

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE cDNA DE
GLÂNDULA SALIVAR DE *Boophilus microplus* (ACARI:
IXODIDAE) SIMILAR A GLUTATIONA S-TRANSFERASE**

Mônica Fernandes Rosa de Lima

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO (CPG)- CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-
BIOQUÍMICA DO INSTITUTO BÁSICO DA SAÚDE DA UFRGS

Porto Alegre

2001

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE cDNA DE
GLÂNDULA SALIVAR DE *Boophilus microplus* (ACARI:
IXODIDAE) SIMILAR A GLUTATIONA S-TRANSFERASE**

Mônica Fernandes Rosa de Lima

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Dr^a. Aoi Masuda

Porto Alegre

2001

Este trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, em colaboração com o Laboratório de Entomozooses da Faculdade de Veterinária, UFRGS e Departamento de Bioquímica Médica, UFRJ, 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 CAPES.

1 AGRADECIMENTOS

À Dra. Aoi Masuda pela orientação e oportunidade.

Aos colegas e amigos Carlos Alexandre Sanchez Ferreira, Gaby Renard, Itabajara da Silva Vaz Jr., Valesca dos Santos Gomes, Felipe Cardoso de Cardoso, Adriano Oliveira Marques, Luciana Sonne, Cláudia Puperi, Daniela Reis Joaquim de Freitas, Alexandra Abreu, Elisabete Herrera e todos os colegas dos Lab. 204 e 206 do Centro de Biotecnologia.

Ao colegas do Cenbiot, especialmente Prof. Helio M. M. Maia e Luís Paulo da Silva Braga.

Aos colegas do Lab 107, especialmente Dr. Carlos Termignoni.

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

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, me auxiliaram na realização deste trabalho.

Ao setor de Entomozooses da Faculdade de Veterinária da UFRGS pela obtenção dos carrapatos.

Em especial: aos meus pais, minha irmã e amigos, pela paciência e carinho.

À CAPES, PRONEX, PADCT, CNPq, FAPERGS pelos auxílios financeiros.

2SUMÁRIO

1	AGRADECIMENTOS	4
2	SUMÁRIO.....	5
3	LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	8
4	LISTA DE FIGURAS.....	10
5	LISTA DE TABELAS	11
6	RESUMO.....	12
7	ABSTRACT	13
8	INTRODUÇÃO	14
8.1	O CARRAPATO <i>BOOPHILUS MICROPLUS</i>	14
8.2	CICLO BIOLÓGICO.....	14
8.3	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	15
8.4	MÉTODOS DE CONTROLE	16
8.4.1	<i>Controle Biológico</i>	16
8.4.2	<i>Controle Químico</i>	17
8.4.3	<i>Controle Imunológico</i>	18
8.5	GLUTATIONA S-TRANSFERASE	24
8.5.1	<i>Características estruturais de GSTs da classe Mu baseadas em dados obtidos de GST de fígado de rato</i>	28
8.5.2	<i>GSTs de outros organismos</i>	29
9	OBJETIVOS DO TRABALHO	31
10	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
10.1	SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	32
10.1.1	<i>Soluções para Eletroforese</i>	32
10.1.2	<i>Soluções para ELISA</i>	32
10.1.3	<i>Soluções para cromatografia de afinidade - Glutathione Sepharose 4B</i>	32
10.1.4	<i>Soluções para ensaio de atividade enzimática</i>	33
10.1.5	<i>Solução de Revelação para Fosfatase Alcalina</i>	33
10.1.6	<i>Solução de Eluição de anticorpo purificado por adsorção</i>	33
10.1.7	<i>Outros tampões</i>	33
10.2	MARCADORES DE MASSA MOLECULAR	33
10.3	MEIOS DE CULTURA.....	34
10.4	ANTIBIÓTICOS.....	34
10.5	ENZIMAS	34
10.6	MATERIAL BIOLÓGICO.....	34
10.6.1	<i>Bacteriófago</i>	34
10.6.2	<i>Cepas bacterianas de Escherichia coli</i>	35
10.6.3	<i>Plasmídeo</i>	35
10.6.4	<i>Biblioteca de cDNA</i>	35
10.6.5	<i>ANIMAIS</i>	35

10.6.5.1	Coelhos	35
10.6.5.2	Bovinos	36
10.6.5.3	Carrapatos	36
10.6.5.3.1	Obtenção de Teleóginas	36
10.6.5.3.2	Obtenção de Partenóginas	36
10.6.5.3.3	Obtenção de Glândula Salivar, Ovário, Corpo Gorduroso e Intestino.....	36
10.6.5.3.4	Obtenção de Larvas.....	36
10.6.5.3.5	Obtenção de Proteínas de Carrapato	37
10.6.5.3.5.1	Extração com detergente	37
10.6.5.3.5.1.1	Proteínas de larvas.....	37
10.6.5.3.5.1.2	Proteínas de glândula salivar, intestino, corpo gorduroso e ovário.....	37
10.6.5.3.5.2	Extração Aquosa	37
10.6.5.3.5.2.1	Proteínas de glândula salivar e intestino	37
10.7	SOROS POLICLONAIS ANTI-GLÂNDULA SALIVAR DE PARTENÓGINA	37
10.7.1	<i>Absorção do soro policlonal com extrato de E. coli</i>	38
10.8	OBTENÇÃO DE SORO POLICLONAL MONOESPECÍFICO CONTRA SG2.....	38
10.9	SOROS POLICLONAIS ANTI-AGSG2	38
10.9.1	<i>Imunizações</i>	39
10.10	OBTENÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	39
10.10.1	<i>Purificação de RNA poli-A⁺</i>	39
10.10.2	<i>Análise Qualitativa e Quantitativa dos Ácidos Nucléicos</i>	39
10.10.3	<i>Síntese de oligonucleotídeos iniciadores</i>	40
10.10.3.1	Oligonucleotídeos iniciadores para SG2	40
10.10.3.2	Oligonucleotídeos iniciadores para actina.....	40
10.11	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	40
10.12	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	40
10.13	"WESTERN BLOT".....	41
10.13.1	<i>Eletro-Transferência de proteínas para nitrocelulose</i>	41
10.14	ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	41
10.15	PLAQUEAMENTO DO BACTERÍOFAGO UNI-ZAP [®] XR E TRANSFERÊNCIA PARA MEMBRANA DE NITROCELULOSE	41
10.15.1	<i>Crescimento e Preparação das Bactérias</i>	41
10.15.2	<i>Plaqueamento dos Bacteriófagos Uni-ZAP[®] XR – Infecção em Meio Líquido</i>	42
10.15.3	<i>Plaqueamento dos Bacteriófagos Uni-ZAP[®] XR – Infecção em Meio Semi-Sólido</i>	42
10.16	SONDAGEM IMUNOLÓGICA DA BIBLIOTECA DE CDNA	42
10.16.1	<i>Transferência para Membrana de Nitrocelulose</i>	42
10.16.2	<i>Sondagem com soro policlonal</i>	43
10.17	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA COM DNA PLASMIDIAL.....	43
10.17.1	<i>Preparação de Células Competentes</i>	43
10.17.1.1	<i>E. coli cepa XL1-Blue</i>	43
10.17.2	<i>Transformação com Choque Térmico</i>	43
10.17.2.1	<i>E. coli cepa SOLR</i>	44
10.18	ESTOCAGEM DOS BACTERÍOFAGOS UNI-ZAP [®] XR A PARTIR DE PLACA DE LISE	44
10.19	EXTRAÇÃO DOS VETORES pBLUESCRIPT SK(-) [®] RECOMBINANTE A PARTIR DOS ESTOQUES DOS BACTERÍOFAGOS UNI-ZAP [®] XR.....	44
10.20	RT-PCR	45
10.21	PCR ("POLIMERASE CHAIN REACTION").....	45
10.22	ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	46
10.23	PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA CODIFICADA POR SG2 (AGSG2)	46

10.24	TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE.....	47
10.25	DOSAGEM DE PROTEÍNA	47
11	RESULTADOS.....	48
11.1	SONDAGEM IMUNOLÓGICA DA BIBLIOTECA DE CDNA	48
11.2	EXCISÃO DOS FASMÍDEOS DO UNI-ZAP® XR.....	48
11.3	SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS DE SG2	48
11.4	ANÁLISE DE SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E AMINO ÁCIDOS DE AGSG2	48
11.5	RT-PCR DE TECIDOS DE <i>B. MICROPLUS</i>	54
11.6	"WESTERN BLOT" DE EXTRATOS DE TECIDOS DE <i>B. MICROPLUS</i>	55
11.7	PURIFICAÇÃO DE AGSG2	56
11.8	TITULAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA AGSG2 POR ELISA	56
11.9	WESTERN BLOT COM SORO DE BOVINO IMUNIZADO.....	57
11.10	HIPERSENSIBILIDADES IMEDIATA E TARDIA NO BOVINO	58
11.11	ENSAIO DE ATIVIDADE	59
12	DISCUSSÃO.....	60
13	CONCLUSÕES	66
14	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
15	ANEXO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

3LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

A	adenosina
APS	persulfato de amônio
B	bases
BLOTTO	"Bovine lacto transfer technique optimizer"
BCIP	"bromochloroindolyl phosphate"
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar ao RNA
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
cm	centímetro
D.O.	densidade óptica
DAB	diaminobenzidina
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido deoxirribonucléico
dNTP	deoxinucleotídeos trifosfatados
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetra acético
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
g	gravidade
IPTG	isopropil B-D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase
kDa	quilodalton
LB	Luria-Bertani
M	molar
mAmp	miliampère
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
µg	micrograma
µl	microlitros
µM	micromolar
N	normal

NBT	"nitroblue tetrazolium"
ng	nanograma
nm	nanômetro
OPD	ρ - fenilenodiamino dihidrocloreto
pb	pares de base
pg	picograma
PBS	solução salina tamponada com fosfato
RNA	ácido ribonucléico
SDS	dodecil-sulfato de sódio
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida com SDS
TEMED	N,N,N'N', tetrametilenadamina
TPCK	clorometil N-tosil-L-fenilalanina
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
pfu	unidade formadoras de placa de lise
V	volume
W	watt

4 Lista de Figuras

Figura 1: **Ciclo Biológico do carrapato *Boophilus microplus***

Figura 2: **Mapa metabólico da glutathiona.**

Figura 3: **Seqüência de nucleotídeos de SG2 e seqüência de amino ácidos correspondentes.**

Figura 4: **Gráfico da hidropatia de AgSG2**

Figura 5: **Alinhamento da seqüência de amino ácidos correspondente a AgSG2 com seqüências de amino ácidos de GSTs de diferentes organismos.**

Figura 6: **Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação por RT-PCR dos tecidos do carrapato *B. microplus*.**

Figura 7: **"Western Blot" de extrato proteico de tecidos de *B. microplus* e AgSG2 purificada com soro de coelho.**

Figura 8: **SDS-PAGE 12% com amostras da purificação de AgSG2 por cromatografia de afinidade Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia).**

Figura 9: **"Western Blot" de extrato proteico de glândula salivar de partenógina de *B. microplus* e AgSG2 purificada sondado com soro de bovino anti-AgSG2.**

Figura 10: **Gráfico do ensaio cromogênico de atividade enzimática para GSTs contra substrato cromogênico CDNB.**

5 Lista de Tabelas

TABELA I: Concentrações de antibióticos utilizados

TABELA II: Cepas Bacterianas Utilizadas

TABELA III: Plasmídeo Utilizado

TABELA IV- Reação de hipersensibilidade do bovino imunizado com AgSG2 purificada.

