

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO cDNA
DE UMA PROTEÍNA DE *Boophilus microplus* SIMILAR À
CORONINA**

Daniela Reis Joaquim de Freitas

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

**PORTO ALEGRE
2002**

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO cDNA DE UMA PROTEÍNA DE *Boophilus microplus* SIMILAR À CORONINA

Daniela Reis Joaquim de Freitas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Júnior

Co-orientadora: Dra. Aoi Masuda

Porto Alegre

Julho de 2002.

Este trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul e Faculdade de Veterinária, UFRGS, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

1 AGRADECIMENTOS

À Dra. Aoi Masuda por todas as oportunidades que me deu, pela orientação sempre presente, pelas discussões, conselhos e pelo exemplo de ética e profissionalismo que sempre foi para todos nós.

Ao Dr. Itabajara pela orientação, discussões, brigas, conselhos e, acima de tudo, pela amizade.

Aos colegas e amigos deste laboratório que sempre ajudaram e incentivaram meu trabalho.

Aos colegas que já não trabalham mais neste laboratório, mas que continuam sendo grandes amigos.

Aos colegas e amigos do Laboratório 109 e de todos os outros laboratórios, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

À comissão de acompanhamento – Prof. Henrique B. Ferreira e prof. Carlos Termignoni, pela ajuda e discussão visando melhorar meu trabalho.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, especialmente ao José Orlando Gross, Sílvia Regina Centeno, Milton Machado Oliveira e Paulo Rogério Sales Coimbra.

Em especial: aos meus pais, por tudo que me ensinaram e significam para mim; aos meus irmãos, por toda a amizade e carinho que sempre tiveram comigo, especialmente a Olinda, minha grande amiga e parceira de todos os momentos; aos meus amigos e quase irmãos Marilda, Marise, Luciana, Fernanda, Lauricio, Cláudia, Valesca, Norma e Adriano, pela paciência e carinho. E às minhas grandes amigas do peito Mônica Lima e Patrícia Cafrune, por esses anos de amizade.

2 ÍNDICE

1 AGRADECIMENTOS	4
2 ÍNDICE	5
3 LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	7
4 LISTA DE FIGURAS	8
5 LISTA DE TABELAS	10
6 RESUMO.....	11
7 INTRODUÇÃO	12
7.1 O carrapato <i>Boophilus microplus</i>	12
7.2 Ciclo biológico	12
7.3 Importância econômica.....	13
7.4 Métodos de controle.....	14
7.4.1 Controle químico	14
7.4.2 Controle imunológico	15
7.4.3 Controle biológico.....	20
7.5 Coronina.....	22
8 OBJETIVOS DO TRABALHO.....	26
9 MATERIAIS E MÉTODOS	27
9.1 Soluções e tampões	27
8.1.1 Tampões para eletroforese em gel de agarose	27
9.1.2 Tampões e soluções usados na sondagem imunológica e na sondagem com sonda de cDNA da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de <i>B.</i> <i>microplus</i>	27
9.1.3 Soluções para extração de DNA plasmidial em média escala.....	27
9.2 Gel para eletroforese:.....	28
9.3 Eletroforese em gel de agarose	28
9.4 Marcadores de massa molecular	29
9.5 Meios de cultura.....	29
9.6 Antibióticos.....	29
9.7 Enzimas.....	30
9.8 Bacteriófagos	30
9.9 Cepas bacterianas de <i>Escherichia coli</i>	31
9.10 Plasmídeo utilizado	31
9.11 Bibliotecas de cDNA.....	31
9.12 Preparação de células competentes para transformação bacteriana por eletroporação.....	32
9.13 Clonagem	32
9.14. Transformação bacteriana por eletroporação.....	33
9.15 Análise qualitativa e quantitativa dos ácidos nucleicos.....	33
9.16 Seqüenciamento do clone SG5.....	33
9.17 Animais	34
9.17.1 Bovinos.....	34
9.17.2 Carrapatos.....	34
9.18 Obtenção de ovos, larvas e tecidos de glândula salivar, ovário, corpo gorduroso e intestino de teleóginas e partenóginas.....	35
9.18.1 Obtenção de teleóginas.....	35
9.18.2 Obtenção de partenóginas	35

9.18.3 Obtenção de glândula salivar, ovário, corpo gorduroso e intestino	35
9.18.4 Obtenção de ovos e larvas	35
9.19 Triagem imunológica da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de <i>B. microplus</i>	36
9.19.1 Crescimento e preparação das bactérias	36
9.19.2 Infecção em meio líquido – plaqueamento dos bacteriófagos λ Uni-ZAP® XR	36
9.19.3 Transferência para membrana de nitrocelulose	37
9.19.4 Triagem com anticorpo monoclonal	37
9.20.1 Purificação de RNA poli-A ⁺	38
9.20.2 Quantificação e análise do mRNA extraído	38
9.20.3 RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)	39
9.20.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)	40
9.21 Triagem das bibliotecas de cDNA	41
9.21.1 Extração de DNA plasmidial em média escala para preparação de sonda para a triagem	41
9.21.2 Análise de restrição e purificação de DNA plasmidial a partir de gel de agarose	41
9.21.3 Preparação das membranas com bacteriófago	42
9.21.4 Triagem da Biblioteca de cDNA com Sonda de cDNA	42
9.21.5 Extração de plasmídeo do fago e clonagem em SOLR usando fago "ExAssist Interference-Resistant Helper TM "	43
9.22 RACE	43
9.22.1 Extração de cDNA da biblioteca para o RACE	43
9.22.2 Confirmação da qualidade do cDNA extraído	44
9.22.3 PCR-teste	44
9.22.4 RACE (rapid amplification of cDNA ends)	45
10 RESULTADOS	47
10.1 Triagem imunológica da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de <i>B. microplus</i> e obtenção do clone SG5	47
10.2 Análise da seqüência de SG5	49
10.3 Expressão de mRNA de SG5 em <i>Boophilus microplus</i>	53
10.4 Triagem da biblioteca de cDNA em vetor com sonda de cDNA de SG5	55
10.5 RACE	61
11 DISCUSSÃO	63
12 ABSTRACT	67
13 BIBLIOGRAFIA	68

3 LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	adenosina
BLOTTO	"bovine lacto transfer technique optimizer"
cDNA	DNA complementar ao RNA
Da	Dalton
D.O.	densidade óptica
DMSO	dimetil - sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfatados
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	gravidade
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase
LB	Luria-Bertani
mRNA	RNA mensageiro
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	"polymerase chain reaction"
PEG	polietilenoglicol
RACE	"rapid amplification cDNA ends"
RNA	ácido ribonucléico
SDS	dodecil sulfato de sódio
TAE	tris-acetato/EDTA
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
pfu	unidade formadoras de placa de lise

4 LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Auto-radiografia da triagem imunológica utilizando anticorpo monoclonal como sonda.....47

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da análise de restrição dos clones obtidos na triagem imunológica48

Figura 3: Seqüência parcial de nucleotídeos de SG5 e seqüência deduzida de aminoácidos.....49

Figura 4: Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida de aminoácidos do clone SG5 com as seqüências de aminoácidos de proteínas semelhantes a coronina de outros organismos52

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação por RT-PCR de mRNA da proteína similar a coronina presente nos tecidos do carrapato *B. microplus*54

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da análise de restrição dos clones obtidos na triagem da biblioteca de cDNA de glândulas salivares utilizando sonda de cDNA do clone SG556

Figura 7: Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida do clone Cor1 obtido por triagem da biblioteca de cDNA de glândulas salivares utilizando sonda de cDNA do clone SG557

Figura 8: Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida do clone Cor2 obtido por triagem da biblioteca de cDNA de glândulas salivares utilizando sonda de cDNA do clone SG558

Figura 9: Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida do clone Cor3 obtido por triagem da biblioteca de cDNA de glândulas salivares utilizando sonda de cDNA do clone SG559

Figura 10: Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida do clone Cor4 obtido por triagem da biblioteca de cDNA de glândulas salivares utilizando sonda de cDNA do clone SG560

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação por PCR-RACE utilizando as enzimas *Taq*-Polimerase e Elongase Enzyme Mix62

5 LISTA DE TABELAS

TABELA I: Cepas bacterianas utilizadas.....	30
TABELA II: clones encontrados na sondagem da biblioteca de cDNA utilizando sonda de cDNA do clone SG5.....	57

6 RESUMO

O carrapato *Boophilus microplus*, um ectoparasita hematófago, está presente em áreas tropicais e subtropicais no mundo todo. Atualmente, seu controle é baseado no uso de pesticidas. Para auxiliar no desenvolvimento de novas vacinas para este parasita, é importante compreender melhor sua fisiologia.

A coronina, uma proteína de citoesqueleto, pertence à Família das Proteínas G. Está localizada no córtex celular e apresenta várias funções, desde locomoção celular, fagocitose, macropinocitose a ligação de microtúbulos, orientação da polaridade de embriões, citocinese, polimerização dos filamentos de actina e regulação da organização do citoesqueleto. No presente trabalho, o cDNA de uma proteína semelhante a coronina foi isolado de uma biblioteca de cDNA de glândulas salivares de partenóginas por triagem imunológica. A análise de seqüência mostrou que o clone SG5 possui identidade entre 15 e 17% com seqüências de proteínas semelhantes a coronina de outras espécies, como as de humanos e de camundongo, e possui um tamanho de 1.938 pb, com uma suposta ORF de 960 nucleotídeos. Na análise da expressão do gene, verificou-se que o mRNA deste gene está presente em ovos e larvas de 15 dias e glândulas salivares, intestino e ovário de teleógina e partenógina; em corpo gorduroso sua presença não foi detectada.

Um estudo mais detalhado do papel da proteína semelhante a coronina nas glândulas salivares de *B. microplus* pode auxiliar em uma melhor compreensão da fisiologia deste parasita.

7 INTRODUÇÃO

7.1 O carrapato *Boophilus microplus*

O carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887; Acari: Ixodidae) é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, cujo principal hospedeiro é o bovino, embora seja capaz de completar, eventualmente, o seu ciclo no búfalo, na ovelha, no cavalo e no veado (GONZALES, 1995). Encontra-se amplamente distribuído nos grandes rebanhos bovinos da América, África, Ásia e Oceania entre os paralelos 32°N e 32°S (JOHNSTON *et al.*, 1986), sendo um dos principais parasitos que afetam a pecuária destas áreas.

7.2 Ciclo biológico

O ciclo biológico de *B. microplus* divide-se em uma fase de vida livre e uma fase de vida parasitária. A fase de vida livre tem início com a queda ao solo da fêmea ingurgitada (teleógina), seguida de um período de pré-postura de dois a três dias (ROCHA, 1998), postura de ovos e subsequente morte da fêmea, havendo então eclosão dos ovos e encontro das larvas eclodidas com um hospedeiro. Em condições ideais de temperatura (28°C) e umidade (85%), a postura e eclosão dos ovos ocorrem em aproximadamente 18 dias (GONZALES, 1974). Uma vez eclodidas, as larvas migram para as extremidades apicais da vegetação e ficam à espera do hospedeiro. A fase parasitária tem duração de aproximadamente 21 dias, na qual o carrapato passa pelos estágios de larva, ninfa e adulto. Quando alcançam o hospedeiro, as larvas se alojam em regiões como parte posterior da coxa, perineal, perianal e perivulvar (WAGLAND, 1978), e passam a se alimentar de linfa até chegarem à fase adulta, o que ocorre em torno de 15 dias (CASTRO & PEREIRA, 1946). Na fase adulta ocorre a cópula e as fêmeas passam a se alimentar de sangue, até alcançarem seu ingurgitamento

total e caírem ao solo. Os machos – muito menores em tamanho que as fêmeas – permanecem no hospedeiro procurando novas fêmeas, sobrevivendo até duas vezes mais tempo que elas (ROBERTS, 1968).

O ingurgitamento da fêmea de *B. microplus* é bastante rápido. Demonstrou-se que fêmeas ingurgitadas já no final do período de infestação, com tamanho de 4-6 mm (10-30 mg), podem atingir um rápido final de ingurgitamento à noite, chegando a 8-11 mm (150-250 mg) e se destacando nas primeiras horas do dia. Estes padrões de ingurgitamento sofrem modificações de acordo com as estações, bem como em bovinos estabulados, sugerindo que estes padrões sofrem alguma influência do ambiente externo, principalmente de luz e temperatura (ROCHA, 1998).

7.3 Importância econômica

B. microplus acarreta diversos danos econômicos (HORN & ARTECHE, 1985), tornando-se o principal alvo de programas de controle e erradicação nos rebanhos da América do Sul (NARI, 1995). Um carrapato bovino suga, em média, de 2 a 3 ml de sangue do seu hospedeiro (GONZALES, 1995), o que se reflete em grandes perdas na produção de leite e carne (SUTHERST *et al.*, 1983) e danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato (SEIFERT *et al.*, 1968). Além disso, este carrapato pode atuar como vetor de doenças, como a tristeza parasitária bovina, causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela rickétsia do gênero *Anaplasma* (McCOSKER, 1981; YOUNG & MORZARIA, 1986). Além destes prejuízos relacionados diretamente com a bovinocultura, existem diversos prejuízos relacionados à mão-de-obra necessária para o controle desse parasita, despesas com instalações, compra de equipamentos adequados para aplicação de carrapaticida nos rebanhos e aquisição de carrapaticidas, entre outros (CORDOVÉS, 1996).

Estudos recentes na Austrália mostram que, neste país de 1998 até o presente momento, tem havido uma perda anual de 4 milhões de dólares na criação de gado, 49% desta perda devido aos custos do controle do carrapato e 51% devido a perdas na produção de leite, carne e couro (JONSSON *et al.*, 2001).

7.4 Métodos de controle

7.4.1 Controle químico

O método de controle para o carrapato que mais tem sido utilizado desde a década de 50 é o uso de acaricidas (PRUETT, 1999). Entretanto, além de ser um método de controle dispendioso, pode causar danos ao meio ambiente e à saúde pública, através da contaminação de rios e solos. Ao longo destas décadas, foram utilizados, seqüencialmente, acaricidas baseados em compostos arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamato, formamidas e piretróides. Os três mais recentes grupos químicos de produtos contra o carrapato que se encontram disponíveis hoje no mercado são: as formamidas, os piretróides e as avermectinas. Entretanto, ainda é possível encontrar à venda alguns produtos de um grupo mais antigo, os organofosforados (GOMES, 1998).

Diversos autores têm demonstrado a crescente resistência apresentada por carrapatos a compostos químicos presentes nos carrapaticidas (CRAMPTON, 1999). O *B. microplus* pode apresentar resistência mais rapidamente que outros carrapatos, presumivelmente, pelo menor período de tempo entre as gerações (KOCAN, 1995), o que demonstra a necessidade de desenvolver novas formas de controle desta espécie. Outra causa de resistência é a subdosificação empregada, em alguns casos, por falhas de manejo.

Resumindo, os problemas de resistência, o alto custo dos produtos químicos e da mão-de-obra na aplicação dos produtos, bem como o

aparecimento de resíduos tóxicos na carne e no leite e a contaminação do ambiente, levaram a procura de métodos biológicos e imunológicos como formas alternativas de controle do carrapato (NOLAN, 1985; PRUETT, 1999). Atualmente, os controles biológico e imunológico já constituem parte de programas de controle integrado de ectoparasitas, que ainda exigem a utilização de produtos químicos para maior estabilidade operacional (PRUETT, 1999).

7.4.2 Controle imunológico

Tendo em vista a problemática do uso de pesticidas, a possibilidade de proteger o bovino por indução de uma resposta imune contra tecidos do carrapato tem sido testada por diferentes grupos de pesquisa, há quase três décadas (ALLEN and HUMPHREYS, 1979; McGOWAN *et al.*, 1980; WIKEL, 1981; SHAPIRO *et al.*, 1986; WILLADSEN and KEMP, 1988; RODRIGUEZ *et al.*, 1995; DA SILVA VAZ Jr *et al.*, 1998). A resistência adquirida mediada imunologicamente (ALLEN, 1989) é expressa pela redução no número de carrapatos que se fixam ao hospedeiro, pela diminuição no peso das teleóginas e pela redução da produção de ovos e, conseqüentemente, de larvas (WIKEL, 1997). A observação dessa diminuição de peso e número de ovos forneceu bases para as futuras tentativas de utilização de vacinas no controle de ectoparasitas.

Indivíduos mais suscetíveis ao parasitismo são responsáveis pela transmissão e manutenção da população de parasitas em um rebanho, uma forma de controle seria torná-los resistentes através da vacinação. Portanto, vacinas contra ectoparasitas são ferramentas que reduzem a população se forem usadas nas sucessivas gerações dos parasitas numa área de controle. As vacinas não têm o efeito imediato dos pesticidas químicos, nem habilidade de proteger totalmente o animal, no entanto, oferecem algumas vantagens sobre o uso de agentes químicos para o controle de parasitas: os efeitos das

imunizações não deixam resíduos tóxicos, e podem ser espécie-específicas (PRUETT, 1999).

