC recombinante é expressa tanto na fração solúvel quanto na fração insolúvel do extrato bacteriano. Para a solubilização dos corpos de inclusão foram testados dois agentes desnaturantes: Cloridrato de Guanidina (6M) e Ureia (8M).

Imunização – Coelho e bovinos foram imunizados com a VTDC recombinante. O coelho foi imunizado com a banda da rVTDC recortada de gel SDS-PAGE. Bovinos foram imunizados com a VTDC purificada por cromatografia.

Ensaio imunogênicos – Em western blot o soro de bovinos e coelhos imunizados com VTDC e rVTDC foi usado para reconhecer ambas as formas da proteína, e deste modo testar a reatividade cruzada entre eles.

Ensaio de atividade – Para testar a atividade da enzima recombinante, a amostra purificada foi hidrolisada com trombina para remover a proteína de fusão inserida pelo vetor de expressão (Trx-Tag™ thioredoxin protein de 109 aminoácidos). Para a realização dos ensaios fluorimétricos foi usado o substrato N-carboxibenzoyl-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (N-Cbz-Phe-Arg-MCA) em tampão citrato-fosfato pH 3,5 e ditioneitol (DTT). Os inibidores E-64, Leupeptina, PMSF e Pepstatina A foram testados.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- A solubilização da rVTDC com guanidina se mostrou mais eficiente e conservou as propriedades antigênicas necessárias para testes de vacinação.
- A proteína recombinante purificada mantém as características de antigenicidade e imunogenicidade, de forma a poder ser utilizada como antígeno vacinal.
- Os soros policlonais confirmaram a reatividade cruzada entre as proteínas recombinante e nativa.
- A proteína recombinante apresenta atividade sobre os substratos sintéticos e é totalmente inibida por inibidores específicos.

Os próximos passos a serem realizados são a alimentação de carrapatos com anticorpo anti-rVTDC para verificar seu efeito no metabolismo desse artrópode.



Referências:

LOGULLO, C.; VAZ, SORGINE, M. H.; PAIVA-SILVA, G. O.; FÁRIA, F. S.; ZINGALI, R. B.; DE LIMA, M. F.; ARRELI, L.; OLIVEIRA, E. F.; ALVES, E. W.; MASUDA, H.; GONZALES, J. C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P. L. Isolation of an aspartic protease precursor from the egg of the hard tick *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 116: 523-532, 1998.
 SORGINE, M. H.; LOGULLO, C.; ZINGALI, R. B.; PAIVA-SILVA, G. O.; JULIANO, L.; OLIVEIRA, P. L. A heme-binding aspartic protease from the egg of hard tick *Boophilus microplus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 28659-65, 2000.
 SEIXAS, A.; DOS SANTOS, P. C.; VELOSO, F. O.; DA SILVA VAZ, J. R.; MASUDA, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*, 126: 155-163, 2003.

RESULTADOS

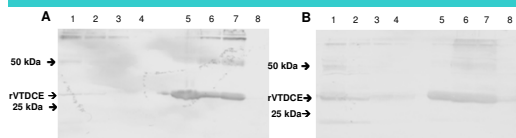


Figura 1 - Western blot da rVTDC. A – Anticorpo anti-cauda de histidina. B – Soro de coelho anti-rVTDC nativa. Sobrenadante do extrato de bactérias após (1) 2 h, (2) 4 h, (3) 16 h de indução e (4) não induzido. Sedimento do extrato de bactérias após (5) 2 h, (6) 4 h e (7) 16 h de indução e (8) não induzido.

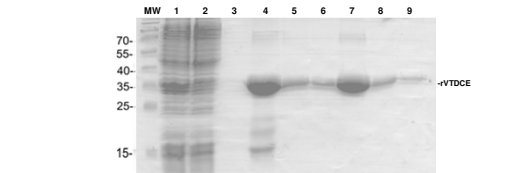


Figura 2 - SDS-PAGE (12%) e Western blot mostrando a rVTDC obtida pela solubilização dos corpos de inclusão. SDS-PAGE de (1) fração solubilizada com ureia 6M e (2) (1) com guanidina 6M. C) Western blot: (1) fração solubilizada com guanidina 6M e (2) com 6M de ureia. MW molecular weight.

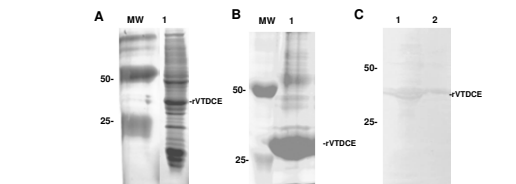


Figura 3 - SDS-PAGE (12%) e Western blot mostrando a rVTDC obtida pela solubilização dos corpos de inclusão. SDS-PAGE de (1) fração solubilizada com ureia 6M e (2) (1) com guanidina 6M. C) Western blot: (1) fração solubilizada com guanidina 6M e (2) com 6M de ureia. MW molecular weight.

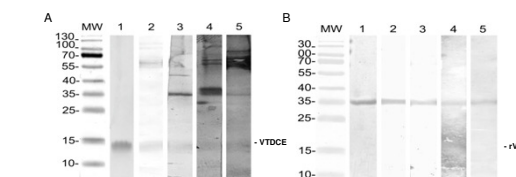


Figura 4 - Western blot de VTDC e rVTDC sondados com soros de animais imunizados com VTDC e rVTDC. A) Proteína nativa (1) SDS-PAGE da VTDC purificada; 2-5) Western blot sondado com (2) soro de coelho imunizado com VTDC (3) soro de coelho imunizado com rVTDC, (4) soro de bovino imunizado com VTDC (5) soro de bovino imunizado com rVTDC. B) Proteína recombinante: (1) SDS-PAGE da rVTDC purificada; 2-5) Western blot sondado com (2) soro de coelho imunizado com VTDC (3) soro de coelho imunizado com rVTDC, (4) soro de bovino imunizado com VTDC (5) soro de bovino imunizado com rVTDC. MW molecular weight.

Tabela 1 – Caracterização enzimática da rVTDC: perfil de inibição

Inibidor	Concentração (mM)	Inibição (%)
E-64	0,01	100
Leupeptina	0,01	100
Pepstatina A	0,1	32,7
PMSF	0,001	0

A amostra foi incubada em tampão fosfato de sódio / citrato de sódio, pH 3,5 a 37 C, por 10 min, na presença ou ausência dos inibidores E-64, Leupeptina, PMSF e Pepstatina A, antes da adição do substrato N-cbz-Phe-Arg-MCA. A inibição total por E-64 e Leupeptina leva a conclusão de que a proteína em questão realmente se trata de uma cisteíno endopeptidase.