6 Resumo

O carrapato *Boophilus microplus* é um ectoparasita hematófago de bovino que causa sérias perdas econômicas. Estudos para o desenvolvimento de formas alternativas de controle do carrapato tem sido realizados para diminuir ou substituir a aplicação de agentes químicos, que contaminam o ambiente, os derivados da carne, além dos problemas de resistência das gerações de carrapatos aos acaricidas. As vacinas são uma forma alternativa de controle do carrapato.

As enzimas glutathione S-transferase (GSTs) são alvo potencial para intervenção imunológica contra alguns parasitas.

Este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar parcialmente um cDNA de *B. microplus* similar a GST da classe Mu. O clone SG2 foi isolado dentre aproximadamente 8×10^3 pfu de fagos recombinantes de uma biblioteca de cDNA de glândula salivar de partenógina, sondada com anti-soro de coelho contra glândula salivar.

O clone SG2 contendo um inserto de 864 pb teve sua seqüência determinada e a fase de leitura aberta corresponde a 220 amino ácidos. A análise desta seqüência indicou que o gene clonado codifica uma GST de *B. microplus* (BmGST) com um motivo altamente conservado entre os resíduos 60 e 68 que compreende o sítio de ligação a glutathione (GSH) e outro motivo SLAILRYL, centrado no resíduo 78 da seqüência. No alinhamento múltiplo da AgSG2 com outras GSTs foi observada uma similaridade de até 41% com GSTs da classe Mu de outros organismos e inclusive com outra GST da classe Mu isolada de larva de *B. microplus* (HE *et al.*, 1999).

A proteína recombinante AgSG2 purificada apresentou atividade enzimática contra o substrato cromogênico CDNB. Ensaio de atividade enzimática com extratos de tecidos, secreções e excreções foram realizados para verificar a presença de GST.

Ensaio de RT-PCR com tecidos de *B. microplus* indicaram que os sítios de síntese de BmGST são glândulas salivares e intestino de partenógina e teleógina.

7 Abstract

The tick *Boophilus microplus* is a blood sucking ectoparasite that causes major losses in bovine herds. Studies for alternative control methods have been pursued in order to decrease the frequency of application of acaricides that contaminates bovine derivatives and environment, as well as to avoid the rapid appearance of resistance to available chemical products. Vaccines are alternative method for tick control.

Glutathione S-transferases (GSTs) have been studied for their potential as targets for immunological intervention against some parasites.

The aim of this work was to isolate and partially characterize a cDNA from *B. microplus* similar to class Mu GST obtained from a cDNA library synthesized from salivary glands RNA of partially engorged females in the Uni-ZAP[®] XR (STRATAGENE) vector. An immunological screening was performed using sera from rabbit immunized with salivary gland extract, resulting in a single positive GST-similar clone (SG2) out of 8×10^3 pfu.

The 864 bp-cloned fragment was sequenced and showed an open reading frame of 220 amino acids. The analysis of this sequence showed that the cloned gene encodes a *B. microplus* GST (BmGST) composed of a conserved motif between residues 60 and 68, the active site where glutathione (GSH) binds and another motif SLAILRYL centered into residue 78. A multiple alignment of the deduced protein AgSG2 with other GSTs showed 41% amino acid homologies with class Mu GSTs of other organisms including another class Mu GST isolated from *B. microplus* larvae (HE *et al.*, 1999).

Purified recombinant protein AgSG2 showed an enzymatic activity against chromogenic substrate CDNB. Enzymatic activity with tissues extracts, secretions and excretions were tested to verify the GST presence.

RT-PCR with *B. microplus* tissues indicated that BmGST is synthesized into the salivary gland and gut of partially and fully-engorged female.

8 INTRODUÇÃO

8.1 O Carrapato *Boophilus microplus*

O carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887), originário da Ásia, é um ectoparasita hematófago de mamíferos (família Ixodidae - carrapatos duros) 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 (GONZALES, 1995; JOHNSTON *et al*, 1986).

8.2 Ciclo Biológico

O ciclo biológico do *Boophilus microplus* apresenta uma fase de vida parasitária e uma fase de vida livre. A fase parasitária ocorre no hospedeiro e dura aproximadamente 21 dias, na qual o carrapato passa pelos estágios de larva, ninfa e adulto. A fase de vida livre se inicia com a queda da fêmea ingurgitada (teleógina) e termina quando as larvas eclodidas encontram um hospedeiro. No início da fase de vida livre, a teleógina apresenta um período de pré-postura, influenciado pela temperatura ambiental (OLIVEIRA *et al*, 1974), e volume de sangue ingurgitado (NAGAR, 1968). Após realizar postura a teleógina morre. Em condições ideais de temperatura (28°C) e umidade (85%), a postura e eclosão ocorrem em cerca de 18 dias. As larvas recém eclodidas migram para as pontas da vegetação, onde localizam o hospedeiro pelo odor, vibrações, sombreamento e estímulo visual (WALADDE & RICE, 1982). As larvas que não encontram um hospedeiro têm o seu período de sobrevivência influenciado pela temperatura e umidade relativa do ar (LONDT & WHITEHEAD, 1972). As larvas que encontram hospedeiro se fixam em regiões corporais mais propícias para seu desenvolvimento, como as regiões posteriores da coxa, perineal, e perivulvar (WAGLAND, 1978). Após se fixarem, as larvas se alimentam de linfa (CASTRO & PEREIRA, 1946) e em aproximadamente sete dias, mudam para o estágio de ninfa e estas mudam para adulto, nos oito dias subsequentes, com marcado dimorfismo sexual. Nesse estágio, ocorre a cópula e a fêmea começa a ingerir sangue até seu ingurgitamento total, que propicia sua queda ao solo. O macho permanece no hospedeiro à procura de novas fêmeas, sobrevivendo até duas vezes mais que elas (ROBERTS, 1968). A figura 1 mostra esquematicamente os vários estágios no ciclo de vida do carrapato *B. microplus*.

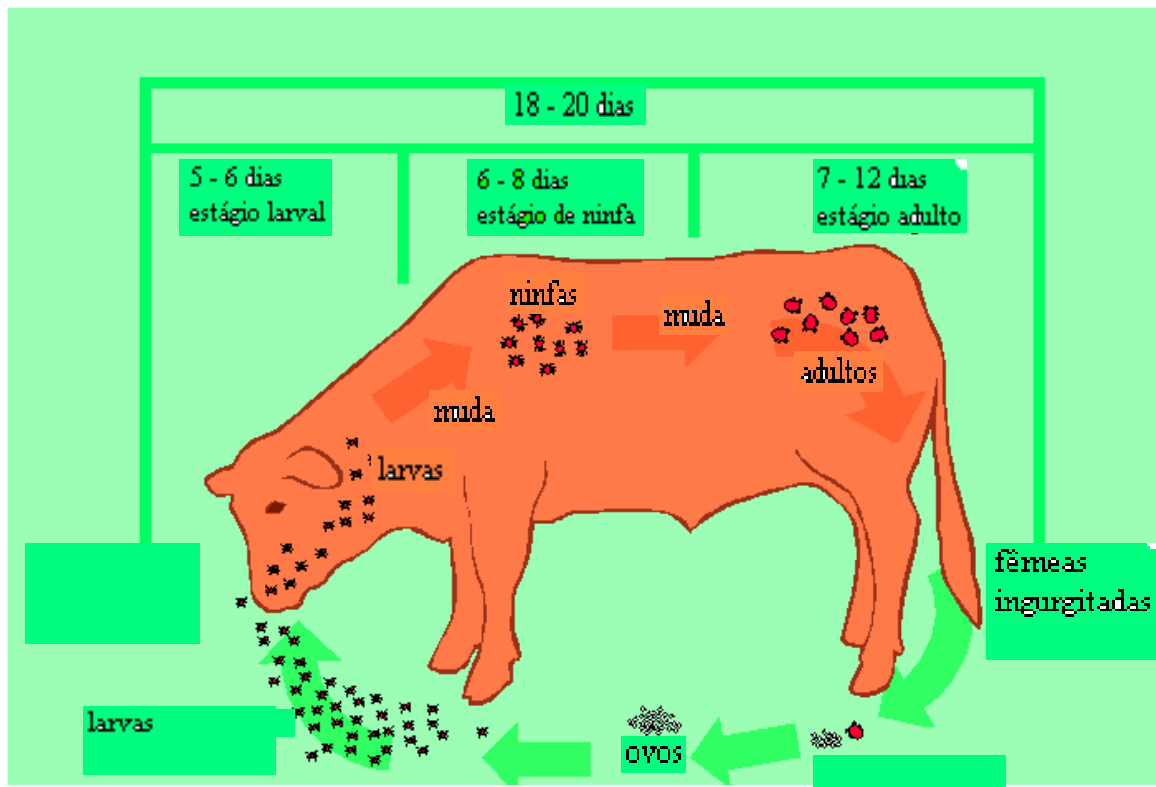


Figura 1: Ciclo Biológico do carrapato *Boophilus microplus*.

8.3 Importância Econômica

A ocorrência do *B. microplus* determina grandes perdas econômicas (HORN & ARTECHE, 1985) sendo o principal alvo em programas de controle e erradicação nos rebanhos da América do Sul (NARI, 1995). Pela sua ação espoliativa, sugando quantidades significativas de sangue (2 a 3 ml/ carrapato) (GONZALES, 1995), acarreta queda na produção de leite e carne (SUTHERST *et al*, 1983), danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato (SEIFERT *et al*, 1968). Além disso, este carrapato é vetor de hemoparasitas como os protozoários do gênero *Babesia* e rickétsia do gênero *Anaplasma*, agentes da tristeza parasitária bovina (TPB) (YOUNG & MORZARIA, 1986; McCOSKER, 1981). Além desses danos diretos, considerados prejudiciais à bovinocultura brasileira, existem aqueles indiretos, que são resultantes da mão-de-obra necessária para o controle desse parasita, assim como as demais despesas com instalações, compra de aspersores ou manutenção de banheiro e aquisição de carrapaticidas entre outros (CORDOVÉS, 1996).

Devido a complexidade da ação dos carrapatos sobre os animais e na pecuária de um modo geral, os prejuízos econômicos são de difícil cálculo, mas merecem ser salientados. Os maiores impactos econômicos do *B. microplus* na produção bovina são observados na América do Sul, América Central e Austrália (COBON & WILLADSEN, 1990). Na Austrália, os prejuízos anuais na cadeia produtiva devido aos carrapatos são da ordem de US\$ 42 milhões; para o México, as estimativas são de US\$ 3,05 bilhões. No Brasil, os prejuízos atribuídos ao carrapato situam-se próximo a oito dólares/bovino/ano, podendo dessa forma ultrapassar um bilhão de dólares anuais (GOMES, 1998).

8.4 Métodos de Controle

8.4.1 Controle Biológico

O *B. microplus*, como qualquer organismo, tem sua viabilidade relacionada às 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 influenciar na população de carrapatos. Algumas pastagens podem facilitar uma infestação. Outras pastagens, como as do gênero *Stylosanthes*, podem dificultar a sobrevivência das larvas, diminuindo a população de carrapatos por sua ação repelente ou tóxica (SUTHERST *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*) (FARIAS *et al*, 1986). O sistema de rotação de pastagens, no qual uma área fica livre de bovinos por um período de tempo suficiente para impedir a sobrevivência das larvas, também poderia ser uma forma alternativa de controle. No entanto, esta prática não pode ser aplicada em uma propriedade rural pequena.

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 fases imaturas 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), o pássaro "vira-bosta" (*Molotrus bonariensis*), o quero-quero (*Vanellus chilensis*) e formigas carnívoras que se alimentam das teleóginas que caem ao solo (GONZALES, 1995).