O controle imunológico do carrapato está sendo explorado pelo conhecimento das interações hospedeiro-parasita que permitem imunomanipular o hospedeiro. Testes de imunização com diferentes antígenos do parasita fornecem evidências de que o controle destes ectoparasitas pode ser realizado através da vacinação (WILLADSEN, 1980).

Com o objetivo de induzir uma melhor resistência nos animais, vários estudos vem sendo desenvolvidos na tentativa de obtê-la por imunização artificial. Foi demonstrado que extratos de órgãos internos de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *D. andersoni*, quando usados para imunizar cobaios, conduziam a uma redução significativa no peso dos carrapatos ingurgitados e a uma diminuição ou abolição da postura, sendo que os poucos ovos postos não eram viáveis. O mesmo experimento em bovinos utilizando extrato de intestino juntamente com o de órgãos reprodutores mostrou efeitos menos drásticos embora o peso e postura dos ovos tenham sido afetados (ALLEN & HUMPHREYS, 1979).

Experimentos de imunização de coelhos com extrato de *Amblyomma maculatum* macho não alimentado resultaram em uma redução no peso dos carrapatos adultos e na massa de ovos (McGOWAN *et al.*, 1980). Extrato de glândula salivar de fêmeas de *D. andersoni* parcialmente ingurgitadas em coelhos e utilizado para imunizar cobaios resultou na diminuição do número de larvas ingurgitadas em 50% e na diminuição do peso dos carrapatos ingurgitados em 68% (WIKEL, 1981). Da mesma maneira, terneiros inoculados com extratos de *Amblyomma americanum* adultos produziram um número reduzido de carrapatos ingurgitados cujo peso foi também reduzido, enquanto que a postura de ovos não foi afetada (McGOWAN *et al.*, 1980).

Antígenos de glândula salivar de *D. andersoni* foram utilizados para imunizar cobaios por diferentes vias, com ou sem adjuvantes, induzindo um

considerável grau de resistência, o qual foi expresso como uma diminuição do número e peso das larvas ingurgitadas. (WIKEL, 1981).

Em *B. microplus*, melhor proteção foi obtida com uma glicoproteína denominada Bm86, que induz a produção de anticorpos que inibem a endocitose das células intestinais, sem causar lise celular, o que indica que anticorpos inibem uma função celular e levam a uma redução do ingurgitamento das fêmeas adultas (WILLADSEN *et al.*, 1989). Ensaios de imunolocalização (GOUCH & KEMP, 1993) demonstraram que a Bm86 localiza-se na superfície apical de células do intestino do carrapato observando uma maior concentração da proteína nas microvilosidades das células digestivas. A imunização de bovinos com a proteína nativa levou a uma diminuição no número de carrapatos sobreviventes, no peso dos carrapatos ingurgitados e na capacidade de postura (WILLADSEN *et al.*, 1989).

Esta proteína recombinante expressada em *E. coli* (RAND *et al.*, 1989) quando testada em experimentos de vacinação mostrou menor grau de proteção em bovinos infestados quando comparada com a proteína nativa. Esta diferença talvez se deva a ausência de glicosilação em proteínas sintetizadas por *E. coli* (RAND *et al.*, 1989). RODRIGUEZ *et al.* (1994) clonaram e expressaram o gene da Bm86 em *Pichia pastoris* com o objetivo de obter maiores níveis de expressão e conseqüentemente maior quantidade de antígeno. A proteína foi testada em experimentos de vacinação de bovinos, sob condições controladas, e foi observada uma redução de 31% no número de carrapatos, sendo que nos carrapatos que se desprenderam do hospedeiro houve redução de 50% no peso e de 70% na habilidade reprodutiva. Em experimentos de campo, RODRIGUEZ *et al.* (1995) demonstraram que a vacinação foi capaz de controlar a população de carrapatos. A Bm86 foi também expressada em outros organismos, como *Aspergillus nidulans*, *A. niger* (TURNBULL *et al.*, 1990) e baculovírus (RICHARDSON *et al.*, 1993).

Atualmente, TickGARD™ (Division of Tropical Animal Production and Biotech Austrália) e GAVAC™ (Heber Biotech Inc.) são as únicas vacinas

disponíveis comercialmente para o controle do carrapato *B. microplus* (PRUETT, 1999) e ambas utilizam Bm86 como antígeno (WILLADSEN, 1999). A TickGARD™ é australiana e apresenta uma eficiência muito reduzida em países da América. A GAVAC™ é a vacina de origem cubana, disponível para vários países latino-americanos, entre eles Cuba, Colômbia, República Dominicana, Brasil e México. Sua eficiência no controle do *B. microplus* varia de 55% a 100%. (DE LA FUENTE *et al.*, 1999).

Imunizações com DNA já foram testadas em ovelhas, utilizando a seqüência codificante da Bm86, mas somente a imunização com DNA não gerou uma boa resposta, tendo sido muito mais efetivo o resultado quando a imunização de DNA era seguida de imunização com o próprio antígeno Bm86 (DE ROSE *et al.*, 1999)

Outra proteína, Bm91, encontrada em baixa concentração nas glândulas salivares e intestino de fêmeas adultas (RIDING *et al.*, 1994), também confere resistência ao carrapato em bovinos. Esta proteína é glicosilada, e possui massa molecular aparente de 86.000. Seqüências parciais da proteína mostram uma similaridade com enzimas conversoras de angiotensina de mamíferos, sugerindo que ela tenha uma função enzimática. Esta proteína não é reconhecida por soros de animais cuja resistência foi adquirida por infestações sucessivas de carrapatos em condições naturais.

Recentemente, TELLAM *et al.* (2002) observaram uma redução na postura e no peso de teleóginas que parasitavam ovelhas que foram vacinadas com vitelina. Vitelina é a mais abundante proteína de ovo de *B. microplus*, tendo sido purificada como um complexo não-covalente de seis polipeptídeos de massas moleculares aparentes variando entre 44.000 e 107.000. Como efeito da imunização das ovelhas com vitelina, as teleóginas reduziram seu peso em 21,13%, seu engurgitamento de 72% caiu para 42% e a taxa de conversão de ovos reduziu de 0,59 para 0,43 quando comparada com a de um grupo-controle.

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado na caracterização de diversos antígenos de *B. microplus* presentes em intestino, ovários, glândulas salivares e

tecidos de ovo e larva - que possam ser utilizados em uma vacina contra o parasita (DA SILVA VAZ Jr. *et al.*, 1994; CANAL *et al.*, 1995; TORO-ORTIZ *et al.*, 1997; LOGULLO, 1998; DA SILVA VAZ Jr. *et al.*, 1998; RENARD *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, *in press*).

LOGULLO *et al.* (1998) purificaram um precursor de proteinase aspártica de *B. microplus*, a BYC (*Boophilus* Yolk Catepsin), presente em ovos embrionados. Os dados obtidos indicam que este antígeno tem papel na degradação da vitelina pelo embrião durante a embriogênese. Bovinos imunizados com a BYC produziram anticorpos que foram detectados na hemolinfa de carrapatos que parasitaram estes animais (DA SILVA VAZ Jr *et al.*, 1996). Em experimentos de inoculação de anticorpos monoclonais anti-BYC em teleóginas, no início da postura, demonstraram uma redução no peso de ovos postos e na sobrevivência das teleóginas durante a postura, quando comparado com grupo controle. Os parâmetros biológicos analisados apresentaram uma correlação significativa com a dose de anticorpo monoclonal inoculado nas teleóginas (DA SILVA VAZ Jr. *et al.*, 1998). TORO-ORTIZ *et al.* (1997) produziram anticorpos monoclonais em camundongos contra diferentes tecidos de *B. microplus*. Os anticorpos monoclonais BrBm1 – que reconhece extrato de diferentes tecidos e diferentes instares do carrapato – e BrBm2 – que reconhece uma proteína presente em extrato de intestino – quando inoculados em teleóginas causaram uma redução na postura de 50 e 70%, respectivamente. A identificação da(s) proteína(s) reconhecida(s) por BrBm2 pode ser de relevância para o desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato.

No entanto, mesmo com todas estas demonstrações de que a imunização pode ser um método eficiente no controle de carrapato, vacinas contra carrapato devem ser empregadas dentro de um contexto de controle integrado, isto é, em conjunto com acaricidas, já que os métodos de vacinação disponíveis, atualmente, não conferem imunidade total.

7.4.3 Controle biológico

Uma outra alternativa para evitar o emprego do controle químico no controle do carrapato, além do controle imunológico, é o controle biológico. Este tipo de estratégia pode ser utilizado de diversas formas: baseado nas relações do carrapato com o meio onde ele se encontra; na sua relação com seus inimigos naturais; na utilização de compostos naturais obtidos para utilização de seu controle.

O carrapato, como qualquer organismo, tem sua viabilidade relacionada à condições de estresse a que estiver submetido. Assim, as condições climáticas desempenham papel importante no equilíbrio das populações de carrapatos no campo, alterando o número de larvas viáveis e, conseqüentemente, diminuindo os índices de infestação nos bovinos. Temperatura e umidade do ar interferem na viabilidade das larvas durante a fase de vida livre (GONZALES, 1995). A vegetação também pode atuar como um fator limitante no crescimento da população de carrapatos. Algumas pastagens podem facilitar uma infestação. Outras podem dificultar a sobrevivência das larvas, diminuindo a população de carrapatos por sua ação repelente ou tóxica, como é o caso das plantas do gênero *Stylosanthes* (SURTHEST *et al.*, 1982) ou ainda por imobilizarem as larvas através de suas secreções ou estruturas da planta, como ocorre com o capim gordura (*Melinis minutiflora*). Uma forma alternativa de controle seria o sistema de rotação de pastagens, no qual uma área fica livre de rebanho por um determinado período de tempo, de forma a impedir a sobrevivência das larvas. No entanto, esta prática não pode ser aplicada em uma propriedade rural de pequeno porte (FARIAS *et al.*, 1986).

O controle biológico pode ser baseado na relação do carrapato com seus inimigos naturais. Os carrapatos estão sujeitos a muitos predadores, dentre os quais deve-se salientar a garça-vaqueira (*Egretta ibis*), que segue os rebanhos bovinos e alimenta-se de larvas, neóginas e partenóginas retiradas do corpo dos bovinos ou de teleóginas que caem ao solo, sendo capazes, em certas

circunstâncias, de reduzir em até 66% o número de teleóginas que realizam postura (ALVES-BRANCO *et al.*, 1983) Outros pássaros, como o "vira-bosta" (*Molotrus bonariensis*) e o quero-quero (*Vanellus chilensis*) também são importante predadores de carrapatos. Grandes populações de formigas carnívoras podem manter baixos os níveis populacionais de *B. microplus* se alimentando das teleóginas que caem ao solo (GONZALES, 1995).

Espécies parasitas também podem contribuir para a manutenção de baixos níveis populacionais de carrapato. Bactérias, como *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* são naturalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato. Existem relatos de uma diminuição de até 47% na quantidade de ovos postos quando fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* eram imersas em suspensão de *C. lapagei* (BRUM, 1988). A utilização de fungos no controle do carrapato tem sido muito estudada nos últimos anos. O fungo deuteromiceto entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é altamente patogênico para carrapatos *Ixodes scapularis* (ZHIOUA *et al.*, 1997). Foi demonstrado que os fungos *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* induzem uma taxa de mortalidade de aproximadamente 30% em *Rhipicephalus appendiculatus* adultos alimentados em coelhos, enquanto que *M. anisopliae* induzem uma mortalidade de 37% em *Amblyomma variegatum* adultos. É interessante ressaltar que estes fungos não perdem sua capacidade de infecção sobre o carrapato quando são incubados com acaricida por mais de 5 dias, mantendo o crescimento e suas características morfológicas normais (KAAYA *et al.*, 1996). Experimentos *in vitro* avaliaram os efeitos de 12 isolados de *M. anisopliae* sobre fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* O resultado obtido mostra que, dependendo da concentração de esporos na suspensão utilizada, alguns isolados de *M. anisopliae* podem causar morte de até 100% dos carrapatos infectados em experimentos *in vitro* (FRAZZON *et al.*, 2000).

Uma outra estratégia envolvendo controle biológico do carrapato 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), advindo da mistura de dois metabólitos deste organismo, espinosina A e D, obtidos sob condições de fermentação. Os resultados mostram uma queda drástica no número de fêmeas ingurgitadas, na massa de ovos e no índice de fecundidade.

GUGLIELMONE *et al.* (2000) mostraram que bovinos banhados em moxidectina, um composto endectocida que também atua como anti-helmíntico, tinham um controle de quase 95% na infestação de carrapatos. É possível que estes acaricidas naturais venham a assumir o papel dos acaricidas químicos no controle integrado com vacinas num futuro bastante próximo.

7.5 Coronina

Uma das mais importantes conquistas evolutivas das células eucarióticas, além da carioteca, é o citoesqueleto. O citoesqueleto é constituído por uma rede de filamentos protéicos, que se prolongam ao longo de todo o citoplasma (BRETSCHER, 1991), e diversas proteínas acessórias, gerando uma rede estrutural para a célula, definindo o formato da célula e a organização geral do citoplasma (PUMPLIN & BLOCH, 1993). Além da função estrutural, o citoesqueleto é responsável pela motilidade celular, transporte intracelular e posicionamento de organelas e outras estruturas, incluindo o movimento dos cromossomos durante divisão celular (MITCHISON & CRAMER, 1996).

A proteína majoritária no citoesqueleto de qualquer célula eucariota é a actina, que pode ser encontrada em sua forma monomérica e inativa (actina G ou globular) ou na forma de polímero e ativa (actina F ou filamentosa) (MITCHISON and CRAMER, 1996). O citoesqueleto de actina é uma estrutura essencial para vários movimentos no nível celular e intracelular. Enquanto uma célula muscular requer uma organização estática, células amebóides requerem uma remodelagem bastante dinâmica de redes filamentosas em uma questão de segundos em um ponto localizado da célula. O melhor modelo para estudar

motilidade celular e associação de actina com várias proteínas de citoesqueleto é o fungo *Dictyostelium discoideum* (EICHINGER *et al.*, 1999; FUKUI *et al.*, 1999a). Foi em *D. discoideum* que foi isolada pela primeira vez uma proteína ligante de actina de massa molecular aparente de 55.000 Da, denominada coronina (HOSTOS *et al.*, 1991). Esta proteína não foi isolada baseada na sua atividade bioquímica, mas por ter precipitado juntamente com complexos actina-miosina. Somente experimentos posteriores mostraram que de fato a coronina se liga a actina (HOSTOS *et al.*, 1993).

A coronina recebeu esta denominação devido à maneira com que é visualizada na extremidade de projeções de pseudópodes de células amebóides de *D. discoideum*, lembrando fortemente uma coroa (HOSTOS *et al.*, 1991). Esta proteína apresenta uma estrutura diferente de outras proteínas ligantes de actina – sua seqüência amino-terminal apresenta cinco repetições WD (triptofano-aspartato) muito similares às seqüências das subunidades β das proteínas G triméricas, que têm sete repetições como esta (NEER *et al.*, 1994; NEER & SMITH, 1996).

A família das proteínas G abriga proteínas com diferentes funções em processos que vão desde transdução de sinais e regulação da transdução a transcrição, processamento de pré-mRNA, fusão vesicular ou organização de citoesqueleto, como é o caso da coronina (GARCIA-HIGUERA *et al.*, 1996). Com exceção da coronina de *Caenorhabditis elegans*, POD-1 (RAPPEYE *et al.*, 1999), o domínio carboxiterminal apresenta uma alta tendência para formar estruturas α -hélice (HOSTOS *et al.*, 1999). Em *Xenopus laevis*, ASANO *et al.* (2001) propuseram que a coronina forma um dímero estável através de sua região C-terminal e que esta dimerização é necessária para sua localização subcelular e função.

A coronina pode variar sua função de acordo com o organismo. Em *D. discoideum* está localizada no córtex, na extremidade de pseudópodes, e contribui para a dinâmica do sistema de actina F (GERISCH *et al.*, 1995) e

movimentação celular, além de fagocitose (MANIAK *et al.*, 1995; HOSTOS *et al.*, 1993). Trabalhos com a coronina de *D. discoideum* mostram que esta pode atuar na polimerização de actina F e estar se ligando entre microtúbulos (HOSTOS, 1999). Experimentos *in vitro* utilizando coronina de *D. discoideum* fusionada com a proteína verde fluorescente (GFP) mostraram um forte envolvimento durante a citocinese, auxiliando na formação do anel de contração durante a última etapa de divisão celular (FUKUI *et al.*, 1999b). Em *Trichomonas vaginalis*, um dos primeiros organismos emergentes da linhagem eucariótica, coronina apresenta um importante papel na dinâmica, organização e regulação do citoesqueleto (BRICHEUX *et al.*, 2000).