Bactérias, como *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* são naturalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato. BRUM (1988) relatou uma diminuição de até 47% na quantidade de ovos postos quando fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* eram imersas em suspensão de *C. lapagei*. Através de microscopia óptica, o mesmo autor observou a destruição do epitélio da vagina de fêmeas que não realizaram postura.

A atuação de fungos no controle biológico do carrapato, tem sido muito estudada nos últimos anos. ZHIOUA *et al.* (1997) verificaram que o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é altamente patogênico para carrapatos *Ixodes scapularis*. KAAYA *et al.* (1996) demonstraram que os fungos *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* induzem a mortalidade de aproximadamente 30% dos carrapatos *Rhipicephalus appendiculatus* adultos alimentados em coelhos, enquanto que *M. anisopliae* induzem a mortalidade de 37% em *Amblyomma variegatum* adultos. Também demonstraram que estes fungos não perdem sua infectividade sobre o carrapato quando são incubados com acaricida até por mais de 120 horas, mantendo o crescimento e suas características morfológicas normais. Frazzon *et al.*, (2000) avaliaram *in vitro* os efeitos de alguns isolados de *M. anisopliae* sobre fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*. Neste estudo, demonstraram que, dependendo da concentração de esporos numa suspensão, alguns isolados de *M. anisopliae* podem causar morte de até 100% dos carrapatos infectados.

8.4.2 Controle Químico

O controle do carrapato tem sido praticamente dependente do uso de acaricidas desde a década de 50 (PRUETT, 1999). O uso indiscriminado e continuado destes acaricidas levou à seleção de carrapatos resistentes (NORVAL *et al.*, 1992 apud KOCAN, 1995) representando um sério problema para a saúde e produção animal em várias partes do mundo (SOLOMON, 1983). Foram utilizados, seqüencialmente, acaricidas baseados em compostos arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamato, formamidinas e piretróides. Os três mais recentes grupos químicos de produtos contra o carrapato que se encontram disponíveis hoje no mercado são: as formamidinas, os piretróides e as avermectinas. Entretanto, ainda encontram-se à venda alguns produtos de um grupo mais antigo, os organofosforados (GOMES, 1998).

A aplicação dos carrapaticidas se faz por meio de pulverização, imersão, dorsal (*pour-on*) e inoculação (caso das avermectinas). Cada método apresenta suas vantagens e

desvantagens e a escolha depende da região, tipo de criação, manejo, número de animais e custo (GOMES, 1998).

O carrapato *B. microplus* pode apresentar resistência mais rapidamente que outros carrapatos, presumivelmente, pelo curto período de tempo entre as gerações (KOCAN, 1995). Outra causa de resistência é a subdosificação empregada, em alguns casos, por falhas de manejo.

Os problemas de resistência, alto custo dos produtos químicos, 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 e PRUETT, 1999). Espera-se que essas tecnologias (de controle biológico e imunológico) formem a base do controle de ectoparasitas no futuro (NOLAN, 1985).

Atualmente, métodos de controle 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).

8.4.3 Controle Imunológico

Sabe-se que algumas raças bovinas adquirem certa resistência ao carrapato durante sucessivas infestações por este parasita (ALLEN, 1994). Autores como RIECK (1962) e O'KELLY & SEIFERT (1969, apud WIKEL & WHELEN 1986), assim como WHARTON *et al* (1970) e O'KELLY & SPIERS (1976) sugeriram que raças puras de *Bos indicus* e seus cruzamentos eram mais resistentes a infestações pelo carrapato do que raças de *Bos taurus* devido a resistência inata.

A resistência inata era atribuída à espessura do couro, à densidade de glândulas sebáceas, aos folículos pilosos superficiais e outros fatores. No entanto, experimentos de HEWERTSON (1971) e WAGLANG (1975, 1978) demonstraram que o *B. taurus* e *B. indicus* possuíam igual suscetibilidade à primeira infestação, concluindo que zebuínos são capazes de montar uma resposta imune mais eficiente às infestações subsequentes. A diferença na habilidade do *B. indicus* e *B. taurus* em desenvolver imunidade protetora naturalmente adquirida foi reconhecida em 1918 por Johnston e Brancoft que publicaram o primeiro artigo que relatava o fenômeno (BROWN, 1988).

A habilidade em adquirir resistência é hereditária (WHARTON *et al*, 1970) e também depende de condições relacionadas ao estresse do animal como, por exemplo, deficiência

nutricional e durante lactação (TATCHELL, 1987). A herdabilidade da resistência ao carrapato é cerca de 80% em *B. indicus* e 40%-50% em *B. taurus* (SEIFERT, 1971) indicando que o cruzamento com touros de raças zebuínas é o método mais rápido de aumentar a resistência de raças européias (UTECH & WHARTON, 1982).

Vários experimentos demonstraram a participação do sistema imune na resistência ao carrapato. TRAGER (1939) observou a aquisição de resistência a futuras infestações, com redução significativa no número e peso dos carrapatos ingurgitados quando cobaios e coelhos eram infestados com o carrapato *Dermacentor variabilis* e que esta resistência podia ser induzida por inóculos de extratos de larvas. Também demonstrou que a transferência passiva de soro de animais resistentes conferia resistência ao carrapato *D. variabilis* causando uma queda de 50% no número de carrapatos ingurgitados, indicando que a proteção era devida à resposta humoral. 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 (WILLADSEN, 1980 e WIKEL, 1997). Essas observações forneceram bases para as futuras tentativas de utilização de vacinas no controle de ectoparasitas.

O controle imunológico dos carrapatos 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.

WIKEL & ALLEN (1976a) demonstraram que cobaios desenvolvem resistência a infestações por *D. andersoni* após a primeira infestação e que esta resistência poderia ser transferida passivamente por células de linfonodos de animais resistentes, sugerindo que a resposta celular é mais eficiente que a resposta humoral.

Reações celulares cutâneas nos locais de fixação do carrapato variam entre indivíduos susceptíveis e resistentes (BROWN, 1985 e WIKEL, 1996 apud PRUETT, 1999). As células inflamatórias liberam histamina que inibem a salivação do carrapato e sua alimentação (PAINE, 1983 apud PRUETT, 1999).

Com o objetivo de induzir uma melhor resistência nos animais, vários estudos vem sendo desenvolvidos na tentativa de obtê-la por imunização artificial. ALLEN & HUMPHREYS (1979) mostraram que extratos de órgãos internos de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *D. andersoni*, quando usados para imunizar cobaios, conduziam a uma redução drástica no peso dos carrapatos ingurgitados e a uma diminuição ou abolição da postura, sendo que os poucos ovos postos não eram viáveis. Os mesmos autores, realizaram o

mesmo experimento em bovinos utilizando extrato de intestino juntamente com o de órgãos reprodutores. Neste caso, os efeitos foram menos drásticos embora, o peso e postura dos ovos tenham sido afetados.

McGOWAN *et al.* (1980) inocularam coelhos com extrato de *Amblyomma maculatum* macho não alimentado e observaram uma redução no peso dos carrapatos adultos e na massa de ovos. WIKEL (1981) preparou extrato de glândula salivar de fêmeas de *D. andersoni* parcialmente ingurgitadas em coelhos e imunizou cobaios. O número de larvas ingurgitadas diminuiu 50% e o peso dos carrapatos ingurgitados, 68%. 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. Os melhores resultados foram obtidos com inoculação intradermal utilizando o adjuvante incompleto de Freund (WIKEL, 1981). Cobaios imunizados com glândula salivar e cemento de *A. americanum* apresentaram um grau de resistência quando desafiados, similar a obtida por cobaios infestados repetidamente. Foi sugerido que uma proteína de 20.000 presente na glândula salivar seria a responsável pela maior parte desta proteção (BROWNS *et al.*, 1984).

SHAPIRO *et al.* (1986) baseados na observação de que o hospedeiro pode desenvolver imunidade a infestações subsequentes, quando infestado repetidas vezes, demonstraram que o soro de cobaios resistentes à infestações com *Rhipicephalus apendiculatus*, reconhece preferencialmente antígenos presentes na glândula salivar do carrapato ou nas substâncias secretadas para sua fixação. Neste trabalho foi verificado que antígenos de membrana de intestino e de extratos totais de diversos estágios do parasita também são reconhecidos por aqueles soros. Os dados obtidos indicam que a resistência ao carrapato é um fenômeno complexo, provavelmente desencadeado por diversos antígenos do carrapato.

Segundo WILLADSEN (1987), para qualquer ectoparasita hematófago, o repertório de antígenos em potencial, ou seja, moléculas do parasita que possam ser encontradas pelo sistema imune do hospedeiro, durante a alimentação, é bastante limitado, enquanto que a variedade de moléculas do parasita que é exposta aos componentes do sangue do hospedeiro durante a ingurgitação é grande. Portanto, deve existir uma diversidade de alvos em potencial para um ataque imunológico do hospedeiro no parasita. Trabalhos visando identificar "antígenos ocultos" ou aqueles antígenos que nunca são expostos diretamente ao sistema

imune do hospedeiro durante uma infestação (como antígenos de intestino e ovário), foram desenvolvidos com carrapatos após os trabalhos de ALGAR & CABRERA (1972) e SCHLEIN & LEWIS (1976). Os primeiros demonstraram que mosquitos alimentados em coelhos imunizados com homogeneizado de intestino de *Anopheles stephensi* tem um índice de mortalidade maior do que aqueles alimentados em coelhos controles. Os autores seguintes demonstraram que a imunização de coelhos com tecidos de *Stomoxys calcitrans* é também capaz de aumentar o índice de mortalidade em moscas alimentadas nos mesmos.

Imunizações de gado *B. taurus* e híbridos *B. taurus* e *B. indicus*, com extratos protéicos derivados de fêmeas adultas de *B. microplus*, resultaram em uma grande variação no grau de resistência apresentado pelos indivíduos quando desafiados. Entretanto ambos os tipos de gado apresentaram este tipo de variação, sendo que os danos mais evidentes nos carrapatos foram encontrados no intestino. No entanto, não houve correlação entre nível de anticorpos contra o extrato total e a proteção apresentada sugerindo que, apesar da proteção ser causada por anticorpos contra tecidos intestinais, a maioria dos antígenos presentes no extrato não era protetora (JOHNSTON *et al.*, 1986). Animais vacinados e desafiados em condições naturais, ou seja, em campos infestados com o carrapato *B. microplus*, mostraram resultados idênticos aos obtidos em condições experimentais. Também nestas condições a imunidade adquirida, medida pela diminuição no número de carrapatos e peso total de ovos, variou tanto em animais vacinados como não-vacinados (WONG & OPDEBEECK, 1993).

Analisando carrapatos coletados de animais imunizados com antígenos de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, KEMP *et al.* (1986) observaram que aproximadamente 60% das fêmeas adultas que completaram o ciclo parasitário nos bovinos resistentes além de apresentarem lesões no intestino, não estavam totalmente ingurgitadas e não efetuaram postura. Estes estudos sugerem que "antígenos ocultos" podem ser alvos para os efetores da resposta imune.