Em *C. elegans* foram encontradas duas coroninas, uma não convencional, denominada POD-1, e uma convencional, codificada pelo gene R01H10.3. (YONEMURA & MABUCHI, 2001). POD-1 está envolvida na orientação da polaridade de embriões (RAPPEYE *et al.*, 1999). Embriões com deleção para o gene *pod-1* possuem assimetria física e molecular ao longo de seu eixo ântero-posterior, através da formação anormal de estruturas celulares, enormes vesículas de origem endocítica, protusões de membrana, divisões celulares instáveis e deposição de material extracelular (RAPPEYE *et al.*, 1999).

Em mamíferos, diferentes formas de coronina são encontradas em diferentes tecidos e células (HOSTOS, 1999). Em humanos, já foram caracterizados três tipos (IIZAKA *et al.*, 2000). Em neutrófilos humanos, a coronina (CORO1C) aparentemente está envolvida em três funções básicas: fagocitose (através da formação de pseudópodes), macropinocitose (através da formação de vesículas endocíticas) (GROGAN *et al.*, 1997) e ligação, regulação e translocação de componentes citosólicos da oxidase (proteínas p40phox, p67phox e p47phox da NADPH oxidase) para a membrana plasmática e para fagossomos em formação (GROGAN *et al.*, 1997; DIDICHENKO *et al.*, 2000). GROGAN *et al.* (1997) trabalharam com neutrófilos humanos e sugerem que a associação de coronina com endocitose tem sido conservada no curso da evolução. Assim como em *D. discoideum*, a coronina de humanos (COR2A) se

acumula com actina F ao redor de vesículas endocíticas. Nestas células, há relatos de que COR2A compreenderia 4% do total da proteína da célula, principalmente numa fração sedimentável (HOSTOS *et al.*, 1999). HOSTOS *et al.* (1999), IIZAKA *et al.* (2000) e outros autores acreditam que esta proporção possivelmente se mantenha nas células de quase todos os organismos nos quais coronina foi encontrada.

Neste trabalho, relatamos o isolamento e a caracterização de um cDNA incompleto que codifica uma provável proteína de citoesqueleto similar à coronina. Este cDNA foi isolado a partir de uma biblioteca de cDNA de glândulas salivares de fêmeas adultas de *B. microplus* parcialmente ingurgitadas, através de sondagem imunológica utilizando um anticorpo monoclonal contra uma proteína de intestino, denominado BrBm2. A seqüência parcial de nucleotídeos e a seqüência deduzida de aminoácidos do clone apresentaram similaridade com a coronina de outros organismos.

O estudo da coronina pode auxiliar numa melhor compreensão da fisiologia da glândula salivar do carrapato, já que a glândula salivar é um órgão envolvido na interação parasito-hospedeiro. Isto poderá auxiliar futuramente na escolha de proteínas candidatas antígenos vacinais contra *B. microplus*.

8 OBJETIVOS DO TRABALHO

1. Isolar genes expressos em uma biblioteca de cDNA obtida de glândula salivar de *B. microplus* para identificar proteínas de relevância para o desenvolvimento de vacinas.
2. Clonar e seqüenciar o cDNA do gene que codifica uma proteína de *B. microplus* similar a coronina.
3. Verificar a expressão da proteína similar à coronina em diferentes tecidos de *B. microplus*.

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Soluções e tampões

8.1.1 Tampões para eletroforese em gel de agarose

- TAE 50X – 242 g de tris-base, 57,1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0) e água destilada q. s. p 1 litro.
- Tampão de amostra (para géis de agarose) - azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%.

9.1.2 Tampões e soluções usados na sondagem imunológica e na sondagem com sonda de cDNA da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de *B. microplus*

- Tampão SM: 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl pH 7,0.
- Tampão SSC 20X: NaCl 3 M e citrato de sódio 0,3 mM, pH 7,0.
- Solução de desnaturação: NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M.
- Solução de neutralização: NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 7,5.
- Tampão de lavagem primário contendo uréia: uréia 6 M, SDS 0,4%, SSC 0,5X.
- Tampão de lavagem secundário: SSC 2X.
- Tampão PBS 20X: NaCl 3M, NaH₂PO₄ 0,2 M pH6,4.
- BLOTTO 5%: leite em pó desnatado 5% em PBS 1X.

9.1.3 Soluções para extração de DNA plasmidial em média escala

- Solução de Tris-EDTA: Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM pH 8,0.
- Solução de lise: NaOH 0,2%, SDS 1%.
- Solução de acetato de potássio 3 M, pH 4,8.
- Solução de PEG 8000 20%, NaCl 2,5 M.

- Solução de fenol tamponado (pH 8,0): fenol tamponado com solução de Tris-HCl pH 8,0 e hidroxiquinolina 0,01% (v/w).
- Solução de fenol/clorofórmio tamponado (pH 8,0): fenol tamponado com solução de tris-HCl pH 8,0, com clorofórmio (v/v) e hidroxiquinolina 0,01% (v/w).
- Solução de precipitação: acetato de sódio 3 M, pH 5,2.
- Tampão TE: tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.

9.2 Gel para eletroforese:

- Gel de agarose 0,8%: 0,8% de agarose diluída em TAE 1X (item 9.1.1), brometo de etídeo 5 µg/ml.
- Gel de agarose 1,5%: 1,5% de agarose diluída em TAE 1X (item 9.1.1), brometo de etídeo 5 µg/ml.

9.3 Eletroforese em gel de agarose

Todas as amostras de mRNA e cDNA foram aplicadas em géis de agarose juntamente com um tampão de amostra (item 9.1.1). Estes géis foram submetidos a uma diferença de potencial elétrico de 50 volts em tampão TAE 1X (item 9.1.1), em uma cuba de eletroforese de 13,5 cm de comprimento por 12 cm de largura, por um período de 20 min a 30 min. Para os clones de cDNA purificados da biblioteca de cDNA de glândulas salivares para o experimento de RACE (item 9.22) e amostras de mRNA extraídas para os experimentos de RT-PCR, bem como para a visualização dos amplicons do RT-PCR e do RACE foram usados géis de agarose de 1,5%. Para visualizar as extrações de DNA plasmidial em média escala, feitas a partir dos clones encontrados na triagem imunológica (item 8.19) e na triagem com sonda de cDNA (item 9.21) foram

utilizados géis de 0,8%. Os ácidos nucleicos foram corados com brometo de etídeo 0,5 µg/ml e visualizados pela exposição à luz ultravioleta.

9.4 Marcadores de massa molecular

- DNA de fago lambda *gt118* (Amersham Pharmacia Biotech) digerido com endonuclease de restrição *Hind* III (Amersham Pharmacia Biotech).
- Padrão de tamanho de fragmentos de DNA: ladder 100 pares de base (Amersham Pharmacia Biotech).

9.5 Meios de cultura

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

- LB líquido - NaCl 0,5%, extrato de levedura 0,5% e triptona 1%, pH 7,5.
- LB semi-sólido - LB líquido acrescido com 0,75% de ágar bacteriológico.
- LB sólido - LB líquido acrescido com 1,5% de ágar bacteriológico.
- Meio SOC incompleto: bactotriptona 20 g/l, extrato de levedura 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, KCl 2,5 mM.
- Meio SOC completo: meio SOC incompleto acrescido de MgCl₂ na concentração final de 10 mM e Glicose 20% na concentração final de 20 mM.

9.6 Antibióticos

- Ampicilina: 50 mg/ml (concentração de estocagem); 100 µg/ml (concentração de uso). Soluções preparadas em água destilada.

- Tetraciclina: 5 mg/ml (concentração de estocagem); 12,5 µg/ml (concentração de uso). Soluções preparadas em etanol absoluto.

9.7 Enzimas

- Enzimas de Restrição – todas as reações envolvendo enzimas de restrição foram feitas de acordo com as especificações do fabricante, sempre mantendo a proporção de enzima máxima em 10% do volume final das reações. Todas as enzimas foram estocadas a -20°C.

EcoRI – Cenbiot – UFRGS.

XhoI - Amersham Pharmacia Biotech

Hind III - Amersham Pharmacia Biotech

- Enzimas Polimerases – as reações utilizando as enzimas MMLV-RT (Gibco BRL, Life Technologies), Elongase Enzyme Mix (Gibco BRL, Life Technologies) e *Taq*-Polimerase (Cenbiot-UFRGS) foram conduzidas de acordo com as especificações dos fabricantes. As enzimas foram estocadas a -20°C.
- Enzima de ligação – as reações utilizando a enzima T4-DNA-Ligase (Gibco BRL) foram conduzidas de acordo com as especificações do fabricante.

9.8 Bacteriófagos

O bacteriófago λ Uni-ZAP[®] XR (Stratagene) foi utilizado para clonagem e sondagem imunológica da biblioteca de cDNA de glândulas salivares.

O bacteriófago "helper" ExAssist (Stratagene) foi utilizado para recuperação do plasmídeo pBlueScript[®] SK(-) (Stratagene) a partir do bacteriófago λ Uni-ZAP[®] XR.

9.9 Cepas bacterianas de *Escherichia coli*

TABELA I: Cepas bacterianas utilizadas

Cepa	Características	Marca
XL1-BLUE MRF'	$\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, [F'proAB, lacI ^q Z Δ M15, Tn10(tet ^r)]	BULLOCK <i>et al.</i> , 1987
SOLR™	e14 ⁻ (mcrA), $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 171, sbcC, recB, recJ, umuC::Tn5(kan ^r), uvrC, lac,gyrA96, relA1, thi-1, endA1, λ^R , [F'proAB, lacI ^q Z Δ M15]Su ⁻	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989
TOP10™	Rif ^r [F'proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r) (Kan ^r)]	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989

9.10 Plasmídeo utilizado

O plasmídeo pBlueScript[®] SK(-) (Stratagene) foi utilizado para as clonagens e possui o genótipo Amp^r, lacZ, ColE1 ori, MCS, f1.

9.11 Bibliotecas de cDNA

Foi utilizada para o isolamento do cDNA incompleto do clone SG5 uma biblioteca unidirecional de cDNA construída a partir de RNA poli (A)⁺ de glândulas salivares de partenóginas de *B. microplus*, utilizando o “kit” “cDNA Synthesis kit, ZAP-cDNA[®] Synthesis kit, and ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning kit” (Stratagene). Os cDNAs foram clonados no vetor “Uni-ZAP[®] XR” (Stratagene), nos sítios de restrição *EcoRI* e *XhoI*, conforme protocolo do fabricante.

Para os experimentos de RACE foi utilizada uma biblioteca unidirecional de cDNA construída a partir de RNA poli (A)⁺ de glândulas salivares de

partenóginas. Esta biblioteca foi construída usando o “kit” “SMARTTM PCR – cDNA Library Construction kit” (Clontech Laboratories, Inc.), seguindo as instruções do fabricante (C. A. FERREIRA, 1998, comunicação pessoal).

9.12 Preparação de células competentes para transformação bacteriana por eletroporação

A cepa bacteriana utilizada para a preparação de células competentes utilizadas para transformação por eletroporação foi *E. coli* XL1-Blue MRF' e estas células foram preparadas de acordo com o SAMBROOK *et al.* (1989). Um pré-inóculo de XL1-Blue MRF' com antibiótico em LB líquido foi deixado durante toda a noite a 37°C e deste pré-inóculo foi feito um inóculo de um litro na proporção 1/100 em LB líquido sem antibiótico. Este inóculo foi crescido sob agitação a 37°C até atingir a D.O. de 0,5 – 0,8, centrifugado a 4000Xg por 15 min e colocado em banho de gelo. O sobrenadante foi retirado, e o precipitado foi ressuscitado em um litro de água Milli-Q gelada e novamente centrifugado como no passo anterior. O sobrenadante foi novamente retirado, e o precipitado foi ressuscitado em 500 ml de água Milli-Q gelada e novamente centrifugado a 4000Xg por 15 min. Os 500 ml de sobrenadante foram descartados e o precipitado foi ressuscitado em 20 ml de glicerol 10%, seguida de nova centrifugação semelhante a etapa anterior. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 3 ml de glicerol 10% gelado. As células foram guardadas a – 70°C até o uso.

9.13 Clonagem

Para a ligação do inserto de DNA ao plasmídeo foram utilizados tampão de T4 DNA Ligase (item 9.7), plasmídeo (em uma concentração molar 3 vezes

superior a do inserto), inserto de DNA (em uma concentração não inferior a 20 ng e não superior a 50 ng), enzima T4 DNA Ligase (item 9.7) 1U/ μ l e água MILLI-Q para completar um volume total de 20 μ l. A reação foi deixada durante 18h a 16°C. Em seguida, a reação de ligação foi utilizada para transformação por eletroporação.

9.14 Transformação bacteriana por eletroporação

A transformação de bactérias por eletroporação foi feita segundo SAMBROOK *et al.* (1989). Em uma cuveta de eletroporação, foram misturados 200 μ l de células competentes (item 9.12) e 2 μ l de reação de ligação (item 9.13). Após um pulso de 2,5 KV, 200 OHMs de resistência e 25 μ FD, a cuveta foi lavada com 1 ml de meio SOC completo (item 9.5) e este meio contendo as bactérias transformadas foi vertido em placas de Petri contendo LB sólido (item 9.5) com ampicilina (item 9.6) e incubado durante a noite a 37°C.

9.15 Análise qualitativa e quantitativa dos ácidos nucléicos

A concentração dos ácidos nucléicos obtidos foi determinada por espectrometria utilizando um comprimento de onda de 260 nm. A qualidade dos ácidos nucléicos foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 9.3) e pela relação entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm.

9.16 Seqüenciamento do clone SG5

Foram utilizados, para o seqüenciamento do clone SG5, os oligonucleotídeos iniciadores universais M13F (3' - TGACCGGCAGCAAATG-5')

e T3 (5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG-3') com seqüências complementares flanqueando o sítio de inserção no vetor de clonagem utilizado, pBlueScript SK(-) (item 9.10).

Baseados na seqüência obtida do primeiro seqüenciamento utilizando os oligonucleotídeo iniciadores universais, foram feitos sete seqüenciamentos parciais do clone, cada qual utilizando um oligonucleotídeo iniciador interno sintetizado a partir da última seqüência obtida. Os oligonucleotídeos foram denominados SG5PF1, SG5PF2, SG5PF3, SG5PF4, SG5PF5, SG5PF6 e SG5PF7, respectivamente. As seqüências de nucleotídeos parciais obtidas foram analisadas pelos programas BLAST EMBnet (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e ExPASy Translate Tool (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

9.17 Animais

917.1 Bovinos

Foram utilizados bovinos da raça Hereford com aproximadamente 6 meses de idade, provenientes da região de Santa Vitória do Palmar (RS), livres de *Babesia spp* e *Anaplasma spp* e sem contato prévio com carrapato. Os animais foram mantidos em estábulos, no Setor de Entomozooses da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

9.17.2 Carrapatos

Carrapatos *B. microplus*, livres de *Babesia spp* e *Anaplasma spp*, do isolado Porto Alegre, obtidos por infestação experimental em bovinos, foram utilizadas como fonte de antígenos para os experimentos.

9.18 Obtenção de ovos, larvas e tecidos de glândula salivar, ovário, corpo gorduroso e intestino de teleóginas e partenóginas

9.18.1 Obtenção de teleóginas

As teleóginas foram coletadas após seu desprendimento dos bovinos estabulados com assoalhos vazados. As teleóginas foram assepsiadas com 3 lavagens intercaladas, de 30 s cada, de etanol 70% em água e 5 lavagens com água destilada estéril.

9.18.2 Obtenção de partenóginas

As partenóginas foram obtidas desprendendo-se diretamente e manualmente dos bovinos. A assepsia foi idêntica à das teleóginas.

9.18.3 Obtenção de glândula salivar, ovário, corpo gorduroso e intestino

Para dissecação, as fêmeas foram mantidas em PBS pH 7,5 gelado e estéril. A cutícula foi cortada com bisturi e as glândulas salivares, ovários, corpo gorduroso e intestino foram dissecados com pinças cirúrgicas e lupa. Após dissecação, os tecidos foram estocados em nitrogênio líquido até o uso.

9.18.4 Obtenção de ovos e larvas

Após completarem o ciclo parasitário, as teleóginas foram coletadas e lavadas. Posteriormente, foram incubadas à temperatura de 28°C em câmara úmida para postura.

Para a obtenção de ovos de 15 dias, os ovos foram coletados em tubos logo após a postura e mantidos por 15 dias na estufa a 28°C. Em seguida, foram congelados em nitrogênio líquido até o uso. Para obtenção de larvas de 15 dias,

os ovos foram incubados a 28°C em câmara úmida até a eclosão (cerca de 21 dias). As larvas foram separadas das cascas por fototropismo positivo e em seguida, foram congelados em nitrogênio líquido até o uso.

9.19 Triagem imunológica da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de *B. microplus*

9.19.1 Crescimento e preparação das bactérias

Uma colônia isolada da cepa de *E. coli* XL1-BLUE (tabela I) foi inoculada em 20 ml de LB líquido (item 9.5) contendo maltose 0,2% e incubada a 37°C com agitação constante até atingirem uma densidade óptica a 600 nm (A_{600}) entre 0,7 e 1,0. As bactérias foram centrifugadas a 4°C por 10 min a 5.000x g e ressuspensas em $MgSO_4$ 0,01 M, para uma $A_{600} = 0,5$ sob condições estéreis. As bactérias foram mantidas a 4°C e utilizadas em até 5 dias.

9.19.2 Infecção em meio líquido – plaqueamento dos bacteriófagos λ Uni-ZAP® XR

Foram misturados em tubos estéreis 200 μ l de bactérias (item 9.19.1) e os bacteriófagos Uni-ZAP® XR (Stratagene) provenientes da biblioteca e incubados por 15 min a 37°C. Para cada tubo foram adicionados 3 ml de LB semi-sólido (item 9.5) (mantidos a uma temperatura entre 42°C e 50°C) e os tubos vertidos, após rápida agitação, em placas de Petri contendo LB sólido (item 9.5) e maltose 0,2% pré-aquecida a 37°C. As placas foram incubadas entre 8 e 12 h a 37°C. O número de placas de lise por placa de Petri variou entre 300 e 1000, quando utilizadas diretamente da biblioteca amplificada. Foi feito um novo isolamento de pfus utilizando os bacteriófagos anteriormente isolados na triagem imunológica e na triagem com sonda de cDNA para se obter clones isolados. A concentração

de pfus por placa neste segundo isolamento foi menor de placa de lise, uma vez que o objetivo era purificações de placa.

9.19.3 Transferência para membrana de nitrocelulose

As placas de Petri contendo as placas de lise foram, imediatamente, após o término da incubação a 37°C, colocadas em contato direto com membranas de nitrocelulose em formato discóide, previamente umedecidas em IPTG 0,01 M. Após a identificação e marcação da posição na placa de Petri, as membranas permaneceram em contato por 3,5 h a 37°C.

9.19.4 Triagem com anticorpo monoclonal

As membranas de nitrocelulose retiradas das placas de Petri foram bloqueadas com BLOTTO 5% (item 9.1.2) por pelo menos 1 h. Terminado o tempo de bloqueio, as membranas foram sondadas com o anticorpo monoclonal obtido por nosso grupo de pesquisa contra uma proteína de intestino de carrapato, BrBm2 (TORO-ORTIZ *et al.*, 1997). As membranas foram lavadas 3 vezes com BLOTTO 5% por 10 min cada lavagem. Em seguida as membranas foram incubadas com IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas por 3 vezes com PBS (item 9.1.2), depois 2 vezes com tampão de lavagem primário e secundário, respectivamente (item 9.1.2), e em seguida submetidas à revelação utilizando o kit “ECLTM Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System”, da Amersham Pharmacia Biotech. Para a revelação das sondagens foi utilizado filme radiográfico “Kodak Diagnostic Film” (Kodak).

Os clones obtidos na triagem imunológica foram amplificados em tampão SM e todo o procedimento de triagem foi repetido novamente utilizando-os, com o objetivo de isolar entre as unidades formadoras de placas encontradas

inicialmente na hibridização somente bacteriófagos cujas proteínas hibridizaram com a sonda de anticorpo.

9.20 Expressão de mRNA em tecidos

9.20.1 Purificação de RNA poli-A⁺

RNA poli-A⁺ foi purificado a partir de tecidos de *B. microplus* congelados em nitrogênio líquido e de sangue bovino coletado em frasco com anti-coagulante (heparina). O protocolo de extração de mRNA se baseia na lise das células por congelamento do tecido em nitrogênio líquido, seguido de maceração com tampão de extração, desnaturação de proteínas e DNA genômico e sua posterior sedimentação e, por fim, a separação de mRNA por coluna contendo resina de celulose e oligo dT. Nesta coluna é então adicionado o tampão de eluição, e o mRNA é coletado no lavado da coluna.

Para a purificação do RNA poli-A⁺ foi utilizado o “Quick Prep Micro mRNA purification kit” (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo protocolo do fabricante. Após quantificação em espectrofômetro em comprimento de onda de 260 nm, o RNA purificado foi estocado a -70°C até o uso.

Foram purificados RNA poli-A⁺ de glândula salivar, intestino, ovário e corpo gorduroso de partenóginas e teleóginas, larva e ovos de 15 dias e sangue bovino, para ser usado como controle. O RNA poli-A⁺ foi utilizado nos ensaios de RT-PCR.

9.20.2 Quantificação e análise do mRNA extraído

A concentração do mRNA extraído dos tecidos de *B. microplus* como descrito na etapa acima foi determinada por espectrofotometria $A_{260\text{ nm}}$ e a sua qualidade foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,8% e pela

relação entre as absorvâncias de 260/280 nm. Todo o material utilizado para a eletroforese foi tratado com solução NaOH 0,1 N e H₂O₂ 3% por 15 min ou autoclavado, como no caso do tampão de eletroforese TAE 1X (SAMBROOK *et al.*, 1989).

9.20.3 RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

Para verificar a expressão de coronina em diferentes tecidos, foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores denominados BmCorFor1 (5'-CGACCACGACACAAAGATGG-3') e BmCorRev333 (5'-ACAGGAACCCGATACTGATTTTC-3') baseados na seqüência conhecida do gene codificante da proteína de *B. microplus* semelhante a coronina.

As reações de transcrição reversa (RT) com os oligonucleotídeos iniciadores acima foram feitas seguindo o protocolo abaixo:

500 ng de mRNA poli-A+ purificado

100 ng de oligodT

H₂O q. s. p 12 µl

Esta reação foi incubada por 15 min a 70°C e em seguida por 5 min em banho de gelo. Passado o tempo das incubações, foram acrescentados à reação:

4 µl de tampão First Strand 5X (Gibco BRL, Life Technologies)

2 µl DTT 100 mM

1 µl dNTPs 10 mM

Esta reação foi novamente incubada por 5 min a 37°C. Em seguida foi adicionada 1 µl da enzima MMLV-RT (200 U/µl) e incubada por 2 h a 37°C.

O controle negativo do RT-PCR foi feito seguindo todo o protocolo descrito acima, mas não acrescentando a enzima MMLV-RT à reação.

9.20.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Para as reações de PCR foram utilizados:

Amostras

2 µl da reação de RT (500 ng de cDNA de SG5).

20 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (BmCorFor1 e BmCorRev333)

5 µl de Tampão *Taq-Polimerase* 10X com MgCl₂ 15 mM

2 µl dNTPs 10 mM

0,5 µl da enzima *Taq-Polimerase* (Cenbiot) 5 U/µl

H₂O Milli-Q q. s. p 50 µl

Controle positivo com Actina

2 µl da reação de RT (500 ng de cDNA de actina).

20 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (BmAct2 e BmAct3)

5 µl de Tampão *Taq-Polimerase* 10X com MgCl₂ 15 mM

2 µl dNTPs 0,01 M

0,5 µl da enzima *Taq-Polimerase* (Cenbiot) 5 U/µl

H₂O Milli-Q q. s. p 50 µl

Depois das misturas prontas, estas foram colocadas em um termociclador MiniCycler (MJ Research), que foi programado para 1 ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 48°C, 30 s a 72°C; e 1 ciclo de 3 min a 72°C.

O DNA de SG5 foi utilizado como controle do PCR. A amplificação de um fragmento do gene de actina de *B. microplus* foi utilizado como um dos controles das reações de RT-PCR. Dois oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados:

BmAct2 - 5' GGGGTGTAGAAGGAAGG 3'

BmAct3 - 3' GCATCCACGAGACCACG 5'

Os produtos de RT-PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% (item 9.2) com brometo de etídeo 0,5 µg/ml.

9.21 Triagem das bibliotecas de cDNA

9.21.1 Extração de DNA plasmidial em média escala para preparação de sonda para a triagem

Foram feitas diversas preparações de DNA em média escala segundo SAMBROOK *et al.* (1989). *E. coli*, cepa XL1-BLUE MRF', contendo o plasmídeo com o inserto do cDNA de coronina de *B. microplus* clonado no plasmídeo pBlueScript® II SK(-), da Stratagene. Foram crescidas bactérias desta cepa com plasmídeo contendo o inserto em 25 ml de LB líquido com ampicilina em uma concentração de 50 µg/ml durante a noite. A partir destas culturas foram feitas as extrações de DNA plasmidial, que foram quantificadas por espectrofotometria utilizando os comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, para se determinar a concentração de DNA plasmidial e proteínas da preparação.

9.21.2 Análise de restrição e purificação de DNA plasmidial a partir de gel de agarose

O cDNA preparado nas extrações de DNA plasmidial foi submetido a uma análise de restrição com as endonucleases *EcoRI* e *XhoI*. Em seguida, foram purificados os fragmentos de 800 e 500 pb a partir do gel de agarose, utilizando o “kit” de purificação “Matrix Concert Prep” (Gibco BRL, Life Technologies). Foram cortados pedaços do gel de agarose contendo os fragmentos a serem purificados. Após, estes pedaços foram solubilizados com um tampão de solubilização, a solução foi incubada juntamente com a resina a 55°C por 1h.

Depois se lavou várias vezes a resina contendo o DNA plasmidial ligado com tampões de alta e baixa salinidade e, por fim, a resina foi eluída com tampão de eluição. A purificação foi quantificada como descrito no item 9.15.

9.21.3 Preparação das membranas com bacteriófago

E. coli cepa XL1-BLUE MRF' suspensas em MgSO₄ 10 mM e bacteriófagos λ Uni-ZAP® XR (Stratagene) (provenientes da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de fêmeas adultas parcialmente ingurgitadas) foram misturados em LB semi-sólido (item 9.1.2) a 42°C, plaqueados em meio LB (item 9.1.2) numa concentração entre 700 e 900 p.f.u. por placa e incubados a 37°C por toda a noite. Sobre estas placas foram postas membranas de nylon N+, (Amersham Pharmacia Biotech), durante 5 min. Estas membranas foram retiradas, tratadas com tampões de desnaturação e neutralização (Item 9.1.2.), incubadas a 80°C e armazenadas entre folhas de papel filtro até o momento da sondagem.

9.21.4 Triagem da Biblioteca de cDNA com Sonda de cDNA

A sonda de cDNA de coronina de *B. microplus* purificada como descrito acima foi marcada utilizando um “kit” a base de quimioluminescência por peroxidase (ECL™ Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems, Amersham Pharmacia Biotech), usando uma membrana na qual foi aplicada 1 ng de cDNA de coronina de *B. microplus* como controle positivo e uma membrana na qual foi aplicada 1 ng de um cDNA não relacionado como controle negativo. As membranas foram cobertas com tampão de hibridização presente no “kit”, sendo colocadas para pré-hibridizar a 42°C por 30 min com agitação em um forno Rotissérie (Amersham Pharmacia Biotech). Após, a sonda marcada com peroxidase conforme as instruções do “kit” foi adicionada às membranas, que permaneceram no forno com agitação e à mesma temperatura por 18 h. Após,

as membranas foram lavadas duas vezes por 10 min com tampão de lavagem primária com uréia (item 9.1.2) e duas vezes por 5 min com tampão de lavagem secundário (item 9.1.2). Para a revelação das sondagens foi utilizado filme radiográfico “Kodak Diagnostic Film”, (Kodak).

Os clones obtidos na triagem foram amplificados em tampão SM e todo o procedimento de triagem foi repetido novamente utilizando-os, com o objetivo de isolar entre as unidades formadoras de placas encontradas inicialmente na hibridização somente bacteriófagos cujos cDNAs hibridizaram com a sonda.

9.21.5 Extração de plasmídeo do fago e clonagem em SOLR usando fago "ExAssist Interference-Resistant HelperTM"

Os fagos que cujo cDNA hibridizou com a sonda de cDNA de coronina na sondagem tiveram seu plasmídeos extraídos seguindo as instruções do “kit” utilizado para a montagem da biblioteca (item 9.11) e clonados em *E.coli* cepa SOLR (item 9.9), utilizando o fago "ExAssist Interference-Resistant HelperTM“ (Stratagene), segundo as instruções do fabricante.

9.22 RACE

9.22.1 Extração de cDNA da biblioteca para o RACE

Alíquotas de 1,5 ml da biblioteca de cDNA com um total de 5×10^9 pfu (item 9.11) foram utilizadas para extração de cDNA. Inicialmente, as alíquotas foram desnaturadas em banho-maria, 100 °C por 10 min. Após a desnaturação, um volume equivalente de fenol tamponado (item 9.1.3) foi adicionado às alíquotas e estas foram centrifugadas por 5 min, a 12.000 g. O procedimento foi repetido utilizando em seguida fenol-clorofórmio (v/v) e por último somente clorofórmio. O

cDNA extraído foi precipitado com solução de PEG 8000 13% e NaCl 1,6 M por 1h, centrifugado e ressuspendido em água MilliQ num volume final de 100 μ l.

9.22.2 Confirmação da qualidade do cDNA extraído

Para confirmar se a qualidade e a quantidade do cDNA eram suficientes para os experimentos, 10 μ l da solução de cDNA foram testados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 9.2).

9.22.3 PCR-teste

Para verificar a presença ou não da seqüência relacionada à coronina de *B. microplus* na biblioteca utilizada, foi feito um PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando dois oligonucleotídeos sintetizados a partir da seqüência parcial de cDNA com seqüência similar à coronina já obtida (5'-CGACCACGACACAAAGATGG-3', denominado BmCorFor1 e 3'-ACAGGAACCCGATACTGATTTC-5', denominado BmCorRev333). BmCorFor1 possui uma temperatura de anelamento de 53,6 °C e BmCorRev333 uma temperatura de anelamento de 51,5 °C.

Na reação de PCR foram utilizados os seguintes parâmetros:

- cDNA: 200 ng
- Oligonucleotídeo BmCorFor1: 20 pmoles
- Oligonucleotídeo BmCorRev333: 20 pmoles
- Tampão para DNA polimerase
- dNTPs 10 mM
- Polimerase (*Taq*-Polimerase ou Elongase)
- Água q.s.p. 50 μ l

Para as reações de amplificação foi utilizado um termociclador MiniCycler™, da MJ Research, Inc. O programa utilizado foi adaptado de acordo com a DNA-polimerase utilizada:

- Elongase Enzyme Mix (Gibco BRL, Life Technologies):

1 ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 48°C, 30 s a 68°C; e 1 ciclo de 3 min a 68°C.

- *Taq*-Polimerase (Cenbiot - UFRGS)

1 ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 48°C, 30 s a 72°C; e 1 ciclo de 3 min a 72°C.

O resultado foi analisado por eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% (item 9.2).

9.22.4 RACE (rapid amplification of cDNA ends)

Para as reações de amplificação de cDNA da biblioteca de cDNA em vetor de glândulas salivares por RACE foram sintetizados dois oligonucleotídeos, um similar à seqüência do oligonucleotídeo utilizado para amplificação de longa distância por PCR (LD PCR) no “kit” utilizado para a construção da biblioteca (9.11), e outro baseado na seqüência parcial do cDNA similar à coronina já conhecida. O oligonucleotídeo sintetizado similar ao do “kit” (5'-TACGGCTGCGAGAAGACGACAGAA-3') foi denominado BmLD-CAP e possui temperatura de anelamento de 61,9 °C e o oligonucleotídeo sintetizado a partir da seqüência parcial de cDNA já obtida (5'-AGTCTTCATAGAAATCAGTATCGGGTTCCTGT-3') foi denominado BmRev-RACE e possui temperatura de anelamento de 61,7 °C.

Para as reações de amplificação foi utilizado um termociclador MiniCycler™, da MJ Research, Inc. O programa utilizado foi adaptado de acordo com a polimerase utilizada:

- Elongase Enzyme Mix (Gibco BRL, Life Technologies):

1 ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 10 min a 61°C, 1 minuto a 68°C; e 1 ciclo de 3 min a 68°C.

- *Taq*-Polimerase (Cenbiot enzimas, UFRGS):

1 ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 10 min a 61°C, 1 minuto a 72°C; e 1 ciclo de 3 min a 72°C.

Como controle interno do RACE foram utilizados os oligonucleotídeos e a reação de PCR iguais a do PCR-teste.

9.22.5 Purificação, ligação e clonagem dos amplicons do RACE

Para a purificação dos amplicons entre 1.000 e 2.000 pb obtidos do PCR e visualizados no rastro formado em gel de agarose 1,5% foram cortados pedaços de gel de agarose contendo estes fragmentos e foi usado o “kit” de purificação “Matrix Concert Prep” (Gibco, Life Technologies), segundo protocolo do fabricante. Após a mistura de cDNAs obtidos foi purificada novamente usando colunas com resina Sephacril™ HR “MicroSpin™ S-400 HR Columns” (Amersham Pharmacia Biotech). O cDNA purificado foi usado para a reação de ligação ao vetor de expressão (item 9.10). Após a ligação, células competentes *E. coli* cepa TOP10 (item 9.9) foram transformadas por eletroporação com vetor contendo os insertos (item 8.14).

10 RESULTADOS

10.1 Triagem imunológica da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de *B. microplus* e obtenção do clone SG5

A triagem imunológica da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de *B. microplus* utilizando o anticorpo monoclonal BrBm2 (TORO-ORTIZ *et al.*, 1997) como sonda resultou na detecção de 3 clones, de um total de 40.000 pfus, como aparecem na Figura 1.