WILLADSEN & KEMP (1988) referindo os antígenos do intestino, conceituaram o termo vacinação contra "antígenos ocultos" em carrapatos. Estes "antígenos ocultos" teriam duas características principais: 1) não estimulariam respostas imunes durante infestações naturais, pois ficariam "ocultos" do sistema imune do hospedeiro devido a sua localização no parasita; 2) porém, no hospedeiro vacinado artificialmente contra estes antígenos, os anticorpos e outros fatores imunológicos que estariam presentes no sangue ingerido causariam danos e inibição de sua(s) função(ões) (WILLADSEN *et al.*, 1993)

WILLADSEN *et al.* (1988) isolaram antígenos protetores a partir de um experimento de imunização de bovinos com três diferentes frações do extrato total de fêmeas adultas

ingurgitadas de *B. microplus*. Uma glicoproteína associada a membranas de células intestinais (Bm86) foi purificada e em experimentos de vacinação mostrou ser capaz de induzir uma proteção em bovinos contra *B. microplus*. A imunização levou a diminuição no número de carrapatos sobreviventes, no peso dos carrapatos ingurgitados e na capacidade de postura. A Bm86 induziu a produção de anticorpos que inibiram a endocitose das células intestinais sem, contudo, causar lise celular (WILLADSEN *et al.*, 1989). Ensaio 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.

O gene da Bm86 foi clonado em *E. coli* (RAND *et al.*, 1989). A proteína recombinante, quando utilizada em experimentos de vacinação conferiu menor grau de proteção em bovinos infestados quando comparada com a proteção obtida por imunização 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 na vacinação de bovinos, sob condições controladas, onde foi observada uma queda de 31% no número de carrapatos, 50% no peso destes, e redução de 70% na habilidade reprodutiva dos carrapatos que se desprenderam do hospedeiro. Em bovinos a 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 baculovirus (RICHARDSON *et al.*, 1993).

Outro antígeno isolado de *B. microplus* é a proteína Bm91, a qual também confere em bovinos resistência ao carrapato. Esta proteína é glicosilada, possui massa molecular aparente de 86.000 e um ponto isoelétrico entre 4,8 e 5,2 sendo encontrada em baixa concentração nas glândulas salivares e intestino de fêmeas adultas. 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, sugerindo que ela representa outro exemplo de "antígeno oculto" (RIDING *et al.*, 1994).

LOGULLO *et al.* (1998) purificaram um precursor de proteinase aspártica de *B. microplus*, a BYC (*Boophilus* Yolk Cathepsin) um outro exemplo de "antígeno oculto". Sugere-se que este antígeno tenha papel na degradação da vitelina pelo embrião durante a embriogênese. Em experimentos de inóculo 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 analisados apresentaram uma correlação significativa com a dose de anticorpo monoclonal inoculada nas teleóginas (DA SILVA VAZ Jr. *et al.*, 1998).

OPDEBEECK *et al.* (1989) observaram a presença de antígenos protetores no intestino de *B. microplus* na fase de larva. Estes antígenos foram detectados por anticorpos do soro de bovinos imunizados com antígenos de intestino de carrapatos, na fase adulta, e protegeram bovinos em mais de 80% em desafios com *B. microplus*. DA SILVA VAZ, Jr *et al.* (1994) demonstraram que o soro de bovinos infestados com *B. microplus* reage contra extratos de glândula salivar, intestino, embriões e larvas.

Os estudos para o desenvolvimento de vacinas baseiam-se na proposição de que como parasitas não se encontram distribuídos de forma normal na população de hospedeiros, provavelmente a imunidade natural e resistência adquirida de alguns indivíduos devem contribuir com a distribuição desigual dos parasitas. Se indivíduos susceptíveis são responsáveis pela transmissão e manutenção da população de parasitas, uma forma de controle seria torná-los resistentes através da vacinação. Vacinas contra carrapato reduzem a população, primeiramente, reduzindo a postura e eclosão dos ovos. 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 persistem por longo período sem deixar resíduos tóxicos, e podem ser espécie específicas. Estudos indicam que a imunidade protetora conferida por antígenos convencionais (moléculas do parasita expostas ao hospedeiro durante a interação parasita-hospedeiro) não é suficiente para um controle efetivo do parasita. Desta forma, "antígenos ocultos" seriam alvos fisiológicos que normalmente são mais imunogênicos que os antígenos convencionais. GALUN (1975) argumenta, que o controle de ectoparasitas pela imunidade do hospedeiro seria mais completo se parasitas ingerissem sangue contendo anticorpos capazes de neutralizar, por exemplo, hormônios do desenvolvimento (PRUETT, 1999).

No entanto, a vacina deve ser empregada 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.

Atualmente, TickGARDTM e GAVACTM são as únicas vacinas disponíveis comercialmente para o controle do carrapato *B. microplus* (PRUETT, 1999) e ambas utilizam

o mesmo antígeno (Bm86) (WILLADSEN, 1999). A GAVACTM é a vacina cubana, disponível em Cuba, na Colômbia, República Dominicana, Brasil e México e sua eficiência no controle do *B. microplus* varia de 55% a 100%. (DE LA FUENTE *et al.*, 1999)

A GAVACTM foi primeiramente testada no Brasil em bovino mestiços, destinados à produção de carne e leite e também bovinos de raças puras (zebuínos e taurinos) numa propriedade no interior de São Paulo. Em bovinos mestiços vacinados e mantidos em regime de estabulação, considerando os índices percentuais dos parâmetros analisados referentes ao número de carrapatos, peso médio das fêmeas, percentual de mortalidade, diminuição da ovoposição e da fertilidade dos ovos, a eficácia integral atingiu 51% nas condições estudadas. Já nos testes realizados a campo, na mesma região, a comparação estatística da taxa de infestação de carrapatos demonstrou diferenças entre os dois grupos experimentalmente estudados, comprovando a ação da vacina no controle da população de carrapatos em percentuais de 60% a 87% de eficácia (HEBER, 1996).

Espera-se que o método de controle imunológico se torne uma tecnologia de baixo custo, sem contaminação dos derivados da carne, da mão-de-obra utilizada, sem resíduos no ambiente e que seja específico para o parasita de interesse (WILLADSEN, 1999).

8.5 Glutathione S-Transferase

A enzima glutathione S-transferase (GST) (EC 2.5.1.18) tem uma ampla distribuição filogenética e pertence a uma família de proteínas diméricas multifuncionais envolvidas na detoxificação celular (STANLEY *et al.*, 1988) e excreção de substâncias fisiológicas e xenobióticas, auxiliando na proteção celular contra estresse e toxicidade química (DIRR *et al.*, 1994). Catalisa a adição nucleofílica do grupo tiol da glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine - GSH) reduzida a centros eletrofílicos em componentes orgânicos. A conjugação de átomos de enxofre (grupo tiol) da glutathione com uma ampla variedade de componentes eletrofílicos, tanto de origem endobiótica quanto xenobiótica, (KETTERER *et al.*, 1988 apud FAVALORO *et al.*, 1998) os tornam mais solúveis em água, facilitando sua eventual eliminação. Esta reação é um dos passos iniciais da rota do ácido mercaptúrico (Figura 2) na qual xenobióticos hidrofóbicos são inativados e eliminados do organismo (HABIG *et al.*, 1974; WILCE & PARKER, 1994). Os vários substratos utilizados pelas GSTs são estruturalmente diversos, mas tem em comum a característica de serem muito hidrofóbicos e ligados a um centro eletrofílico. A atividade específica das GSTs sobre certos substratos tem sido usada para classificação de novas GSTs (WILCE & PARKER, 1994).

GSTs citosólicas são subdivididas em pelo menos sete (7) classes designadas Alfa, Mu, Pi (MANNERVIK *et al.*, 1985) Theta (MEYER *et al.*, 1991), Sigma (JI *et al.*, 1995), Kappa (PEMBLE *et al.*, 1996) e Zheta (BOARD *et al.*, 1997). Os membros das diferentes classes têm monômeros similares em tamanho (entre 24 e 28KDa) e têm distinta, mas sobreposta especificidade a substrato. Sua classificação é baseada na especificidade a substratos e inibidores, reatividade cruzada de anticorpos e estrutura primária. (ROSSJOHN *et al.*, 1997). A identidade de seqüência inter-classes é, geralmente, menor que 30% (FAVALORO *et al.*, 1998). A heterogeneidade das GSTs é ainda maior devido as modificações covalentes pós-traducionais, como glicosilação (KUZMICH *et al.*, 1991 apud WILCE & PARKER, 1994).

GSTs são encontradas na forma de homo e heterodímeros devido aos múltiplos genes e hibridização dos monômeros. A dimerização e hibridização ocorre apenas entre subunidades da mesma classe e não entre subunidades de classes diferentes indicando haver um reconhecimento molecular classe-específico na interface das subunidades (DIRR *et al.*, 1994). Cada dímero tem dois sítios ativos, que são independentes um do outro (DANIELSON *et al.*, 1985). Cada sítio ativo consiste de pelo menos duas regiões ligadoras: o sítio de ligação a GSH (sítio G) que é muito específico, enquanto que o sítio de ligação hidrofóbico para substratos eletrofilicos (sítio H) é menos específico permitindo que a GSH reaja com uma ampla variedade de agentes tóxicos.

Estudos cristalográficos sobre GSTs de diversas espécies (DIRR *et al.*, 1994, JI *et al.*, 1995, FAVALORO *et al.*, 1998 e ROSSJOHN *et al.*, 1997) elucidaram a estrutura quaternária desta enzima. Apesar da baixa identidade inter-classes, os monômeros de GST demonstram ter estrutura organizacional básica similar. Dois domínios são ligados por uma seqüência de seis ou sete resíduos de amino ácidos. O domínio I, com estrutura α/β está localizado principalmente na região N-terminal da proteína, contendo o sítio G. O domínio II, formado por α - hélice, contém o sítio H (FAVALORO *et al.*, 1998).

Nas classes Alfa, Mu, Pi e Sigma de GSTs, um resíduo de tirosina conservado na região N-terminal é essencial para a catálise pela ativação do grupo tiol da GSH. Este resíduo de tirosina é também altamente conservado em muitas GSTs bacterianas. NISHIDA *et al.* (1994) e CASALONE *et al.* (1998) realizaram experimentos de mutagênese com GSTs de *E. coli* e *Proteus mirabilis* e demonstraram que o resíduo de tirosina não é essencial para catálise (FAVALORO *et al.*, 1998). As GSTs da classe Theta perderam o resíduo de tirosina do sítio ativo, e BOARD *et al.* (1995), com experimentos de mutagênese sítio dirigida, demonstraram que um resíduo de serina presente na porção N-terminal está envolvido na catálise (FAVALORO *et al.*, 1998) das GSTs da classe Theta.

Segundo artigo de revisão sobre GSTs (WILCE & PARKER, 1994) algumas GSTs parecem ter atividade catalítica secundária, incluindo a atividade de peroxidase e isomerase (CHEN *et al.*, 1998). Além da sua atividade catalítica, podem participar da síntese de prostaglandinas (MEYER, *et al.*, 1995), atuar como transportadores intracelulares de vários componentes hidrofóbicos, tais como bilirrubina, heme, esteróides, hormônios da tireóide e sais biliares. Essas ligações freqüentemente resultam na inibição da atividade catalítica da molécula (MANNERVIK *et al.*, 1985).