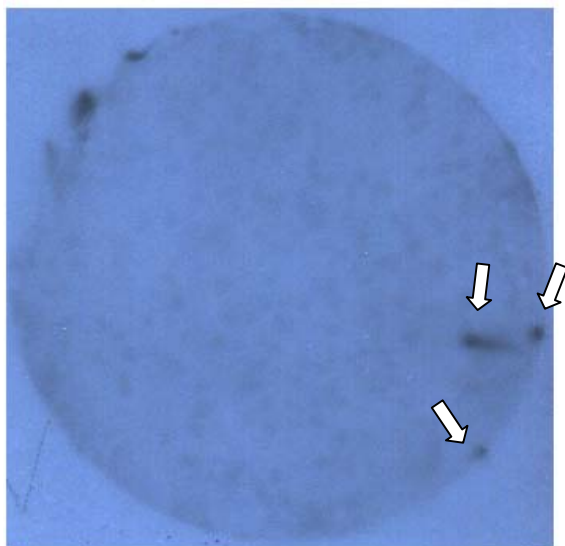


Figura 1. Auto-radiografia da membrana de nitrocelulose contendo cDNA dos clones encontrados na sondagem imunológica utilizando o anticorpo monoclonal BrBm2 como sonda. As setas indicam a posição dos clones.

A triagem imunológica foi repetida novamente, utilizando as pfus detectadas na primeira triagem com o intuito de isolar somente os fagos que continham os insertos de cDNA cujas proteínas foram detectadas pelo anticorpo. Estes, então, tiveram seus plasmídeos extraídos e clonados em *E. coli* cepa

SOLR (item 9.9). Os clones, cuja análise de restrição pode ser vista na Figura 2, foram caracterizados utilizando as endonucleases *EcoRI* e *XhoI* e tiveram sua seqüência de ácidos nucléicos parcialmente determinada no laboratório de seqüenciamento MGIF Research Services, na Universidade da Georgia, Estados Unidos. O clone que foi nomeado SG5, cuja seqüência apresenta similaridade com genes de coronina de outros organismos, foi selecionado para melhor caracterização. O clone SG6 apresentou similaridade com gene de proteína ligante de retinoblastoma o clone SG7 não apresentou similaridade com nenhuma seqüência presente no GeneBank.

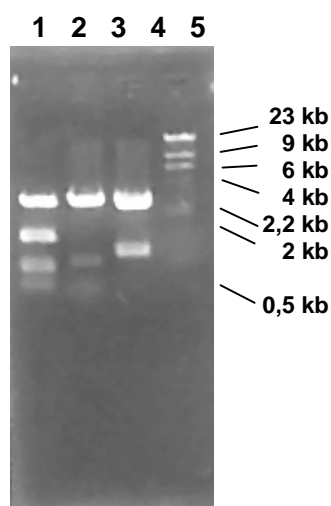


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da análise de restrição dos clones encontrados na sondagem imunológica da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de *B. microplus*. Para a análise de restrição foram utilizadas as endonucleases *EcoRI* e *XhoI*. 1 – marcador de massa molecular DNA Lambda *Hind III*; 2 – clone SG5; 3 – clone SG6; 4 – clone SG7.

10.2 Análise da seqüência de SG5

O clone SG5 contendo um inserto de aproximadamente 2.000 pb teve sua seqüência determinada. Inicialmente, utilizou-se para o seqüenciamento os oligonucleotídeos iniciadores universais M13F e T3 (item 9.16) com seqüências complementares flanqueando o sítio de inserção no vetor de clonagem utilizado, pBlueScript SK(-) (item 9.10).

Baseados na seqüência obtida na primeira reação de seqüenciamento utilizando os oligonucleotídeos iniciadores universais foram feitas sete reações de seqüenciamento parciais do clone, cada qual utilizando um oligonucleotídeo iniciador interno sintetizado a partir da última seqüência obtida. Os oligonucleotídeos foram denominados SG5PF1, SG5PF2, SG5PF3, SG5PF4, SG5PF5, SG5PF6 e SG5PF7, respectivamente, e suas seqüências podem ser vistas na Figura 3. As seqüências de nucleotídeos parciais obtidas foram analisadas pelo programa BLAST EMBnet (ALTSCHUL *et al.*, 1997). O clone cuja seqüência foi determinada apresentou uma suposta fase de leitura de 960 nucleotídeos e um suposto códon de terminação na posição 963.

A partir da seqüência de nucleotídeos de SG5, foi obtida a seqüência deduzida de aminoácidos que pode ser vista na Figura 3. Para a determinação da seqüência deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos foi utilizado o programa Expasy Translate Tool (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

```
1   cgaccacgacacaaagatggtctacattgctggcaagggtgacggtaaccatccgctactat
    T T T Q R W S T L L A R V T V T I R Y Y   20
62  gagctggtgaacgaggccccctggtgccactacctgaaccagttcctgactggctgtccc
    E L V N E A P W C H Y L N Q F L T G C P   40
122 caacgaggggctgggggtgcatgcccaaggcaggcctcgacgtacgaagctgaggggtcttc
    Q R G L G C M P K A G L D V R S C E V F   60
182 cgcttctacaagctgcatgccactcgagggtctgcaacccatctccatgatcgtgcct
    R F Y K L H A T R G L C E P I S M I V P   80
242 cgaaagtcggaacagttccaagacgacctcttcccagacacagcagcaaccgacaccagcc
    R K S E Q F Q D D L F P D T A A P T P A   100
302 ttaacagcagaggagtggctcagtggaaagaacaggaacccgatactgatttctatgaag
    L T A E E W L S G K N R N P I L I S M K   120
362 actggtgcaggtgcgcgcacccacaagccggtgatgtacaactcggaacggaacctcgtc
    T G A G A R T H K P V M Y N S E R N L V   140
```

422 acggccgaccgaaacaacgagcgaaagtcatgttcatctctcaaacgaacaacgtggac 160
T A D R N N E R K F M F I S Q T N N V D
482 **taccgagagaaagcgaat**cacgccaataacaacaatcaccaccacgaaaagaacaaccac 180
Y R E K A N H A N N N N H H H E K N N H
542 gattcgcgcgagcataacaacaacgcagtcaatggaaactcaggccagcaccgcgatacag 200
D S P Q H N N N A V N G N S G Q H P H T
602 actatgatcgtcggaggtagtgggccgtcccc**tctgaagcgacacc**agggtcagcacttc 220
T M I V G G S G P S P L K R H Q G Q H F
662 ggggtggcgtcagtgagtgaccgcggtcgcaaccagaacagcccatctgcgacgtggtc 240
G W R H V S A P R S Q P E Q P I C D V V
722 tcgagccacaccctgccggtggccacgtatagtcacccatgtcaccatccaggaccacgac 260
S S H T L P V A T Y S H H V T I Q D H D
782 agcagctccagcgagccagagttggatggcgaagtgcctcaatctgaggaggagttgcgc 280
S S S S E P E L D G E V P Q S E E E L R
842 aaggccttcaggaaccaaagtgcagagctgcccggctgcgaaccagctggccagcaag 300
K A F R N Q S A E L R R L R T Q L A S K
902 gacaagaaaatccaagaactggagagccag**ctccaattacaggcacacaac**ggcggctgc 320
D K K I Q E L E S Q L Q L Q A H N G G C
962 **tag**gagggcgccacctgcccaggccacgaagcaatgccgatgtgcactgaagactgtacaa
-
1022 agcctcccgtcatggaagcagtttctcacaacgagctaaaacagctgccactgcccct
1082 tcgcaggttgcccttccttgtaaatgcaggccttagatgcgatgagctgtgcaatgctctt
1142 tgtgcagggaaactaccgcttgcttctgagggcatccacgtaagtgggggagggacgtg
1202 gccctctagattgcaccgctcgttctctgcccaatgctggatgataaactcaatgtgcaa
1262 gcctaccgcgaatgt**gcaagcctaccgcgaatg**tctggctcgcatatgtgcaatctgctc
1322 gtgttgtaaaagatgagcgacacatgagagtagcacttaggggtgcaccttgcaagtgcg
1382 ttogaaaaaagtgctcatcatcctgtgtcttgctatctctgtgccactactcatcaaggc
1442 attcacgcaaagcctcaga**caggcattgcacgagagc**aaaaatgctgctcgtgcaatgcag
1502 gcgtgcaaatcagttagaatattgtttgttctttttgagcgcctagcaaacgtatgaaa
1562 taataccgagaatgtaacaaactatacactatagaggaaaaaatgtacgagcgggttaaag
1622 cttaacttcaacaccggttgctgcagctccacgtataccgagcttttatattttgtcaata
1682 ttccattttttggctgcgggtgt**acagttgtgtgtccagattg**ttttgtataaacatgt
1742 taatgctaagtcagcagtgctgtaagagctgcataaaatgtgctcgatttatggttgat
1802 ttttttttctttaccagaccaaggtctattatgaaatttctatgcaacgctcctttggct
1862 tggaa**aataaa**tgtttcccatcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 3. Seqüência de nucleotídeos do clone SG5 e sua respectiva seqüência deduzida de aminoácidos. Em verde, vermelho, rosa, azul, laranja, lilás e marrom: seqüências dos oligonucleotídeos internos usados no primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto, sexto e sétimo seqüenciamentos (SG5PF1, SG5PF2, SG5PF3, SG5PF4, SG5PF5, SG5PF6 e SG5PF7), respectivamente; em vermelho, itálico e sublinhado: provável códon de terminação; em negrito sublinhado: região dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de

RT-PCR; em amarelo: região dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos de RACE; em azul claro: sinal de poliadenilação.

Para estimar o ponto isoelétrico e a massa molecular relativa do fragmento da proteína foi utilizado o programa ExPASy Translate Tool (ALTSCHUL *et al.*, 1990). A suposta porção traduzida da proteína possui 320 aminoácidos, ponto isoelétrico de 8,44 e uma massa molecular relativa de 36.192,3 Da.

A Figura 4 mostra o alinhamento feito da seqüência de aminoácidos deduzida da suposta região codificante da proteína semelhante a coronina de *B. microplus* com outras quatro seqüências de coroninas – duas de humano (COR2A e COR2B, número de acesso no GenBank NP_438171 e XP_035403, respectivamente), uma de camundongo (*M. musculus*) (número de acesso NP_035909) e uma de sapo (*X. laevis* número de acesso BAA83801). Estas seqüências foram obtidas do banco de dados GeneBank e o alinhamento foi realizado utilizando o programa "ClustalW Multiple Sequence Alignment" versão 1.8.

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90	
<i>M. musculus</i>	-MSRQVVRSSKFRHV	FGQPAKADQCYEDVR	VSQTTWDSGFCVNP	KFMALICEASGGGAF	LVLPLGKTGRVDKNV	PLVCGHTAPVLLDIAW							89
<i>X. laevis</i>	--MRRVVRQSKFRHV	FGQALKNDQCYDDIR	VSRVTWDSDFCAVNP	NFVAIIIEASGGGAF	LVLPLQKSGRIDKAY	PTVCGHTGPDLDIDW							88
COR2A <i>H. sapiens</i>	MSWHPQYRSSKFRHV	FGKPASKENCYDSVP	ITRSVHDNHFCVNP	HFIADVTECAGGGAF	LVIPLHQTKGLDPHY	PKVCGHRGNVLDVKW							90
COR2B <i>H. sapiens</i>	MSWRPQYRSSKFRNV	YGKVANREHCFDGI	ITKNVHDNHFCVNT	RFLAIVTESAGGGSF	LVIPLQGTGRIEPNY	PKVCGHQGNVLDIKW							90
SG5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	28
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180	
<i>M. musculus</i>	CPHNDNVIASGSEDC	TVMVWEIPDGGGLVLP	LRPVTLEGHTRKRV	GIVAWHPTAQNVL	AGCDNVILVWDVG--	-TGAAVLTGPDVHP							176
<i>X. laevis</i>	CPHNDNVIASGSEDC	TVMVWQIPENGLTIP	LTDPVVVLEGHSKRV	GIVTWHPTARNVLLS	AGCDNAIIIWNVG--	-TGEPLINL-EDMHN							174
COR2A <i>H. sapiens</i>	NPFDDFEIASCSEDA	TIKIWSIPKQLLTRN	LTAYRKELVGHARRV	GLVEWHPTAANILFS	AGYDYKVMIWNLDTK	ESVITSPMSTISCHQ							180
COR2B <i>H. sapiens</i>	NPFIDNIIASCSEDT	SVRIWEIPEGGLKRN	MTEALLELHGHSRRV	GLVEWHPTTNNILFS	AGYDYKVLIIWNL	---VGEPVKMIDCHT							175
SG5	CHYLNQFLTGCPCQ--	-RGLGCMFKAGLDVR	SCEVFRFYKLAHTRG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	82
	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270	
<i>M. musculus</i>	DTIYSVDWSRDGALI	CTSCRDKRVRVIEPR	KGTVVAEKDRPHEGT	RPVHAVFVS-EGKIL	TTGFSRMSERQVALW	DTKHLEEPLSLQELD							265
<i>X. laevis</i>	DMIYSVCWNRNGSLI	CTAGKDKKLLVIDPR	KMEVVSEKKAHEGA	RPMRAIFLS-DGNVF	TTGFSRMSERQLALW	NPKNMDEPIALHEMD							263
COR2A <i>H. sapiens</i>	DVILSMSFNTNGSLL	ATTCKDRKIRVIDPR	AGTVLQEAS--YKGH	RASKVLFGLNKKLM	STGTSRWNNRQVALW	DQDNLSVPLMEEDLD							268
COR2B <i>H. sapiens</i>	DVILCMSFNTDGSLL	TTTCKDKKLRVIEPR	SGRVLQEAN--CKNH	RVNRVVFGLNMKRL	TTGVSRWNRQIALW	DQEDLSMPLIEEED							263
SG5	SEQFQDILFPDIAAP	TPALTAEEWLSGKNR	NPILISMKTG--AGA	RTHKPYMYN-----	-----	SERNLVTA	DRNNERKFMFISQTN						157
	271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360	
<i>M. musculus</i>	TSSGVLPPFFDPDTN	IVYLCGKGDSSIRYF	EITSEAPFLHYLSMF	SSKESQRGMGYMPKR	GLEVNKCEIARFYKL	HERK--CEPIAMTVP							353
<i>X. laevis</i>	TSNGVLLPFYDPDTN	IIYLCGKGDSSIRYF	EITDESPYVHYLNTF	SSKEPQRGMGYMPKR	GLDVNKCEIARFYKL	HERK--CEPIIMTVP							351
COR2A <i>H. sapiens</i>	GSSGVLFPFYDADTS	MLYVVGKGDGNIRYY	EVSADKPHLSYLTTEY	RSYNPQKGGVMPKR	GLDVSCEIFRFYKL	ITTKSLIEPISMIVP							358
COR2B <i>H. sapiens</i>	GLSGLLFPFYDADTH	MLYLAGKGDGNIRYY	EISTEKPYLSYLMEF	RSPAPQKGLGVMPKH	GLDVSACEVFRFYKL	VTLKGLIEPISMIVP							353
SG5	NVDYREKANHANNNN	HHHEKNNHDSPOHNN	NAVNGNSGQHPHTTM	IVG----GSGPSPLR	RLQGQHFQWFHVSAP	RSLP--EQPICDVVP							241
	361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450	
<i>M. musculus</i>	RKSDLFQEDLYPPTA	GPDPALTAEEWLGGR	DAGPLLLISLKDG---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	396
<i>X. laevis</i>	RKSDLFQDDLYPDTA	GPDAPIEAEDWFDGK	NADPVLISLKQG---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	394
COR2A <i>H. sapiens</i>	RQSESYQEDIYPPTA	GAQPSLTAQEWLSGM	NRDPILVSLRPGSEL	LRPHPLPAERPFI	MAPASPRLLNQTEKL	AAEDGWRSSSLLEEK							448
COR2B <i>H. sapiens</i>	RRSDSYQEDIYPMTP	GTEPALTPDEWLGGI	NRDPVLMSLKEG---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	399
SG5	SHTLPVATYSHHVTI	QDHDSSSSEPELDG-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	270
	451	465	466	480	481	495	496	510	511	525	526	540	
<i>M. musculus</i>	VPPKSRELRVNRG--	-----LDSA	RRRATPEPSGTPSSD	TVSRLEEDVRNLNAI	VQKLQERLDRLEETV	QAK-----							461
<i>X. laevis</i>	VPTKGRDLNVVKKNI	LGSKPAAHKKAEPAS	APKKMAETSHPPNDD	KVDDIMMELRSMKET	MRRHGERIAKLEDIV	ASLTTNDESEE							480
COR2A <i>H. sapiens</i>	MPRWAAEHRLEEKKT	-----WLTNGFD	VFECPPFKTENELQ	MFYRQOEIIRRLREL	LTQREVQAKQLELEI	KNLRMGSEQL-							525
COR2B <i>H. sapiens</i>	S-KMVFKAPIKEKKS	-----VVVNGID	LLENVPPRTENELLR	MFFRQOEIIRRLKEE	LAQKDIRIROLQLEL	KNLRNSPKNC-							475
SG5	-----	-----	-----EVPQSEELRK	AFRNQSAELRRLRTQ	LASKDKKIQELESQ	QLQAHNGGC--							320

Figura 4. Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos de coronina de outras espécies (*M. musculus*, *X. laevis* e *Homo sapiens*) com a seqüência de aminoácidos deduzida do clone SG5.

10.3 Expressão de mRNA de SG5 em *Boophilus microplus*

Os RT-PCRs feitos com os de mRNA de glândula salivar, ovário, intestino e corpo gorduroso de partenóginas e teleóginas e ovo e larva de 15 dias foram feitos como descrito no item 9.20, com o objetivo de verificar a expressão de mRNA de SG5 em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento do carrapato. Com exceção de corpo gorduroso, em todos os outros tecidos, tanto de partenóquina quanto de teleóquina, foi observada a amplificação de uma banda de 355 pb, tamanho esperado para o fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos sintetizados a partir da seqüência do clone SG5 (item 9.20.3) (Figura 5A), indicando a expressão de mRNA do gene que codifica a proteína similar à coronina. O controle positivo, um fragmento de gene actina obtido em nosso grupo de pesquisa (item 9.20.3), amplificou um fragmento de 339 pb em todos os tecidos testados, como mostra a Figura 5B. Nenhum produto de amplificação foi visto no controle negativo (Figura 5C).

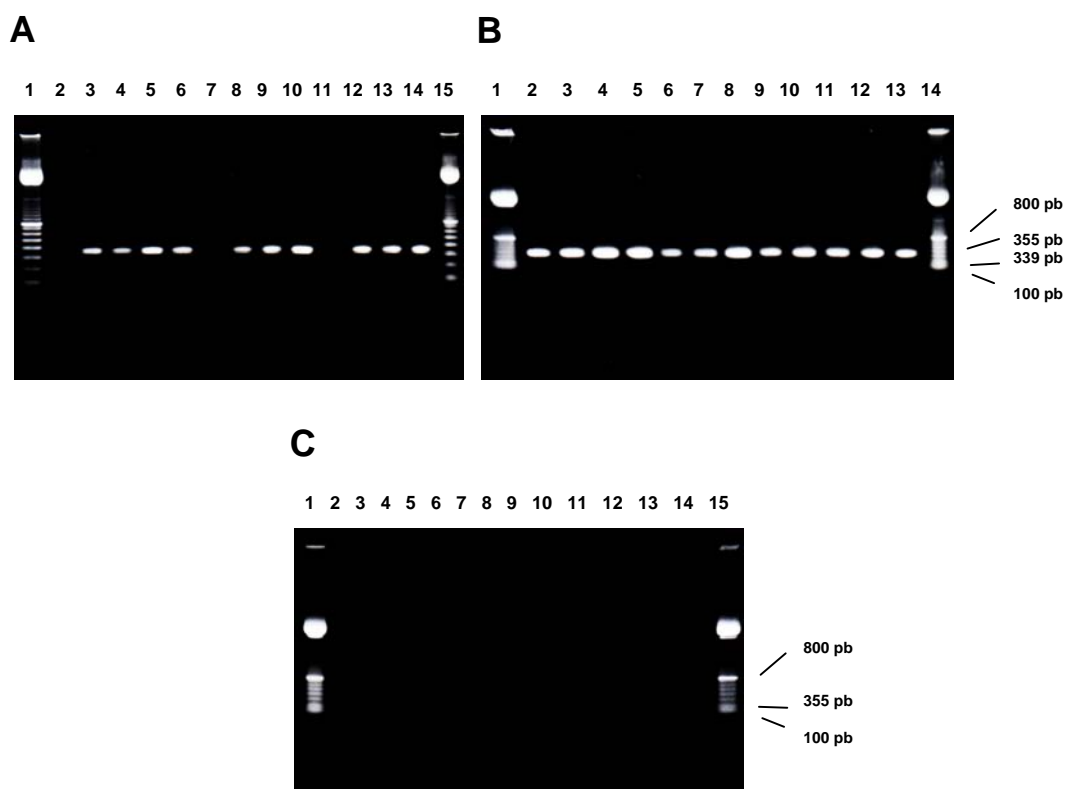


Figura 5. **A** – RT-PCR feito a partir dos tecidos de *B. microplus*. 1 e 15 – marcador de massa molecular ladder 100 pb; 2 – controle negativo do RT-PCR; 3 – controle positivo do RT-PCR usando oligonucleotídeos sintetizados a partir da seqüência do gene de actina e mRNA extraído de tecido de ovário de partenógina; 4 – controle positivo do PCR usando o cDNA de SG5; 5 e 6 – RT-PCR de ovos e larvas de 15 dias, respectivamente; 7 a 10 – RT-PCR de corpo gorduroso, glândula salivar, intestino e ovário de partenógina, respectivamente; 11 a 14 - RT-PCR de corpo gorduroso, glândula salivar, intestino e ovário de teleógina, respectivamente. **B** – controles positivos do RT-PCR e PCR utilizando gene de actina de *B. microplus* e o cDNA de SG5. 1 e 14 – marcador de massa molecular ladder 100 pb; 2 e 3 – ovos e larvas de 15 dias; 4 a 7 – corpo gorduroso, glândula salivar, intestino e ovário de partenógina, respectivamente; 8 e 9 – controle positivo do PCR usando o cDNA de actina e SG5, respectivamente; 10 a 13 – RT-PCR de corpo gorduroso, glândula salivar, intestino e ovário de teleógina, respectivamente. **C** – controles negativos do RT-PCR e PCR. 1 e 15 – marcador de massa molecular ladder 100 pb; 2 e 3 – RT-PCR de ovos e larvas de 15 dias; 4 a 7 – RT-PCR de corpo gorduroso, glândula

salivar, intestino e ovário de partenógina, respectivamente; 8 e 9 – controle negativo do PCR usando o cDNA de actina e SG5, respectivamente; 10 a 13 – RT-PCR de corpo gorduroso, glândula salivar, intestino e ovário de teleógina, respectivamente; 14 – RT-PCR de sangue bovino.

10.4 Triagem da biblioteca de cDNA em vetor com sonda de cDNA de SG5

A triagem da biblioteca de cDNA em vetor de glândulas salivares utilizando o cDNA do clone SG5 foi feita de acordo com o item 9.21 de *Materiais e Métodos*. Como resultado da triagem de 150.000 clones, foram obtidos 16 clones, que foram retriados como descrito em 9.21 e tiveram os plasmídeos em seu interior excisados e clonados em *E. coli* cepa SOLR. De todos os clones obtidos foram feitas extrações de DNA plasmidial em média escala (item 9.21.1) e foi feita análise por eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 9.2). Destes, quatro clones, denominados Cor1, 2, 3 e 4 apresentaram um tamanho acima de 1000 pb (Figura 6). Estes clones tiveram a seqüência determinada no Laboratório de Doenças Infecciosas do Departamento de Controle de doenças, na Graduate School of Veterinary Medicine Hokkaido University, em Sapporo, Japão.

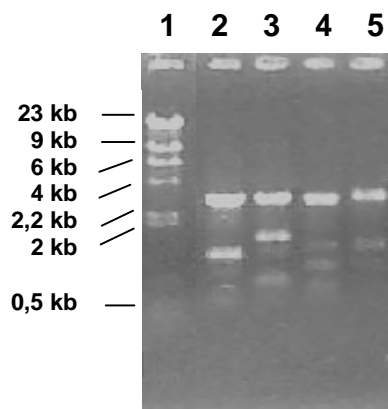


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da análise de restrição dos clones encontrados na sondagem da biblioteca de cDNA. Para a análise de restrição foram utilizadas as endonucleases *EcoRI* e *XhoI*. 1 – marcador de massa molecular DNA Lambda *Hind III*; 2 – clone Cor1; 3 – clone Cor2; 4 – clone Cor3; 5 – clone Cor4.

A análise das seqüências dos quatro clones (Figuras 7, 8, 9 e 10) mostrou que Cor1 apresentou uma similaridade de 45% com o gene de 3'-fosfoadenosina 5'-fosfossulfato sintetase (PAPSS) do verme equiúro *Urechis caupo*; o clone Cor2 apresentou similaridade de 13 % com o gene codificante de uma proteína similar à mucina de *Rattus norvegicus*; o clone Cor3 apresenta similaridade de 22% com o gene de uma proteína similar a elastina de *Drosophila melanogaster*, e Cor4 não apresenta similaridade com nenhuma seqüência presente no GeneBank. A Tabela II resume as características dos clones encontrados.

TABELA II: Principais características dos clones encontrados na triagem com sonda de cDNA

CLONE	TAMANHO	IDENTIDADE	SIMILARIDADE	ESPÉCIE
Cor1	1,5 kb	32,5% com gene de 3'- fosfoadenosina 5'- fosfossulfato sintetase	45%	<i>Urechis caupo</i>
Cor2	1,5 kb	8,0 % com gene de uma proteína similar à mucina	13%	<i>Rattus norvegicus</i>
Cor3	2,0 kb	16% com gene de uma proteína similar a elastina	22%	<i>Drosophila melanogaster</i>
Cor4	1,0 kb	S/ identidade com nenhuma seqüência presente no GeneBank	S/ similaridade com nenhuma seqüência presente no GeneBank -	-

```

1  ttggagctccaccgcggtggcggcgctctagaactagtggatccccgggctgcaggat
   L E L H R G G G R S R T S G S P G L Q D 20
61  tcggcaccgaggtgaccttgatgttctagagcgaattcgctggaatgatggacttgacgaa
   S A R G D L D V L E R I R W N D G L D E 40
121 tacaggctcacacaaaagaactcagaaaagcattctcgaagcttggggcagatgcagtg
   Y R L T P K E L R K A F S K L G A D A V 60
181 tttgcatttcaactgaggaaccctgttcacaatggccatgcattgctcatgcaagacacc
   F A F Q L R N P V H N G H A L L M Q D T 80
241 aggagacatttgaccgaaaaaggttacaagaagccagtgctggtgcttcatccacttggt
   R R H L T E K G Y K K P V L L L H P L G 100
301 ggttggaccaaggatgatgatgtaccctggcagtgcgcatgaagcagcacaaggcagta
   G W T K D D D V P L A V R M K Q H K A V 120
361 ctagacagtggtgtcttagatcccaagttgactgtgttggccatcttccctcccctatg
   L D S G V L D P K L T V L A I F P S P M 140
421 atgtatgctggaccaacagaggttcagtggcatgcaaaggcaagaatggtgtgtggcagc

```

M Y A G P T E V Q W H A K A R M V C G S 160
481 aacttctacattgttaggcagagatccagcaggaatgccccatccagagacgaaagaagac
N F Y I V G R D P A G M P H P E T K E D 180
541 ctctatgacccaacacatgggtgcaaaggtgtgacccatggctcctggccttacacaactc
L Y D P T H G A K V L T M A P G L T Q L 200
601 gagatcataccattccaagttgctgcctatgacacaaaagaagaagaagatggcaatgttt
E I I P F Q V A A Y D T K K K K M A M F 220
661 gagcctgagcggaaagaggactttttgttcatctctggcaccaaaaatgcgtagcctggca
E P E R K E D F L F I S G T K M R S L A 240
721 cgcagtggtcaggagccaccagccgggttcatggagccatctgcctggaaagttctttc
R S G Q E P P A G F M E P S A L E S S F 260
781 ttgattattatcg
L I I I 264

Figura 7. Sequências parciais de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida do clone Cor1 encontrado na sondagem da biblioteca de cDNA de glândulas salivares com sonda de cDNA de SG5.

1 gctccaccgcgggtggcggccgctctagaactagtggatcccccgggctgcaggaattcggca
S T A V A A A L E L V D P P G C R N S A 20
61 ccagtatcggcactcacctacgaagtgatgcaaggtacatctgtgagagatgagaagtg
P V S A L T Y E V M Q G T S V R D E K C 40
121 caaactatacactaaatattcataagacttgtccatttgtgccaactatgcaattctgta
Q T I H - I F I R L V H L C Q L C N S V 60
181 gccagttattgtttcaattttgactggactcagacgtggctgcccgttgaccctcacattc
A S I V S I L T G L R R G C G L T L T F 80
241 agaagcagccttacactacaagccgcaacttgaatcgatgagatctggctgatgcaatg
R S T P Y T T S R N L N R - D L A D A M 100
301 gccaaagaccacgaactactcaaggtgctcttcgcttttcggtggtacacccatgtcgagc
A K T T N Y S R C S S R F R G T P M S S 120
361 attgacattacgtcagcagttcaatacagaagggttggcttctaggtaacgtttctgat
I D I T S A V Q Y R R V G F - V T F A D 140
421 gaacattggggatcgggtgtgtcagccagacggccataggatcttcgcttcttttcttgac
E H W G S V C Q P D G H R I F V L F L D 160
481 atatacaggacgttgaaatTTTTTctagacagatttcatacttttgggtgggtttctcagt

```

      I Y R T L K F F S R Q I S Y F G G F L S      180
541 gtggtcaagggattaggtcgacgaaaaacgggatgtccatagtgcgtcgagtcgcagttt
      V V K G L G R R K T G C P - C V E S Q F      200
601 gtcgaaggcccgtacgctgagtgccggctgtgcgtaagctgtttgtgtgtgcgtgtttct
      V E G P Y A E C R L C V S C L C V R V S      220
661 tgacgtggttatgtgctccacgactgcgaggtgccaaatgtagacagtgtacttttttc
      - R V V C A P R L R G A K C R Q C T F F      240
721 agactgcctcattgctatgtggctg
      R L P H C Y V A      248

```

Figura 8. Sequências parciais de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida do clone Cor2 encontrado na sondagem da biblioteca de cDNA de glândulas salivares com sonda de cDNA do clone SG5.

```

1   gctccccgcggtggcggccgctctagaactagtgatcccccgggctgcaggaattcggca
      L P A V A A A L E L V D P P G C R N S A      20
61  cgagggagtgttcgacagtggtcgcacacccaaaggcttcgtacgttcgatcatcgatgc
      R G S V R Q W S H T Q R L R T F D H R C      40
121 gaggtgattaacagcgcgagcgcaacctgctccttgccactatggaatgtctggcaactggc
      E V I N S E R N L L L A T M E C L A T G      60
181 atagttcacgtctgtttatttaattcattttaccttcgaagccgtagcattgctgaggggt
      I V H V C L F N S F Y L R S R S I A E G      80
241 agtgggtatcaaggagtagtatgatacaagtaattatgtgaaaataatgagcaacaaaaag
      S G I K E - Y D T S N Y L K I M S N K K      100
301 aaatacattgggtaaaactaattagttactgtggaagttgttcatactgatcttggttg
      K Y I G - N - L V T V E V V H T D L G L      120
361 taaagtgagcgggcatcctggttctgcatgttggtttccaagttttgtgactgca
      - S E R A S W F C M L D W F P S F V T A      140
421 gtcgtactgccagaactgaaggagcactgagcacattgcctaaaacttggtgtttttttt
      V V L P E L K E H - A H C L K L V F F F      160
481 tttaatgaaaagcttctttatgttggccaccaatacggttgtgcgactgttgcaaatcacta
      F N E K L L Y L P P I R L C D C C K S L      180
541 attcaaatgagccttttagtcgtagttttcctacaattcaaactgtcaacagtttatgcag
      I Q M S L - S - F S Y N S N C Q Q F M Q      200
601 cccttcgcctgtcaatgtatagacttgcggtgccgcgctgtttaactgtggtacgttttcta
      P F A C Q C I D L R A A L F N C G T F L      220

```

661 aaacatTTTTctcagctccagttgtaagcgcaatgtgtgaattttacgtgataggtggcg
 K H F S Q L Q L - A Q C V N F T - - V A 240
 721 cagtcaatggcagctgtccttgggggttgggggttgcgtgaagagcg
 Q S M A A V L G V G V A - R A 255

Figura 9. Seqüências parciais de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida do clone Cor3 encontrado na sondagem da biblioteca de cDNA de glândulas salivares com sonda de cDNA do clone SG5.