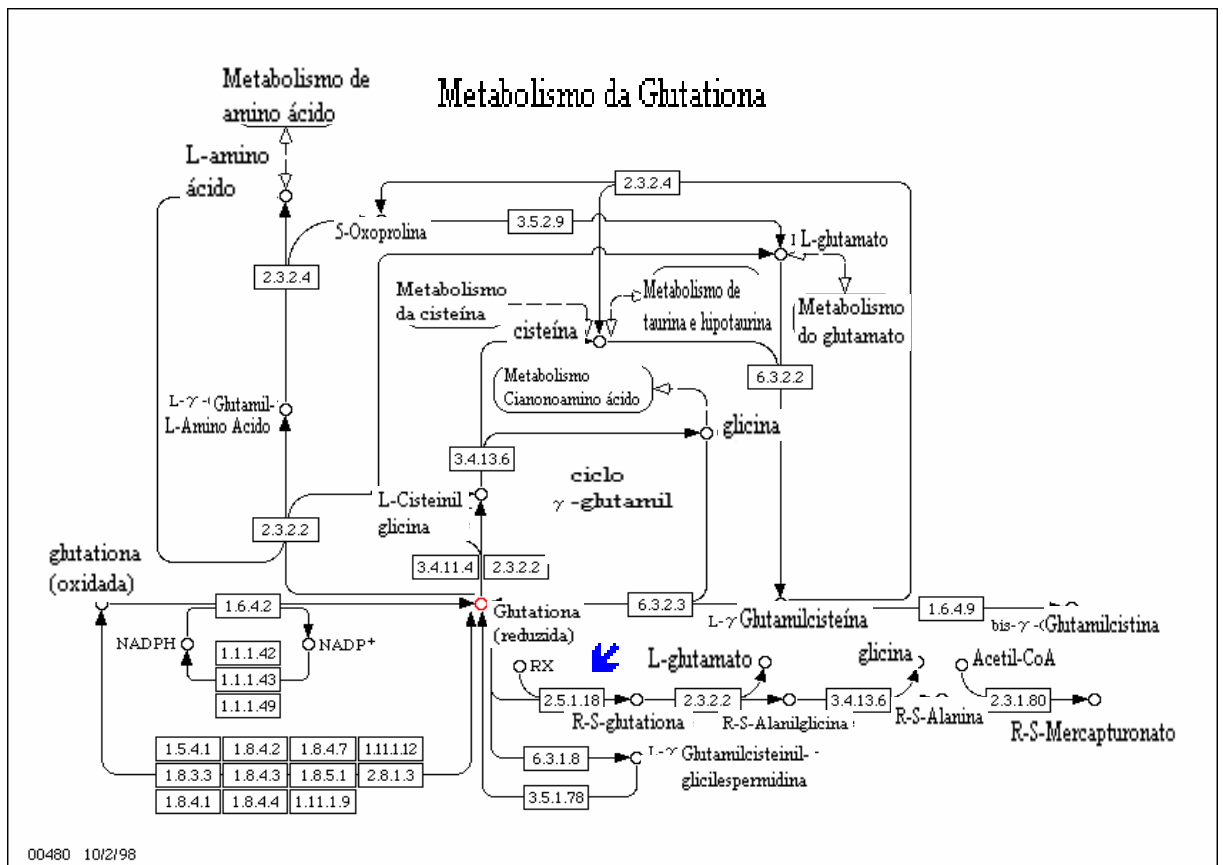


Figura 2: Mapa metabólico da glutathiona. A enzima GST está identificada pelo número E.C. 2.5.1.18 e indicada pela seta azul, na rota do ácido mercaptúrico. Mapa retirado dia 10/02/2000 de <http://www.cgsc.biology.yale.edu> (figura modificada).

Autores sugerem que as GSTs humanas das classes Alpha, Mu e Pi parecem ser produtos de pelo menos seis genes: A1, A2 (classe Alpha), M1, M2, M3, M4, M5 (classe Mu) e P1 (classe Pi) (BOARD *et al.*, 1995; ZHONG *et al.*, 1993 e TAKAHASHI *et al.*, 1993). Há indícios de que as GSTs surgiram de um gene comum, com exceção da GST microsomal cuja seqüência não parece ter relação com GSTs citosólicas (MORGENSTERN *et al.*, 1985).

Alguns autores argumentam que GSTs dependentes de glutathione evoluíram em organismos aeróbicos em resposta a geração de produtos tóxicos do metabolismo do oxigênio (FAHEY *et al.*, 1991 apud WILCE & PARKER, 1994). A conservação e substituição conservativa de resíduos-chaves ao longo da sequência, sugerem que GSTs evoluíram por divergência de um gene ancestral comum.

Os limites exons/introns observados nas classes Alpha, Pi e Mu de mamíferos são muito similares, sugerindo que a evolução e diversificação das GSTs se devem, em parte, a mistura de exons (BJORNESTEDT *et al.*, 1992, ZHANG *et al.*, 1992). Há propostas que as GSTs da classe theta tenham sido precursoras das enzimas das classes Alpha, Mu e Pi baseada na sua aparente distribuição numa diversidade de organismos. Outras GSTs teriam surgido pela duplicação do gene da classe Theta permitindo que organismos se adaptassem ao estresse tóxico durante a evolução (PEMBLE *et al.*, 1992).

GSTs citosólicas têm sido muito estudadas em tecidos de humanos, ratos e camundongos onde estão em abundância. No fígado humano compreende cerca de 5% das proteínas citosólicas totais. A GST da classe Pi é a isoenzima mais amplamente distribuída e usualmente a mais abundante (SUZIKI *et al.*, 1987). A expressão das diferentes isoenzimas é tecido-específica. A GST da classe Alpha é a isoenzima majoritária no fígado e baço humanos, enquanto GST da classe Pi é predominante na placenta, eritrócitos, pulmões e próstata (MANNERVIK *et al.*, 1985; DI ILIO *et al.*, 1990).

Em procariotos, a atividade de GST foi recentemente descoberta. Pouco se sabe a respeito das propriedades das GSTs em procariotos, porém parecem também estar implicadas na biodegradação de xenobióticos, incluindo antibióticos (FAVALORO *et al.*, 1998).

GSTs também estão envolvidas no desenvolvimento de resistência de células e organismos frente a drogas, pesticidas, herbicidas, antibióticos (MANNERVIK *et al.*, 1988, PICCOLOMINI *et al.*, 1989 apud WILCE & PARKER, 1994, FOURNIER *et al.*, 1992, PERITO *et al.*, 1996; NEUEFEIND *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 1998) e anti-helmínticos (SHARP *et al.*, 1991).

Particularmente, a superexpressão de GSTs em tumores parece estar relacionada com resistência adquirida contra drogas anti-tumorais tornando as GSTs um alvo terapêutico para desenvolvimento de novas drogas (COLES *et al.*, 1990). As GSTs que parecem ter papel na resistência a drogas anti-tumorais pertencem as classes Alpha e Pi (OUWERKERK *et al.*, 1995, MANNERVIK *et al.*, 1987, TERRIER *et al.*, 1990).

Em parasitos, KAWALEK *et al.* (1984) demonstraram que a atividade de GST em *Haemonchus contortus* resistentes a cambendazole é 1,5 a 1,8 vezes maior quando comparada

com cepas susceptíveis. MILLER *et al.* (1994) em *Fasciola hepatica*, também encontraram uma correlação entre nível de atividade de GST e eficiência da droga utilizada no controle da fasciolose. Neste caso, ao contrário dos demais estudos, observaram que uma diminuição na atividade de GST estava associada a um aumento na resistência as drogas.

HE *et al.* (1999) purificaram, caracterizaram e clonaram uma GST da classe Mu a partir de larvas de *B. microplus* com o objetivo de investigar o papel da GST de carrapato na resistência a acaricidas. Comparando isolados susceptíveis e resistentes a acaricidas, constataram não haver diferença na seqüência de cDNA obtida, nem nos níveis de expressão da GST estudada, entre os isolados de carrapato testado.

SMITH *et al.* (1986) constataram que GST de *S. japonicum* é reconhecida por anticorpos de camundongos infectados por este parasita. E que camundongos resistentes tem níveis mais altos de anticorpos anti-GST no soro do que camundongos que permanecem susceptíveis. Com esta observação surgiu a hipótese de que, neste modelo animal, a resposta imune contra GST seria responsável pela resistência adquirida contra infecção por *S. japonicum* (SHARP *et al.*, 1991). Em 1987, um antígeno recombinante de *S. mansoni* (Mr 28K) expressado e purificado por BALLOUL *et al.*(1987) mostrou ter atividade de GST e similaridade de seqüência com GSTs de mamíferos (TAYLOR *et al.*, 1988 apud SHARP *et al.*, 1991).

Em estudos de imuno-eleto-microscopia, TAYLOR *et al.*, (1988) mostraram que em *S. mansoni* a GST parece estar no tegumento e associada a estruturas que podem estar acessíveis ao sistema imune do hospedeiro. HOLY *et al.*, (1989) encontraram GST distribuída pelo parênquima dos vermes adultos. DOUCH & BUCHANAN (1978) já haviam localizado GST no epitélio intestinal do nematodo *Ascaris suum*, podendo estar envolvida na digestão. KOTZE & ROSE (1987) encontraram, em *Lucilia cuprina*, atividade de GST distribuída pelo corpo gorduroso, cutícula, intestino e sangue.

Como a GST parecia ser um antígeno protetor no sistema roedor/*Schistosoma*, mais estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar se GST pode atuar como antígeno protetor em outros sistemas hospedeiro/parasita.

8.5.1 Características estruturais de GSTs da classe Mu baseadas em dados obtidos de GST de fígado de rato

A classe Mu das GSTs é a única cujo complexo com substrato fisiológico foi descrito (JI *et al.*, 1992). Apesar do baixo nível de identidade (31%), GSTs da classe Mu apresentam

uma topologia geral semelhante as da classe Pi. Domínio I (N-terminal) compreende resíduo 1 a 82 e domínio II (C-terminal) compreende resíduos 90 a 217 com uma curta região de ligação conectando os dois domínios. A estrutura dimérica é formada por interações hidrofílicas e hidrofóbicas, e é importante para atividade enzimática. Monômeros isolados não tem atividade. O dímero visto de lado tem uma forma em "V" tendo os domínios II de ambas subunidades expostos. O sítio de ligação a glutathione está localizado na fenda em forma de "V" em contato com os dois domínios I das subunidades. O motivo consenso centrado no resíduo 67, localizado ao final da região N-terminal está envolvido na ligação da glutathione. O sítio de ligação ao substrato é adjacente ao sítio de ligação a glutathione (GSH) compreendendo a fenda hidrofóbica (WILCE & PARKER, 1994).

A maior diferença entre as duas estruturas (Pi e Mu) é uma longa alça entre β -fita 2 e α -hélice 2 do domínio I (resíduo 33-42), denominada, a alça Mu, que torna a fenda do sítio ativo mais profunda comparada a da classe Pi. A ligação da GSH ao sítio G confere a mesma conformação que para classe Pi. Há cerca de 20 pontes de hidrogênio ou pontes salinas envolvidas na ligação da GSH com a enzima. Há 7 resíduos que fazem contato com a glutathione na classe Pi que são conservados na seqüência da classe Mu e todos os 7 mantêm o mesmo contato nas duas classes.

O sítio de ligação ao substrato ainda não foi identificado cristalograficamente na classe Mu. Mas estudos por ressonância magnética e sobreposição de estrutura cristalizada da classe Pi e Mu, sugerem que o sítio de ligação ao substrato de ambas está em posições equivalentes.

A identidade de seqüência entre as classes Alpha, Mu e Pi, baseada na estrutura tridimensional, é de cerca de 20% e 32%, respectivamente (SINNING *et al.*, 1993).

O domínio I é o mais similar entre as GSTs das classes Alpha, Mu e Pi, havendo a maior diferença na classe Mu, devido a alça-Mu. A ligação da glutathione ocorre no mesmo sítio em todas as estruturas cristalizadas de GST, porém, alguns detalhes na interação são diferentes. Na classe Alpha parece haver uma interação adicional do enxofre da glutathione com Arg-15, que nas outras classes (Pi e Mu) interage somente com a hidroxila da tirosina conservada. A localização do sítio de ligação a substrato é similar, mas não idêntica entre as classes. O fato da ligação ao substrato não ser idêntica é uma consequência de diferenças topológicas existentes no sítio de ligação ao substrato entre as classes de isoenzimas.