1 ctggagctccccgcggtggcgccgctctagaactagtggatcccccgggctgcaggatt
 L E L P A V A A A L E L V D P P G C R I 20
 61 cggcacgagaagagggcgctcgtccgttgcgtgctgggggtggaaccatcaccagccatc
 R H E K R A L V R C C W G L E P S P A I 40
 121 aactcactctggcggcgattgtttctttccatccagctgcaagggctcgagattgaatgct
 N S L W R R L F L S I Q L Q G S R L N A 60
 181 ttggacgaatccgcgctggttcagggcgaccggtgctcggggcaacactataatttgg
 L D E S A L V Q G R T G A R G N T I I W 80
 241 gaccaaacatctcgtgcaagagcgaaatagaagaataggggtcaagaaacagtgcgga
 D Q T S R A R A K - K N R G S R N S A A 100
 301 gagcctgcatgcttccgacgaaacgaaataactaaaatctgcacgtgtcgtctctacatc
 E P A M L R R N E I T K I C T C R L Y I 120
 361 gcatggagatgaagatgcgccaccacacatcgatgggaccaagatgtatTTTTAAGTCCCA
 A W R - R C A P H I D G T K M Y F - V P 140
 421 ctcgctcggcatcggcctacttccacacgcattgtttaattaacattcctatgctaaagtg
 L V G I G L L P H A L F N - H S Y A K V 160
 481 tagcttctgagccattcaatTTTTctgtctTTTTgtttgcacacgtgaaaactattacca
 - L L S H S I F C L F C L H T - K L L P 180
 541 ggtaaaaaaaaaacagcattgaaatcgcatTTTgctcaaaaatattgtacaattgctTTTaaac
 G K K N S I E I A F A Q K Y C T I A F N 200
 601 tgTTAATTAGCACTTTccttggTTTTcatatcatatcgcacaaggtgtgCGGATGGTGA
 C - L A L S L V F H I I S H K V C G W - 220
 661 agttcacatgccccattgatttattatccggcgatttggTCCCACGATACACCCACTGTA
 S S H A P L I Y Y P A I W S H D T P T V 240
 721 ccatccgctgatgatgccaggtgaattgacaataaacgtgCGTTACAGTCTAGCCGTTTC
 P S A D D A R - I D N K R A L Q S S R F 260
 781 aaacgggggtgccaagtcttccagaaggcttctTTAACAAGCCGGACCCGTCCAAGGACA

K R G C Q V F Q K A S L T S R T R P R T 280
841 ctaattaaataagtc
L I K - V 300

Figura 10. Seqüências parciais de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida do clone Cor4 encontrado na sondagem da biblioteca de cDNA de glândulas salivares com sonda de cDNA do clone SG5.

10.5 RACE

Uma vez purificado cDNA diretamente da biblioteca de cDNA de glândulas salivares como descrito em 9.22.1, foi feito uma PCR (item 9.22.3) para confirmar a presença do gene similar à coronina na biblioteca, utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores anteriormente utilizados para as reações de RT-PCR (item 9.20.3). Uma vez confirmada a presença do gene na biblioteca de cDNA, foram feitos experimentos de RACE (item 9.22.5), utilizando as enzimas DNA-polimerases *Elongase* ou *Taq*-Polimerase, (item 9.7). Em ambos os experimentos, não houve a amplificação de fragmentos discretos, formando um rastro em gel de agarose 1,5% (figura 9). O rastro amplificado com *Taq*-Polimerase apresentou tamanho entre 0,3 kb e 9 kb, enquanto o rastro amplificado por *Elongase* apresentou tamanho abaixo de 1,5 kb. Devido à presença de amplicons maiores e também pelos mesmos apresentarem extremidades coesivas, apenas as amplificações de RACE usando *Taq*-Polimerase foram utilizadas para clonagem (item 9.22.4) no vetor de expressão pBlueScript® SK(-) (STRATAGENE) (item 9.10). Os insertos clonados no vetor foram transformados em *E. coli* cepa TOP10, como descrito em 9.14.

Após a clonagem, onze clones com insertos de 100 a 200 pb foram obtidos e tiveram suas seqüências determinadas. Foi observado que nove apresentaram somente seqüência do vetor. Outros dois clones apresentam como insertos seqüências parciais do próprio pBlueScript (SK-).

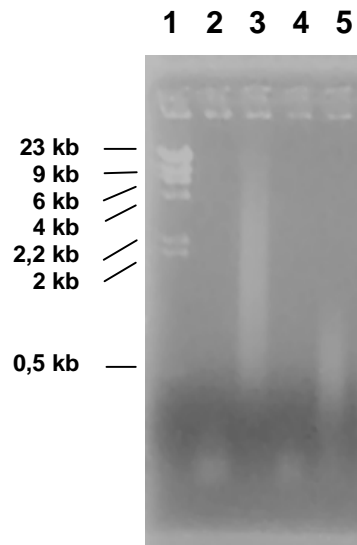


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação por RACE mostrando rastro de amplificação utilizando as enzimas *Taq*-Polimerase e Elongase Enzyme Mix. 1 – marcador de massa molecular lambda *Hind* III; 2 – controle negativo do RACE usando *Taq*-Polimerase (Cenbiot, UFRGS); RACE usando *Taq*-Polimerase; 3 – controle negativo do RACE usando Elongase Enzyme Mix (Gibco, BRL); 4 – RACE usando Elongase Enzyme Mix.

11 DISCUSSÃO

Durante a triagem imunológica da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de *B. microplus* com anticorpo monoclonal BrBm2, vários clones de cDNA foram detectados, sendo um deles SG5. Pelo fato da proteína coronina possuir um papel importante na fisiologia de outros organismos, o clone SG5 – cuja seqüência de nucleotídeos apresenta similaridade com genes de coronina – foi selecionado para estudo.

Em quase todas as espécies em que foi encontrada, a coronina se mostrou presente em diferentes tecidos, ainda que em algumas destas espécies (como *C. elegans* e *H. sapiens*, por exemplo) com isoformas para cada tecido (YONEMURA & MABUCHI, 2001; IIZAKA *et al.*, 2000). Uma vez clonada a seqüência parcial do gene de *B. microplus* similar a coronina, analisou-se em quais tecidos ocorria sua expressão. Os resultados do RT-PCR indicam a presença de mRNA da proteína similar a coronina em tecidos de carrapato em diferentes fases de desenvolvimento. Com relação à não-amplificação em corpo gorduroso, como este não é um teste quantitativo, a quantidade de mRNA de coronina sintetizada neste tecido pode estar abaixo do nível de sensibilidade do teste. Nos demais tecidos, os resultados obtidos, juntamente com a literatura (FUKUI *et al.*, 1999a; GROGAN *et al.*, 1997; WIENTJES *et al.*, 2001), sugerem que a presença de mRNA de coronina pode ser devido ao fato destes órgãos estarem sofrendo divisão celular e reestruturação constantes em seus citoesqueletos, já que trabalhos com *D. discoideum* mostram que neste organismo a coronina está fortemente envolvida em divisão celular e em neutrófilos humanos há um envolvimento de coronina na organização e remodelagem do citoesqueleto.

Nenhum dos clones encontrados na sondagem da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de *B. microplus* continha seqüências semelhantes ao cDNA codificante para a proteína semelhante a coronina usado como sonda. Os clones encontrados possuíam similaridade com genes codificantes para outras proteínas, todas não relacionadas entre si ou com a proteína de *B. microplus* semelhante a coronina. O clone Cor1 apresentou similaridade de 45% com o gene de 3'-

fosfoadenosina 5'-fosfossulfato-sintetase (PAPSS), uma proteína que pode atuar como ATP sulfurilase e/ou fosfossulfato quinase (GIRARD *et al.*, 1998) e é a responsável pela síntese da 3'-fosfoadenosina 5'-fosfossulfato (PAPS) (SHIMIZU *et al.*, 2002), que é responsável pelo catabolismo da cisteína, doação de íon sulfato para várias enzimas, e está também envolvida no metabolismo de glutatona, que auxilia na detoxificação de herbicidas e drogas em várias espécies vegetais. O clone Cor2 apresentou similaridade de 13% com genes codificantes para mucinas, glicoproteínas presentes em abundância nas secreções de muco em todas as superfícies de mucosa (LIM *et al.*, 2000) e com diversas funções, entre elas servir de barreira imunológica específica nos organismos contra patógenos como vírus e bactérias (WALTERS *et al.*, 2002). O clone Cor3 apresentou similaridade de 22% com genes de elastina, uma proteína presente em fibras elásticas de tecidos de vertebrados e responsável por remodelagem estrutural (DEBELLE & TAMBURRO, 1999).

Provavelmente estes clones foram detectados por hibridização inespecífica da sonda de cDNA utilizada na sondagem com os cDNAs dos fagos ligados à membrana de nitrocelulose, já que a similaridade entre as seqüências dos clones encontrados e do cDNA de SG5 usado é tão baixa. A presença de códons de terminação ao longo das seqüências destes clones pode indicar que se tratam de regiões não traduzidas de diferentes genes, ou que houve falhas no seqüenciamento dos nucleotídeos.

Utilizando a seqüência conhecida adicionada na região 5' do "cap" presente na região 5'-terminal dos cDNAs da biblioteca de cDNA foram feitos experimentos usando a técnica de RACE. Ao invés da(s) banda(s) representando todo o gene, nenhuma banda definida apareceu em gel de agarose, formando, assim, um rastro de 100 pb a 9.000 pb. Os fragmentos na faixa de 1.500 pb a 2.000 pb foram clonados em plasmídeo e seqüenciados, e mostraram não se tratar de fragmentos do cDNA que codifica a proteína similar à coronina. Houve, portanto, uma amplificação inespecífica ou por causa dos oligonucleotídeos sintetizados – provavelmente o oligonucleotídeo "forward", baseado na seqüência adicionada junto à região "cap" do mRNA, durante a síntese da primeira fita do cDNA do "kit" utilizado

para a construção da biblioteca (item 8.11) – ou por causa da seqüência da coronina, que possivelmente permita uma hibridização inespecífica durante a sondagem.

O seqüenciamento total do clone SG5 mostrou um fragmento de 1.938 pb. A análise da seqüência de nucleotídeos do clone pode ser vista na Figura 3. Na posição 960 foi encontrado o provável códon de terminação. Em outros organismos, a posição para o códon de terminação de coronina varia na seqüência de nucleotídeos entre as posições 1335 e 1440 pb, indicando que possivelmente falte em torno de 500 a 800 pb para o cDNA completo. A seqüência de nucleotídeos correspondente à suposta porção não-traduzida de SG5 possui 1.299 pb. Em seqüências de nucleotídeos correspondentes a coronina em outros organismos o tamanho da porção não traduzida varia de 500 pb a 2.000 pb, como em CORO1C de humanos (IIZAKA *et al.*, 2000). O sinal de poliadenilação da coronina de *D. discoideum* possui um nucleotídeo adenina a menos, com uma seqüência *aataa* (HOSTOS *et al.*, 1999). As demais seqüências de coroninas de outras espécies como a de humanos, por exemplo, não possuem esta particularidade no sinal de poliadenilação. Devido à similaridade entre a seqüência de nucleotídeos da proteína de *B. microplus* similar à coronina e as seqüência de coroninas de humanos, considerou-se seu sinal de poliadenilação como sendo a seqüência *aataaa*.

A coronina inteira possui uma massa molecular de 42.000 Da em *Plasmodium falciparum* (TARDIEUX *et al.*, 1998), 57.000 Da em mamíferos (DIDICHENKO *et al.*, 2000) e 60.000 Da em ouriço-do-mar (HOSTOS *et al.*, 1999). A seqüência parcial de cDNA de SG5 dá origem a uma proteína teórica de massa molecular aparente de 36.192,3 Da e ponto isoelétrico presumido de 8,44. Quando estimado o pI e a massa molecular para as coroninas já existentes utilizando o mesmo tamanho e a mesma região de seqüência de SG5, estas mostraram ter um pI e uma massa molecular aparente compatíveis com SG5: COR2B de humanos apresentou pI de 8.09 e massa de 40.704,1 Da; COR2A apresentou pI de 7,10 e massa de 37.537,8 Da; a coronina de *X. laevis* apresentou massa molecular aparente de 38.339,6 Da e um pI estimado em 5,56. Estes resultados indicam que possivelmente a proteína inteira possua massa molecular relativa e pI similares aos

das coroninas destes outros organismos, em torno de 45.000 a 50.000 Da e entre 5,7 e 7,4, respectivamente.

No alinhamento múltiplo mostrado na Figura 4, é possível verificar uma identidade entre 15,4 e 17,3% de SG5 com as coroninas de mamíferos e de sapo. Uma das formas de coronina de humanos, COR2A, e a coronina de *M. musculus* são as que mostram maior identidade com a proteína semelhante a coronina de *B. microplus*. Devido a esta identidade, é possível que a proteína de *B. microplus* semelhante à coronina possua função similar às coroninas de humanos e camundongo, auxiliando na movimentação e remodelagem do citoesqueleto. Essa possível função se torna especialmente interessante se for levado em questão que o clone SG5 foi encontrado em uma biblioteca de cDNA de glândulas salivares de partenóginas. Em glândulas salivares de *Dermacentor variabilis*, LAMOREAUX *et al.* (1994) demonstraram que um citoesqueleto funcional possui um papel fundamental na contração e expansão dos ácinos do tipo III para a liberação de fluido salivar, através de um experimento usando citocalasina D, um inibidor de microfilamento, e nocodazol, um inibidor de microtúbulos. COONS *et al.* (1994) propõem, inclusive, que as células adluminais dos ácinos tipo III de glândulas de *D. variabilis* funcionam como células miopiteliais.

Muito se sabe sobre citoesqueleto e várias das proteínas que o compõem, mas pouco se sabe ainda sobre o real papel da coronina nas células eucarióticas. Sua multiplicidade de papéis, de acordo com a espécie, ainda não está totalmente clara, contudo, sua ampla distribuição em diferentes tipos celulares dentro de um mesmo organismo e em diferentes espécies – desde protozoários (BRICHEUX *et al.*, 2000) até mamíferos (HOSTOS, 1999) – demonstra que esta proteína foi conservada durante a evolução dos eucariotos e possivelmente ocupe uma posição destacada entre as proteínas que fazem parte do arcabouço celular. Um estudo mais detalhado desta proteína em *B. microplus* pode auxiliar em uma melhor compreensão da fisiologia deste organismo, esclarecendo melhor a estrutura e o funcionamento do citoesqueleto nas células de diferentes tecidos seus, em especial nas células que constituem as glândulas salivares.

12 ABSTRACT

The tick *Boophilus microplus*, a haematophagous ectoparasite, is present in tropical and subtropical areas of the world. Nowadays, its control has been based in the use of pesticides. To support the development of new vaccines for parasite control, it is important to understand its physiology.

The coronin, a cytoskeletal protein, belongs to G Proteins family. It is localized at cellular cortex and presents several functions, such as cellular locomotion, phagocytosis, macropinocytosis, microtubules binding, polarity orientation of embryos, cytokinesis, polymerization of actin filaments and regulation of cytoskeleton organization. In the present work, the cDNA of a coronin-like protein was isolated from a salivary glands cDNA library of partially engorged adult females by immunological screening. The sequence analysis showed that the SG5 clone has identity between 15 and 17% with sequences of coronin-like proteins from other species, such as human and mice. The SG5 clone has 1.884 kb, with a putative ORF of 960 nucleotides. The gene expression analysis showed that this mRNA is present in 15-day-old eggs and larvae and in salivary glands, gut and ovary of fully engorged female and partially engorged female, except in fatty body.

A more detailed study of the role of coronin-like proteins in salivary glands of *B. microplus* could help to understand the tick physiology.

13 BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, J. R. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. **Experimental & Applied Acarology**, v.7, p.5-13, 1989.
- ALLEN J. R. and HUMPHREYS, S. J. Immunization of guinea pigs and cattle against ticks. **Nature**, v.280, n.9, p.491-493, 1979.
- ALTSCHUL; STEPHEN F., MADDEN, T. L., SHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". **Nucleic Acids Research**, v.25, p. 3389-3402, 1997.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.
- 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**, Brasília, D. F. v.1, p.1-4, 1983.
- ASANO S.; MISHIMA, M.; NISHIDA, E. Coronin forms a stable dimer through its C-terminal coiled coil region: an implicated role in its localization to cell periphery. **Genes Cells**. v.6, p.225-235, 2001.
- BRETSCHER, A. Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. **Annual Review in Cell Biology**, v.7, p.337-374, 1991.
- BRICHEUX G.; COFFE G.; BAYLE, D.; BRUGEROLLE, G. Characterization, cloning and immunolocalization of a coronin homologue in *Trichomonas vaginalis*. **European Journal of Cell Biology**, v.79, p.413-22, 2000.

- BRUM, J. G. W Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* Grimont *et al.*, 1981: etiopatogenia e sazonalidade. Tese (Doutor em ciências). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, R. J. 1988.
- BULLOCK, W.O.; FERNANDEZ, J. M. SHORT, J. M. **Biotechniques**, v. 5, p.376-378, 1987.
- CANAL, C. W.; MAIA, H. M.; VAZ JR, I. S.; CHIES, J. M.; FARIAS, N. A. R.; MASUDA, A.; GONZALES, J. C.; OZAKI, L. S.; DEWES, H. Changing patterns of vitellin-related peptides during development of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental Applied of Acarology**. v.19, p.325-336, 1995.
- CASTRO, M. P.; PEREIRA, C. Alimentação das proteroninfas de *Boophilus (Uroboophilus) microplus* Canestrini, 1988 (Ixodidae) com os restos necróticos da reação tissular do hospedeiro. **Arquivos do Instituto de Biologia**. São Paulo, v.17, p.149-62, 1946.
- CORDOVÉS, C. O. **Carrapato: controle e erradicação**. Alegrete: Gralha, 1996.
- COONS, L. B.; LESSMAN, C. A.; WARD, M. W., BERG, R. H.; LAMOREAUX, W. J. Evidence of a myoepithelial cell in tick salivary glands. **International Journal of Parasitology**, v.24, p.551-562, 1994.
- CRAMPTON, A.. Identification and characterisation of a cytochrome P450 and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.29, p.377-384. 1999.
- DA SILVA VAZ JR, I.; MARTINEZ, R.H.M.; OLIVEIRA, A.T.D.; HECK, A.; LOGULLO, C.; GONZALES, J.C.; DEWES, H; and MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. **Veterinary Parasitology**, v.62, p.155-160, 1996.

- DA SILVA VAZ JR., I.; LOGULLO, C.; SORGINE, M.; VELLOSO, F. F.; ROSA DE LIMA, M. F.; GONZALES, J. C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.; MASUDA, A. Immunization of bovine with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.66, p.331-341, 1998.
- DA SILVA VAZ JR, I.; OZAKI, L. S.; MASUDA, A.. Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissues. **Veterinary Parasitology**, v.52, p. 71-78, 1994.
- DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; ZINDER, D. E. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Veterinary Parasitology**, v.99, p.41-52, 2001.
- DEBELLE, L.; TAMBURRO, A. M. Elastin: molecular description and function. **International Journal of Biochemical Cell Biology**, v.31, p.261-272, 1999.
- DE LA FUENTE, J.; RODRÍGUEZ, M.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; GARCÍA-GARCÍA, J. C.; MÉNDEZ, L., et al. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp): the experience with the Bm86-based vaccine GAVAC™. **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering**, v. 15, p. 143-148, 1999.
- DE LA FUENTE, J.; RODRÍGUEZ, M.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; GARCÍA-GARCÍA, J. C.; MÉNDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDÉS, M.; ENRIQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUÉ, O.; MACHADO, H.; LLEONART, R.; DE ARMAS, C. A.; REY, RODRÍGUEZ, J. L.; ARTILES, M.; GARCÍA, L. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac™ against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v.16, p.366-373, 1998.
- DE HOSTOS, E. L. The coronin family of actin-associated proteins. **Trends in Cell Biology**, v.9, p.345-350, 1999.

- DE HOSTOS E. L.; BRADTKE, B.; LOTTSPREICH, F.; GUGGENHEIM, R.; GERISCH, G. Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. **EMBO Journal**, v.10, p.4097-104, 1991.
- DE HOSTOS E. L.; REHFUESS, C.; BRADTKE, B.; WADDELL, D. R.; ALBRECHT, R.; MURPHY, J.; GERISCH, G. *Dictyostelium* mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility. **Journal of Cell Biology**, v.120, p.163-73, 1993.
- DE ROSE, R.; MCKENNA, R. V.; COBON, G.; TENNENT, J.; ZAKRZEWSKI, H.; GALE, K.; WOOD, P. R.; SCHEERLINCK, J. P. Y.; WILLADSEN, P. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71,p. 151-160, 1999.
- DIDICHENKO, S. A.; SEGAL, A.W.; THELEN, M. Evidence for a pool of coronin in mammalian cells that is sensitive to PI 3-kinase. **FEBS Letters**, v.485, p.147-152, 2000.
- EICHINGER, L.; LEE, S. S.; SCHLEICHER, M. *Dictyostelium* as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microscopic Research Techniques*, v.47, p.124-34, 1999.
- FARIAS, N. A. R.; GONZALES, J. C.; SAIBRO, J. C. Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, D.F., v.21, p.1313-1320, 1986.
- FRAZZON, A. P., DA SILVA VAZ JR., I., MASUDA, A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.94, p. 117-125, 2000.

- FUKUI, Y.; DE HOSTOS, E.; YUMURA, S.; KITANISHI-YUMURA, T.; INOU. Architectural dynamics of F-actin in eupodia suggests their role in invasive locomotion in *Dictyostelium*. **Experimental Cell Research**. v.249, p.33-45, 1999 (a)
- FUKUI, Y.; ENGLER, S.; INOUÉ, S.; de HOSTOS, E. L. Architectural dynamics and gene replacement of coronin suggest its role in cytokinesis. **Cell Motility and Cytoskeleton**, v.42, p.204-217, 1999 (b).
- GAPARIN A. C.; MA, L.; PESCHER, P.; LAGRANDERIE, M.; MARCHAL, G. Mixed immune response induced in rodents by two naked DNA genes coding for mycobacterial glycosylated proteins. **Vaccine**, v.19, p.2830-2841, 2001.
- GARCIA-HIGUERA, I.; THOMAS, T. C.; YI, F.; NEER, E. J. Intersubunit surfaces in G protein alpha beta gamma heterotrimers. Analysis by cross-linking and mutagenesis of beta gamma. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.528-351, 1996 .
- GERISCH, G.; ALBRECHT, R.; HEIZER, C.; HODGKINSON, S.; MANIAK, M. Chemoattractant-controlled accumulation of coronin at the leading edge of *Dictyostelium* cells monitored using a green fluorescent protein-coronin fusion protein. **Currents in Biology**, v.5, p.1280-1285, 1995.
- GIRARD, J. P.; BAEKKEVOLD, E. S.; AMALRIC, F. Sulfation in high endothelial venules: cloning and expression of the human PAPS synthetase. **FASEB Journal**, v.12(7), p.603-12, 1998.
- GOMES, A. Controle do carrapato do boi: um problema para quem cria raças européias. **EMBRAPA**. Campo Grande (MS), Ago, n.31, 1998; [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD31.html>.
- GONZALES, J. C. **O controle do carrapato bovino**. Porto Alegre, Sulina. 1975.

- GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 2ed. Porto Alegre. Edição do Autor, 1995.
- GONZALES, J. C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo. Mestre Jou, 1974.
- GROGAN, A.; REEVES, E.; KEEP, N.; WIENTJES, F.; TOTTY, N.F.; BURLINGAME, A.L.; HSUAN, J.J.; SEGAL, A.W. Cytosolic phox proteins interact with and regulate the assembly of coronin in neutrophils. **Journal of Cell Science** v.24, p.3071-3081, 1997.
- GOUCH, J. M.; KEMP, D. H. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. **Journal of Parasitology**, v. 79, n. 6, p. 900-907, 1993.
- GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; MUNOZ COBENAS, M. E.; SCHERLING, N., GARCIA POSSE, F., ANZIANI, O. S.; IOPPOLO, M. Moxidectin pour-on for control of natural populations of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.87, p.237-241, 2000.
- GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA vaccines: immunology, application and optimization. **Annuary Review Immunology**, v.18, p.927-974, 2000.
- HORN, S. C. & ARTECHE, C. C. P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.23, p.12-32, 1985.
- IIZAKA, M.; HAN, H.J.; AKASHI, H.; FURUKAWA, Y.; NAKAJIMA, Y.; SUGANO, S.; OGAWA, M.; NAKAMURA, Y. Isolation and chromosomal assignment of a novel human gene, CORO1C, homologous to coronin-like actin-binding proteins. **Cytogenetic and Cell Genetics**; v.88, p.221-224, 2000.

- JONSSON, N. N.; MATSCHOSS, A. L.; PEPPER, P.; GREEN, P. E.; ALBRECHT, M. S.; HUNGERFORD, J; ANSELL, J. Evaluation of TickGARD^{PLUS}, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein – Friesian cows. **Veterinary Parasitology**, v.88, p.275-285, 2000.
- JOHNSTON, L .A. Y.; KEMP,D. H. and PEARSON, R. D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on tick populations. **International Journal for Parasitology**, v.16, n. 1, p.27-34, 1986.
- 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, n.1, p.15-20, 1996.
- KOCAN, K. M.. Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle. **Veterinary Parasitology**. v.57, p.121-151, 1995.
- LAMOREAUX, W. J.; NEEDHAM, G. R.; COONS, L. B. Fluid secretion by isolated tick salivary glands dependent on an intactcytoskeleton, **International Journal of Parasitology**, v.24, v.563-567, 1994.
- LIM D.J.; CHUN, Y.M.; LEE, H.Y.; MOON, S. K.; CHANG, K. H.; LI, J. D.; ANDALIBI, A. Cell biology of tubotympanum in relation to pathogenesis of otitis media - a review. **Vaccine**, v.19 Suppl 1, p.17-25, 2000.
- LARSEN, D. L.; KARASIN, A.; OLSEN, C. W. Immunization of pigs against influenza virus infection by DNA vaccine priming followed by killed-virus vaccine boosting. **Vaccine**, v.19, p.2842-2853, 2001.

- LOGULLO C.; DA SILVA VAZ JR., I.; SORGINE, M. H. F.; PAIVA-SILVA, G. O.; FARIA, F. S.; ZINGALI, R. B.; DE LIMA, M. F. R.; ABREU, L.; FIALHO OLIVEIRA, E.; ALVES, E. W.; MASUDA, H.; GONZALES, J. C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P. L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, n.116, p.525-532, 1998.
- MANIAK, M.; RAUCHENBERGER, R.; ALBRECHT R.; MURPHY J.; GERISCH, G. Coronin involved in Phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein tag. **Cell**, v.83, p.915-924, 1995.
- McCOSKER, P. L.. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M. & KREIR, J. P. (Eds.) **Babesiosis**. New York, Academic Press. 1981.
- McGOWAN, M. J.; HOMER, J. T.; O'DELL, G. V.; McNEW, R. W.; BARKER, R. W. Performance of ticks fed on rabbits inoculated with extracts derived from homogenized ticks *Amblyomma maculatum* Koch (Acarina: Ixodidae). **Journal for Parasitology**, v.66, n.1, p.42-48, 1980.
- MITCHISON, T.J. AND CRAMER, L. P. Actin-based cell motility and cell locomotion. **Cell**, v.84, p.371-379. 1996.
- NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.153-165, 1995.
- NEER, E. J.; SMITH, T. F. G protein heterodimers: new structures propel new questions. **Cell**, v.84, p.175-8, 1996.
- NEER, E.J.; SCHMIDT, C J.; NAMBU DRIPAD, R.; SMITH, T. F. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. **Nature**, v.371, p.297-300, 1994.
- NOLAN, J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. v. 18, p.155-166, 1985.

- PRUETT, J. H. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.25-32, 1999.
- PUMPLIN, D. W.; AND BLOCH, R. J. The membrane skeleton. **Trends in Cell Biology**, v.3, p.113-117, 1993.
- RAND, K. N.; MOORE, T.; SRISKANTHA, A.; SPRING, K.; TELLAM, R.; WILLADSEN, P.; COBON, G. S.. Cloning and expression of protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United State of America**, v.86, p.9657-9661, 1989.
- RAPPLEYE, C. A.; PAREDEZ, A. R.; SMITH, C. W.; McDONALD, K. L.; AROIAN, R. V. The coronin-like protein POD-1 is required for anterior-posterior axis formation and cellular architecture in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genes and Development**, v.13, p.2838-2851, 1999.
- RENARD, G.; GARCIA, J. F.; CARDOSO, F. C.; RICHTER, M. F.; SAKANARI, J. A.; OZAKI, L. S.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, n.30, p. 1017-1026, 2000.
- RICHARDSON, M. A .; SMITH, D. R. J.; KEMP, D. H.; TELLAM, R. L.. Native and baculovirus-expressed forms of the immuno-protective protein Bm86 from the *Boophilus microplus* are anchored to the cell membrane by a glycolysil-phosphatidyl inositol linkage. **Insect Molecular Biology**, v.1, 139-147, 1993.
- RIDING, G. .A., JARMEY, J., MAKENNA, R. V., PEARSON, R., COBON, G. S., WILLADSEN, P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. **Journal of Immunology**, n.153, p.5158-5166, 1994.
- ROBERTS, J. A.. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini) II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest. **Journal of Parasitology**. v. 54, p. 667-673, 1968.

- ROCHA, C. M. B. M. Aspectos relevantes da biologia do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Lavras: UFLA, 1997. boletim técnico: série Extensão da Universidade Federal de Lavras, ano VII, 1998.
- RODRIGUEZ, M.; PENICHER, M. L.; MOURIS, A. E.; LABARTA, V.; LORENZO, L.; RUBIERA, R.; CORDOVÉS, C.; SÁNCHEZ, P. A.; RAMOS, E.; SOTO, A.; CANALES, M.; PALENZUELA, D.; TRIGUEO, A.; LLEONART, R.; HERRERA, L.; LA FUENTE, J. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.339-349, 1995.
- RODRIGUEZ, M.; RUBIERA, R.; PENICHER, M.; MONTESINOS, R.; CREMATA, J.; FALCON, V.; SÁNCHEZ, G.; BRINGAS, R.; CORDOVÉS, C.; VALDÉS, M.; LLEONART, R.; HERRERA, L.; FUENTE, J.. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal of Biotechnology**, v.33, p. 135-146, 1994.
- SAMBROOK J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning – a laboratory manual**. 2nd Edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SEIFERT, G. W.; SPRINGELL, P. H. and TATCHELL, R. J. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Parasitology**, v.58, p.415-430, 1968.
- SHAPIRO, S. Z.; VOIGT, W. P.; FUJISAKI, K. Tick antigens recognized by serum from guinea pig resistant to infestation with the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Journal of Parasitology**, v.72, n.3, p.454-463, 1986.
- SHIMIZU, C.; FUDA, H.; LEE, Y. C.; STROTT, C. A. Transcriptional regulation of human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulphate synthase 2. **Biochemical Journal**, v.363, p.263-271, 2002.

- SUTHERST, R.W.; JONES, R.J. & SCHNITZERLING, H.J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, v.295, p.320-321, 1982.
- SUTHERST, R. W.; MAYWALD, G. F.; KERR, J. D.; SIEGEMAN, D. A. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.34, p.317-27, 1983.
- TARDIEUX, I.; LIU, X.; POUPEL, O.; PARZY, D.; DEHOUX, P.; LANGSLEY, G. A *Plasmodium falciparum* novel gene encoding a coronin-like protein which associates with actin filaments. **FEBS Letters**, v.441, p251-256, 1998
- TELLAM, R. L.; KEMP, D.; RIDING, G.; BRISCOE, S.; SMITH, D.; SHARP, P.; IRVING, D.; WILLADSEN, P. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.141-156, 2002.
- TORO-ORTIZ, R.D., DA SILVA VAZ JR., I., GONZALES, J.C. AND MASUDA, A. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. **Veterinary Parasitology**, v.69, p.297-306, 1997.
- TURNBULL, I. F.; SMITH, D. R. J.; SHARP, P. J.; COBON, G. S.; HYNES, M. J.. Expression and secretion in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger* of a cell surface glycoprotein from the cattle tick, *Boophilus microplus*, by using the fungal amdS promoter system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, 2847-2852, 1990.
- WAGLAND, B. M.. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animals. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.29, p.401-409, 1978.
- WALTERS, R. W.; PILEWSKI, J. M.; CHIORINI, J. A.; ZABNER, J. Secreted and transmembrane mucins inhibit gene transfer with AAV4 much more efficiently than AAV5. **Journal of Biological Chemistry**, 2002.

- WIENJES, F. B.; REEVES, E. P.; SOSKIC, V.; FURTHMAYR, H.; SEGAL, A. W.
The NADPH oxidase components p47(phox) and p40(phox) bind to moesin through their PX domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.289, p.382-388, 2001.
- WIKEL, S. K. The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. **American Journal of a tropical Medicine and Hygiene**, v.31, n.1, p.284-288, 1981.
- WIKEL, S. K. & BERGMAN, D. Ticks-host immunology: significant advances and challenging opportunities. **Parasitology Today**, v.13, p. 383-389, 1997.
- WILLADSEN, P. Immunological control of ectoparasites: past achievements and future research priorities. **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering**. v.15, p.131-137, 1999.
- WILLADSEN, P. Immunity to ticks. **Advances in Parasitology**, v.18, p.23-313, 1980.
- WILLADSEN, P.; KEMP, D. H.; Vaccination with "Concealed" antigens for tick control. **Parasitology Today**, v.4, n.7, p.196-198, 1988.
- WILLADSEN, P.; RIDING, G.A.; MCKENNA, R.V.;KEMP, D.H.; TELLAM, R.L.; NIELSEN, J.N.; LAHNSTEIN, J. COBON, G.S. and GOUCH J.M. Immunologic control of a parasitic arthropod Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, n.143 p.1346-1351, 1989.
- YONEMURA, I, MABUCHI, I. Heterogeneity of mRNA coding for *Caenorhabditis elegans* coronin-like protein. **Gene**, v.271, p.255-259, 2001.
- YOUNG, A.S. & MORZARIA, S. P. Biology of *Babesia*. **Parasitology Today**. v. 2, n. 8, p. 211-219, 1986.

ZHIOUA, E.; BROWNING, M.; JOHNSON, P. W.; GINSBERG, H. S.; LEBRUN, R.
A. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*
(Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal for
Parasitology**, v. 83, p.815-818, 1997.