8.5.2 GSTs de outros organismos

Segundo BROPHY *et al.* (1990 e 1994) as GSTs de helmintos, incluindo nematodos e cestodos, representam as principais enzimas de detoxificação e conseqüentemente, têm sido

alvo de interesse quimioterápico e imunológico (SMITH *et al.*, 1986; SEXTON *et al.*, 1990, 1994; BALLOUL *et al.*, 1987,).

PANACCIO *et al.*(1992) e MURO *et al.* (1993) clonaram e sequenciaram quatro isoformas de GSTs de *Fasciola hepatica*, todas pertencentes a classe Mu. Em *F. hepatica* as GSTs compreendem cerca de 4% do total de proteínas solúveis, com uma distribuição tecidual mais ampla do que em outros organismos (HOWELL *et al.*, 1988; WIJFFELS *et al.*, 1992). A fasciolose é uma doença economicamente importante, que acomete ovinos e bovinos, causada pela infecção com *F. hepatica* e *F. gigantica* (BORAY, 1985; FABIYI, 1987 apud ROSSJOHN *et al.*, 1997). No desenvolvimento de uma quimioterapia alternativa para o combate da doença, a GST de *F. hepatica* (FhGST) se tornou um antígeno vacinal candidato, que confere cerca de 57% de proteção para ovelhas e 19% - 69% para gado contra infecções por este parasita (SEXTON *et al.*, 1990; MORRISON *et al.*, 1996).

A FhGST foi escolhida como antígeno candidato a vacina baseada na homologia com GSTs de *Schistosoma mansoni* (Sm28) e de *S. japonicum* (Sj26) que induziram reduções significativas na quantidade de vermes de animais vacinados em laboratório (SMITH *et al.*, 1986; MITCHELL *et al.*, 1988; BROPHY *et al.* 1994; BALLOUL *et al.*, 1987). CAPRON *et al.*, (1992) demonstrou que a vacinação de ratos com Sm28 contra *S. mansoni* reduz mais de 60% da quantidade de vermes, mais de 70% da fecundidade e mais de 80% da viabilidade dos ovos. Porém, o mesmo efeito não foi observado quando foram testados Sj26 ou Sj28 de *S. japonicum* ou Sm26 de *S. mansoni* (MITCHELL *et al.*, 1988; apud GOBERT, 1998; LIU *et al.*, 1995).

MITCHELL *et al.* (1989 apud GOBERT *et al.*, 1998) sugere que GSTs secretadas pelo parasita podem atuar detoxificando o tecido do hospedeiro ao redor do parasita. Desta forma, anticorpos gerados por vacinação podem anular o papel detoxificante das GSTs, tornando o parasita mais susceptível a resposta imune do hospedeiro.

VIBANCO-PEREZ *et al.* (1999) caracterizaram GST de *Taenia solium* (SGSTF) com massa molecular de 26KDa que parece ser da classe Mu. Estudos de imunolocalização indicaram que GSTs estão presentes em tegumento, parênquima e protonefrídios, sugerindo que a GST tem papel importante na sobrevivência do parasita no hospedeiro. Também mostraram que camundongos imunizados com SGSTF reduziram 74,2% dos metacestodos. Os anticorpos gerados contra SGSTF apresentam reatividade cruzada com *T. saginata*, *T. taeniaeformis*, *T. crassiceps*, porém não reage com GSTs de *S. mansoni*, de camundongos, coelhos e fígado de porcos.

Uma GST de 26 KDa da classe Mu do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (O'NEILL *et al.*, 1994), e uma GST da barata *Blattella germanica* (ARRUDA *et al.*, 1997) foram identificadas como sendo alérgenos majoritariamente reconhecido por anticorpos da classe das imunoglobulinas E (IgE) do soro de pacientes alérgicos.

Em nosso laboratório, através da sondagem imunológica de uma biblioteca de cDNA da glândula salivar de partenógina do carrapato *B. microplus* foram isolados três clones. Os clones foram obtidos utilizando, como sonda, soro policlonal de coelho imunizado com extrato total de glândula salivar de partenógina. Os clones denominados SG1, SG2 e SG3, atualmente, estão sendo caracterizados.

9 Objetivos do Trabalho

- 1) Triar uma biblioteca de cDNA de glândula salivar de partenógina do carrapato *Boophilus microplus*, utilizando como sonda o soro policlonal de coelho imunizado com extrato de glândula salivar de partenógina;
- 2) Identificar e analisar a seqüência de ácidos nucléicos do cDNA isolado e de amino ácidos deduzida a partir do sequenciamento;
- 3) Averiguar o potencial antigênico da seqüência de amino ácidos correspondentes a seqüência de ácidos nucléicos isolada;

10 MATERIAIS E MÉTODOS

10.1 Soluções e Tampões

10.1.1 Soluções para Eletroforese

- 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%.
- Tampão de amostra em condições redutoras 1:2 (para SDS-PAGE) - Tris-HCl 0,25 M (pH 6,8), SDS 2%, azul de bromofenol 0,025%, glicerol 5%, β -mercaptoetanol 10% e uréia 5 M.
- Solução de acrilamida 30% e Bisacrilamida 0,8%
- Solução de APS 10%.
- Tampão Tris-Glicina 10X - Tris 0,25 M, glicina 1,92 M e SDS 1%, pH 8,3.
- Tampão de Eletro-Transferência (para Western Blot) - 0,013 M de NaHCO_3 , 20% de metanol.

10.1.2 Soluções para ELISA

Tampão Carbonato/Bicarbonato de Sódio 0,050 M, pH 9,6.

Tampão Citrato/Fosfato 0,1 M, pH 5,0.

Solução cromogênica - 3,4 mg de OPD, 5 μl de H_2O_2 em 10 ml de tampão citrato/fosfato.

PBS - solução de NaCl 0,15 M, NaH_2PO_4 0,01 M, pH 7,2.

Blotto 5% - solução 5% de leite desnatado em PBS.

Solução de H_2SO_4 12,5%

10.1.3 Soluções para cromatografia de afinidade - Glutathione Sepharose

4B

PBS: NaCl 0,140 M, KCl 0,0027 M, Na_2HPO_4 0,010 M, KH_2PO_4 0,0018 M

Tampão de Eluição: 0,010 M de glutatona reduzida em 0,050 M de Tris-HCl pH 8,0

Tampões de Regeneração: Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,5

Acetato de Sódio (CH_3COONa) 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4,5

Tampão de conservação: Etanol 20%

10.1.4 Soluções para ensaio de atividade enzimática

- Tampão para atividade: Tris 0,1 M pH 7,5
- Tampão para diluição: Tris 0,020 M pH 7,5
- Solução de Trabalho: 0,005 M GSH em Tris 0,1 M pH 7,5 + 0,050 M CDNB em metanol.

10.1.5 Solução de Revelação para Fosfatase Alcalina

Tampão de Revelação: 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 0,005 M MgCl_2

Solução de Revelação: 33 μl de NBT (500 mg em 10 ml de dimetilformamida 70% em água); 33 μl de BCIP (500 mg em 10 ml de dimetilformamida 100%) em 5 ml de tampão de revelação.

Solução Bloqueadora: 0,02 M de EDTA

10.1.6 Solução de Eluição de anticorpo purificado por adsorção

Tampão de Eluição: glicina-HCl 0,1 M, pH 2,5

Solução de Neutralização: Na_2HPO_4 0,5 M; NaOH 10 N

10.1.7 Outros tampões

- Tampão SM: 0,01 M NaCl, 0,01 M MgSO_4 , 0,05 M Tris-HCl pH 7,0.
- Tampão SSC 20X: NaCl 3 M e citrato de sódio 0,3 mM, pH 7,0
- Tampão de Extração Protéica com detergente: Tris 0,01 M pH 8,2, 1% de deoxicolato de sódio.
- Solução de Pepstatina: 0,1% de pepstatina em DMSO
- Solução de Leupeptina: 0,1% de leupeptina em DMSO
- Solução de TPCK: 0,0001M DE TPCK em DMSO

10.2 Marcadores de Massa Molecular

- Padrão de massa molecular Broad - BioRad para géis SDS-PAGE.
- DNA de fago Lambda (Cenbiot) digerido com endonuclease de restrição *HindIII*
- Padrão de tamanho de fragmentos de DNA: 100 pares de base - Pharmacia Biotech

10.3 Meios de Cultura

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

- LB líquido - cloreto de sódio 0,5%, extrato de levedura 0,5% e bacto-triptona 1%, pH 7,5.
- LB semi-sólido - LB líquido acrescido com 0,75% bacto-ágar.
- LB sólido - LB líquido acrescido com 1,5% bacto-ágar.

10.4 Antibióticos

TABELA I: Concentrações de antibióticos utilizados

Antibiótico	Concentração de estocagem	Concentração de uso
Ampicilina	50 mg/ml	100 µg/ml
Canamicina	10 mg/ml	50 µg/ml
Tetraciclina	5 mg/ml	12,5 µg/ml

As soluções estoque de ampicilina e canamicina foram preparadas com água destilada autoclavada, enquanto que a solução de tetraciclina foi preparada com etanol absoluto.

10.5 Enzimas

* Enzimas de Restrição – todas as reações envolvendo enzimas de restrição foram conduzidas de acordo com as especificações do fabricante, sempre mantendo a proporção máxima de 10% do volume da enzima nas reações. Todas as enzimas eram estocadas a -20°C.

EcoRI - Pharmacia Biotech

XhoI - Pharmacia Biotech

* Enzimas de Modificação – as reações utilizando as enzimas MMLV-RT (Gibco) e Elongase Mix (Gibco) foram conduzidas de acordo com as especificações do fabricante.

10.6 Material Biológico

10.6.1 Bacteriófago

O bacteriófago Uni-ZAP[®] XR (STRATAGENE) foi utilizado para clonagem.

O bacteriófago "Helper" ExAssist (STRATAGENE) foi utilizado para recuperação do plasmídeo.

10.6.2 Cepas bacterianas de *Escherichia coli*

TABELA II: Cepas Bacterianas Utilizadas

Cepa	Características	Marca
XL1-BLUE MRF'	$\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr}) 173$, endA1 , supE44 , thi-1 , recA1 , gyrA96 , relA1 , lac , [F'proAB, $\text{lacI}^q\Delta\text{M15}$, Tn10(tet^r)]	STRATAGENE
SOLR™	$\text{e14}^-(\text{mcrA})$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})171$, sbcC , recB , recJ , $\text{umuC}::\text{Tn5}(\text{kan}^r)$, uvrC , lac,gyrA96 , relA1 , thi-1 , endA1 , λ^R , [F'proAB, $\text{lacI}^q\Delta\text{M15}$]Su ⁻	STRATAGENE

10.6.3 Plasmídeo

TABELA III: Plasmídeo Utilizado

Vetor	Características	Marca
pBlueScript® SK(-)	Amp^r , lacZ , ColE1 ori , MCS , fl	STRATAGENE

10.6.4 Biblioteca de cDNA

Foi utilizada para o isolamento do SG2 uma biblioteca unidirecional de cDNA construída a partir de RNA poly (A)⁺ de glândulas salivares de partenóginas do carrapato bovino *B. microplus*. Os cDNAs foram clonados no vetor Uni-ZAP® XR (STRATAGENE), nos sítios de restrição *EcoRI* e *XhoI*, conforme protocolo do fabricante.

10.6.5 ANIMAIS

10.6.5.1 Coelhos

Coelhos da raça Nova Zelândia mantidos no biotério do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), foram utilizados na imunização.

10.6.5.2 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.

10.6.5.3 Carrapatos

Carrapatos *Boophilus 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.

10.6.5.3.1 Obtenção de Teleóginas

As teleóginas foram obtidas coletando-as após seu desprendimento dos bovinos estabulados (ciclo parasitário completado) com assoalhos especialmente projetados para este fim. As teleóginas foram assepsiadas com 3 lavagens intercaladas, de 30 segundos cada, com água oxigenada 3% (10 volumes) e etanol 70% em água; 5 lavagens com água destilada estéril.

10.6.5.3.2 Obtenção de Partenóginas

As partenóginas foram obtidas desprendendo-se diretamente e manualmente dos bovinos. A assepsia foi idêntica a das teleóginas (item 10.6.5.3.1)

10.6.5.3.3 Obtenção de Glândula Salivar, Ovário, Corpo Gorduroso e Intestino

Teleóginas foram coletadas e lavadas como indicado no item 10.6.5.3.1.

Para dissecação, as fêmeas foram mantidas em PBS pH 7,2 com 500 U/ml de penicilina. A cutícula foi cortada com bisturi e as glândulas salivares, ovários, corpo gorduroso e intestino foram dissecados com pinças cirúrgicas e lupa. Após dissecação, as glândulas salivares, ovários e corpo gorduroso destinados à extração de antígeno foram lavados com PBS e, os intestinos foram lavados sete vezes com 500 U/ml de penicilina e três vezes em PBS. Os tecidos foram estocados a -20°C.

Para extração de mRNA os tecidos foram dissecados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -70°C até o uso.

10.6.5.3.4 Obtenção de 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 obtenção de extrato de larvas, 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 estocadas a -20°C.

10.6.5.3.5 Obtenção de Proteínas de Carrapato

Foram realizados dois protocolos diferentes para extração de proteínas dos tecidos.

Extração de antígenos com detergente que foi utilizado para os géis SDS-PAGE e Western Blot.

Extração aquosa de proteínas que foi utilizado para os ensaios de atividade enzimática.

10.6.5.3.5.1 Extração com detergente

10.6.5.3.5.1.1 Proteínas de larvas

As larvas estocadas a -20°C foram descongeladas, maceradas em PBS pH 7,2 em banho de gelo e centrifugadas a 600g por 10 minutos. A camada superior foi coletada em PBS, centrifugada a 800 g por 2 minutos. Coletou-se novamente a camada superior em PBS e repetiu-se a centrifugação. O sedimento foi solubilizado com detergente (1% de deoxicolato de sódio em tampão Tris 0,01 M pH 8,2) na presença de inibidores de proteases (leupeptina, pepstatina e TPCK) e centrifugado a 32800 g. O sobrenadante foi fracionado e estocado a -70°C até o uso.

10.6.5.3.5.1.2 Proteínas de glândula salivar, intestino, corpo gorduroso e ovário

Os tecidos dissecados, estocados a -20°C ou frescos, foram macerados em banho de gelo e solubilizados com detergente (1% de deoxicolato de sódio em tampão Tris 0,01 M pH 8,2) na presença de inibidores de proteases (leupeptina, pepstatina e TPCK) e centrifugado a 32800g. O sobrenadante foi fracionado e estocado a -70°C até o uso.

10.6.5.3.5.2 Extração Aquosa

10.6.5.3.5.2.1 Proteínas de glândula salivar e intestino

Os tecidos estocados a -70°C foram descongelados e adicionados com Tris 0,02 M pH 7,5 gelado. Em microtubo os tecidos foram macerados com pistilo e centrifugados em microcentrífuga por 1 minuto 20.000 g. O sobrenadante foi coletado e parte utilizado imediatamente no ensaio de atividade e quantificação protéica pelo método de Bradford. O restante foi novamente estocado -70°C.

10.7 Soros policlonais anti-glândula salivar de partenógina

Soro de coelho imunizado com extrato de glândula salivar de partenógina foi utilizado como sonda, na realização da sondagem imunológica da biblioteca de cDNA (item 10.16.2).

Para obtenção do soro policlonal, os coelhos receberam quatro (4) imunizações de 100 µg de extrato total de glândula salivar de partenógina. Após obtenção do soro, o título de 1:200 foi determinado por Western Blot.

10.7.1 Adsorção do soro policlonal com extrato de *E. coli*

Para adsorção do soro policlonal de coelho (item 10.7) contra extrato de *E. coli*, 10 placas de Petri com 1500 pfu de Uni-ZAP[®] XR selvagem crescidos até cobrirem toda a placa de Petri foram colocadas em contato direto com 10 membranas de nitrocelulose discóides, previamente umedecidas com IPTG 0,01 M, e incubadas a 37°C por 3 horas e meia para cada lado da membrana. Terminado o tempo de incubação, as membranas foram retiradas das placas de Petri e bloqueadas com blotto 5% (item 10.1.2), lavadas com PBS (item 10.1.2) 3 vezes por 5 minutos, sob agitação a temperatura ambiente. Após as lavagens, o soro policlonal do coelho diluído 1:10 em PBS com thimerosol (1:1000) foi incubado com as membranas durante à noite a 4°C, sob agitação. No dia seguinte, o soro em PBS foi recolhido e estocado -20°C até o uso.

10.8 Obtenção de soro policlonal monoespecífico contra SG2

Membranas de nitrocelulose de formato discóide foram umedecidas em IPTG 0,01 M dissolvido em água Milli-Q estéril, e depois deixadas entre folhas de papel-filtro até secarem completamente. As membranas depois de secas, foram colocadas em contato com bactérias XL1-Blue/SG2 crescidas em meio LB sólido. Cada lado das membranas ficou em contato direto com as bactérias por cerca de 3,5 horas. Seguindo o tempo de incubação, as membranas foram bloqueadas com blotto 5% (item 10.1.2) por 1 hora. Em seguida, o soro policlonal adsorvido (item 10.7.1) do coelho imunizado com extrato de glândula salivar de partenógina (item 10.7) ficou incubado durante a noite. Foram realizadas lavagens com blotto 5% e em seguida os anticorpos anti-SG2 foram eluídos das membranas com tampão glicina-HCl (item 10.1.6) e neutralizados com solução de neutralização (item 10.1.6). Para cada membrana foram utilizados 2 ml de tampão.

10.9 Soros policlonais anti-AgSG2

Soros policlonais utilizados neste trabalho foram obtidos de coelho e bovino imunizados com AgSG2 recombinante purificada por cromatografia em coluna de afinidade (Glutathione Sepharose 4B - Pharmacia).

O bovino utilizado nas imunizações já havia sido infestado experimentalmente.

10.9.1 Imunizações

Foram imunizados um coelho e um bovino com 100 µg a 200 µg AgSG2 purificada, havendo intervalo de cerca de 15 dias entre as imunizações.

Na primeira imunização do coelho foi utilizado Adjuvante Completo de Freund. Nas demais imunizações, o adjuvante utilizado foi o Adjuvante Incompleto de Freund. Foram realizadas oito (8) imunizações no coelho.

Nas cinco (5) imunizações do bovino foi utilizado Montanide 888 10% e Marcol S2 90% como adjuvante.

10.10 Obtenção de Ácidos Nucléicos

10.10.1 Purificação de RNA poli-A⁺

O RNA poli-A⁺ foi purificado a partir de tecidos do carrapato *B. microplus* que foram dissecados nos dias de coleta dos carrapatos, e imediatamente estocados a -70°C até o uso, e sangue bovino coletado em frasco com anti-coagulante (citrato). Para a purificação do RNA poli-A⁺ foi utilizado o kit de purificação de RNA poli-A⁺ “Quick Prep Micro mRNA purification Kit” (Pharmacia), seguindo protocolo do fabricante. Após quantificação em espectrofômetro A_{260nm} o RNA purificado foi estocado a -70° até o uso.

Foram purificados RNA poli-A⁺ de glândula salivar e intestino de partenógina e teleógina, ovário e corpo gorduroso de partenógina, larva de *B. microplus* e sangue bovino. O RNA poli-A⁺ foi utilizado nos ensaios de RT-PCR.

10.10.2 Análise Qualitativa e Quantitativa dos Ácidos Nucléicos

A concentração dos ácidos nucleicos foi determinada por espectrometria A_{260nm}. A qualidade dos ácidos nucleicos era determinada por eletroforese em gel de agarose (item 10.11) e pela relação entre as absorbâncias de 260 nm/280 nm.

10.10.3 Síntese de oligonucleotídeos iniciadores

10.10.3.1 Oligonucleotídeos iniciadores para SG2

A partir do sequenciamento de parte do clone cDNA SG2 isolado, foram desenhados três oligonucleotídeos iniciadores para a obtenção do restante da seqüência de nucleotídeos.

A - PR1SG2 - 5' GTCAACCGCTGAACGCAC 3'

B - PR2SG2 - 5' CCACAGTTCCGCAGCCTC 3'

C - PF1SG2 - 5' GCAAGAAGCACGGTCTCG 3'

10.10.3.2 Oligonucleotídeos iniciadores para actina

Oligonucleotídeos iniciadores para actina foram utilizados como controle positivo para as reações de PCR.

BmAct2 - 5' GGGGTGTAGAAGGAAGG 3'

BmAct3 - 5' GCATCCACGAGACCACG 3'

10.11 Eletroforese em gel de Agarose

Foram utilizados géis de agarose 2% feitos em tampão TAE 1X (item 10.1.1) com adição de brometo de etídio a uma concentração de 0,5 µg/ml. As amostras foram aplicadas juntamente com um tampão de amostra (item 10.1.1). Os géis foram submetidos a uma diferença de potencial elétrico em tampão TAE 1X (item 10.1.1). Os ácidos nucléicos foram visualizados pela exposição a luz ultravioleta.

10.12 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os géis de poliacrilamida foram feitos para uma concentração final de acrilamida de 12%. Às amostras adicionava-se um tampão de amostra para condições redutoras (item 10.1.1). Após serem fervidas por 10 minutos, as amostras foram imediatamente colocadas em banho de gelo e aplicadas nos géis. A primeira etapa da migração consistia de um gel de empilhamento a 5% de acrilamida seguido do gel de corrida (LAEMMLI, 1970). O tampão utilizado foi o Tris-Glicina 1X (item 10.1.1). Ao fim da migração o gel era submetido a eletro-transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (item 10.13.1) ou corado com azul de Coomassie, por 10 a 15 minutos, e descorados aquecendo-os por 10 minutos no forno de microondas em potência alta, submersos em água.

10.13 "Western Blot"

10.13.1 Eletro-Transferência de proteínas para nitrocelulose

Após o término da migração das amostras no gel de poliacrilamida o mesmo foi colocado em contato direto com uma membrana de nitrocelulose de mesmo tamanho, sendo ambos envolvidos por papéis-filtro. Tanto os papéis-filtro como a nitrocelulose eram previamente umedecidos em tampão de transferência (item 10.1.1). Este "sanduíche" foi submetido, em tampão de transferência, a uma voltagem de 70V por 1 hora (DUNM, 1986).

10.14 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

O antígeno foi diluído para uma concentração final de 1 ng/μl em tampão carbonato-bicarbonato 0,02 mM, pH 9,6 (item 10.1.2) e distribuído em placas de ELISA em volume de 100μl/ poço e incubados por cerca de 18 horas a 4°C (JOHNSTONE & THORPE, 1982; HARLOW & LANE, 1988). As placas sensibilizadas foram incubadas para bloqueio por 1 hora a 37°C, com 200 μl/poço de blotto 5% (item 10.1.2) (JOHNSON *et al.*, 1984). Após, foram incubadas por 1 hora a 37°C, com 100 μl de soro em diluições crescentes e seriadas em blotto 5%. As placas foram lavadas, a temperatura ambiente por 2 minutos e 30 segundos, três vezes com blotto 5% em volume de 200 μl/poço e incubadas novamente, por 1 h a 37°C, com 100μl/poço de conjugado diluído para uso em blotto 5%. Após as placas foram lavadas com 200μl de PBS (item 10.1.2) por 2 minutos e 30 segundos, três vezes. A reação foi revelada com solução cromogênica (item 10.1.2) por 15 minutos a temperatura ambiente e bloqueada com solução de H₂SO₄ 12,5% (item 10.1.2). A absorvância foi determinada a 492 nm (A_{492nm}) em um espectrofotômetro Titertek Multiskan PLUS[®].

10.15 Plaqueamento do Bacteriófago Uni-ZAP[®] XR e Transferência para membrana de nitrocelulose

10.15.1 Crescimento e Preparação das Bactérias

Uma colônia isolada da cepa de *E. coli* XL1-BLUE (tabela II) foi inoculada em 20 ml de LB líquido (item 10.3) contendo maltose 0,2% e incubada a 37°C com agitação constante até atingirem uma densidade óptica a 600 nm (A_{600nm}) entre 0,7 e 1,0. As bactérias foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 5000 g e ressuspensas em sulfato de magnésio (MgSO₄)

0,01 M, para uma $A_{600nm} = 0,5$ sob condições estéreis. As bactérias foram mantidas a 4°C e utilizadas em até 5 dias.

10.15.2 Plaqueamento dos Bacteriófagos Uni-ZAP[®] XR – Infecção em Meio Líquido

Foram misturados em tubos estéreis 200 µl de bactérias (item 10.15.1) e os bacteriófagos Uni-ZAP[®] XR (STRATAGENE) tanto provenientes da biblioteca como de placas de lise isoladas (item 10.18) e incubados por 15 minutos a 37°C. Para cada tubo foram adicionados 3 ml de LB semi-sólido (item 10.3) (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 10.3) e maltose 0,2% pré-aquecida a 37°C. As placas foram incubadas entre 8 e 12 horas a 37°C. O número de placas de lise por placa de Petri sempre variou entre 300 e 1000, quando utilizadas diretamente da biblioteca amplificada. Utilizando bacteriófagos anteriormente isolados foi utilizada uma concentração menor de placa de lise, uma vez que o objetivo era purificações de placa.

10.15.3 Plaqueamento dos Bacteriófagos Uni-ZAP[®] XR – Infecção em Meio Semi-Sólido

Foram colocados e misturados em tubo estéril 200 µl de bactérias (item 10.15.1) e 3 ml de LB semi-sólido (item 10.3) (mantido entre 42°C e 50°C), os quais eram vertidos em placa de Petri contendo LB sólido (item 10.3) com maltose 0,2% pré-aquecidas a 37°C. Após a solidificação do meio semi-sólido (contendo as bactérias) eram aplicados, com palitos estéreis e em posições definidas, bacteriófagos estocados em tampão SM (item 10.1.7) previamente isolados (item 10.18) ou provenientes de outras placas de Petri. As placas eram por fim incubadas por 8 a 12 horas a 37°C.

10.16 Sondagem Imunológica da Biblioteca de cDNA

10.16.1 Transferência para Membrana de Nitrocelulose

As placas de Petri contendo as placas de lise de interesse foram, imediatamente, após o término da incubação a 37°C (itens 10.15.2 e 10.15.3), 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 horas a 37°C.

10.16.2 Sondagem com soro policlonal

As membranas de nitrocelulose retiradas das placas de Petri foram bloqueadas com blotto 5% (item 10.1.2) por pelo menos 1 hora. Terminado o tempo de bloqueio, as membranas foram sondadas com soro policlonal contra glândula salivar de partenógina (item 10.7) adsorvido (item 10.7.1) durante à noite. As membranas foram lavadas 3 vezes com blotto 5% por 10 minutos cada lavagem. Em seguida as membranas foram incubadas com IgG de cabra contra IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas por 3 vezes com PBS (item 10.1.2), depois 1 vez com tampão de revelação (item 10.1.5), e em seguida submetidas a revelação (item 10.1.5).

10.17 Transformação Bacteriana com DNA Plasmidial

10.17.1 Preparação de Células Competentes

10.17.1.1 *E. coli* cepa XL1-Blue

Uma colônia isolada de XL1-Blue foi inoculada em 50 ml de LB líquido (item 10.3) e incubada durante a noite a 37°C com agitação constante. A partir desta cultura foi inoculada uma alíquota de 1:100 em LB líquido e incubada a 37°C com agitação constante até atingir uma densidade óptica a 600 nm (A_{600nm}) entre 0,4 e 0,5 (aproximadamente 2,5 a 3 horas de crescimento). A cultura foi centrifugada 4000 g a 4°C (a partir deste momento todos os procedimentos foram realizados a 4°C) e o sedimento bacteriano ressuspenso em ½ volume inicial com cloreto de cálcio 0,1 M gelado. A solução foi novamente centrifugada e o sedimento ressuspenso em 1/20 do volume inicial em cloreto de cálcio 0,1 M gelado. As células então estavam prontas para serem utilizadas, podendo também serem estocadas por 24 horas a 4°C.

10.17.2 Transformação com Choque Térmico

Foram adicionadas 200µl de células competentes (item 10.17.1.1) em um tubo de microcentrífuga estéril (previamente resfriado a 4°C), a seguir o DNA de interesse em volume sempre inferior a 10 µl e em quantidade nunca superior a 50 ng. O tubo foi então deixado a

4°C por pelo menos 45 minutos e em seguida submetido a um choque térmico por 2 minutos a 42°C. Foram adicionados 200 µl de LB líquido (item 10.3) e o tubo foi então incubado por pelo menos 1 hora a 37°C. Diferentes quantidades da solução foram plaqueadas em placas de Petri contendo LB sólido (item 10.3) e ampicilina (item 10.4), as quais foram incubadas durante a noite a 37°C.

10.17.2.1 *E. coli* cepa SOLR

Células de uma colônia isolada de SOLR (item 10.6.2) foram inoculadas em meio LB (2,5 ml) (item 10.3) contendo 0,2% de maltose e 0,01 M de MgSO₄ e incubadas a 37°C, sob agitação, até atingir uma A_{600nm} = 0,5-1,0. A cultura foi centrifugada a 1000g e o sedimento ressuspensão em MgSO₄ 0,01 M para uma A_{600nm} = 1,0

10.18 *Estocagem dos Bacteriófagos Uni-ZAP[®] XR a partir de placa de lise*

As placas de lise foram pipetadas com pipetas Pasteur estéreis e transferidas para um tubo de microcentrífuga com 500 µl de SM (item 10.1.7) estéril e 20 µl de clorofórmio. A seguir o tubo de microcentrífuga foi agitado vigorosamente por alguns segundos e incubado por 2 horas à temperatura ambiente ou a 4°C durante a noite. Os bacteriófagos permanecem estáveis por pelo menos 1 ano a 4°C.

10.19 *Extração dos Vetores pBlueScript SK(-)[®] Recombinante a partir dos estoques dos bacteriófagos Uni-ZAP[®] XR*

Foram incubados 200 µl de uma cultura de XL1-Blue com A_{600nm}=1,0, 250 µl de um estoque de bacteriófagos Uni-ZAP[®] XR (item 10.18) contendo 1x10⁵ partículas e 1 µl do bacteriófago Helper “ExAssist” (STRATAGENE) à 1 x 10⁶ pfu/µl por 15 minutos a 37°C em um tubo de ensaio estéril. A seguir foram adicionados 3 ml de LB líquido (item 10.3), sendo os tubos colocados sob agitação constante por 2,5 a 5 horas a 37°C. O tubo foi então aquecido a 70°C por 20 minutos, sendo a solução transferida para tubos de microcentrífuga estéreis e centrifugada por 15 minutos a 1000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga estéril e estocado a 4°C. O vetor pBlueScript[®] SK(-) (item 10.6.3), sob forma de bacteriófago filamentosos (ácido nucléico DNA fita-simples) pode ser estocado por pelo menos 2 meses. Para plaquear os fasmídeos, foi adicionado 200 µl de uma cultura da cepa SOL-R com uma A_{600nm}=1,0 em dois microtubos. Aos dois microtubos foi adicionado um

volume de 100 μ l e 10 μ l do sobrenadante de fago, respectivamente. Os tubos foram incubados por 15 minutos a 37°C. Em LB sólido (item 10.3) contendo ampicilina (item 10.4), 200 μ l de cada microtubo foi plaqueado e incubado a 37°C durante a noite. Todas as colônias de SOL-R (item 10.6.2) que cresciam apresentavam o vetor pBlueScript SK(-)[®] recombinante na forma plasmidial.

10.20 RT-PCR

As reações de transcriptase reversa (RT) foram feitas seguindo o protocolo abaixo:

500 ng de RNA poli-A⁺ purificado

100 ng de oligodT

H₂O Milli-Q q. s. p 12 μ l

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

4 μ l de tampão First Strand 5X (Gibco)

2 μ l DTT 0,1 M

1 μ l dNTPs 0,01 M

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

10.21 PCR (“Polimerase Chain Reaction”)

Para as reações de PCR foram utilizados:

AMOSTRAS

1 μ l da reação de RT (item 10.20) ou 500 ng de DNA de SG2.

20 pmoles de cada oligonucleotídeos iniciadores (PR1SG2 e PF1SG2)

5 μ l de Tampão A 5X

5 μ l de Tampão B 5X

1 μ l dNTPs 0,01 M

1 μ l da enzima Elongase Mix (Gibco)

H₂O Milli-Q q. s. p 50 μ l

CONTROLE COM ACTINA

1 μ l da reação de RT (item 10.20)

10 pmoles de cada oligonucleotídeos iniciadores de actina

- 5 µl de tampão A 5X
- 5 µl de tampão B 5X
- 1 µl dNTPs 0,01 M
- 1 µl da enzima Elongase Mix (Gibco)

Depois das reações prontas, estas foram colocadas em um termociclador Techne (Progene) que foi programado:

- 1 ciclo de 10 minutos a 94°C;
- 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C, 3 minutos a 72°C.
- 1 ciclo de 10 minutos a 72°C

O gene de actina de *B. microplus* (obtido em nosso laboratório) foi utilizado como um dos controles das reações de RT-PCR. O DNA de SG2 foi utilizado como controle do PCR.

Os produtos de RT-PCR foram analisados em gel de agarose 2% com brometo de etídio (item 10.11).

10.22 Ensaio da Atividade Enzimática

Atividade enzimática de GST foi medida segundo Habig *et al.* (1974). O teste de atividade enzimática foi realizado medindo-se conjugação enzimática da glutathiona (GSH) com substrato cromogênico CDNB catalisada pela GST. A reação consiste em incubar 0,05 M do substrato em metanol, 0,005 M de glutathiona (GSH) em tampão Tris (item 10.1.4). A atividade é determinada pela $A_{340\text{nm}}$, a 25°C, em microplaca de 96 poços usando espectrofotômetro SpectraMAX 250 Molecular Devices. Foi utilizada GST de *S. japonicum* (SjGST) para controle positivo das reações e como controle negativo foi incubado apenas tampão de reação com o substrato cromogênico.

10.23 Purificação de proteína codificada por SG2 (AgSG2)

Os sedimentos bacterianos foram descongelados e passados em uma prensa hidráulica ("French pressure") para romper as células bacterianas (XL1-Blue/SG2). Após o rompimento celular, ao volume de bactéria foi adicionado 1% de Triton X-100 e incubada por 30 minutos sob agitação. Terminado o tempo de incubação, centrifugou-se a 4000 g por 20 minutos.

O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45µm antes de ser aplicado na coluna de cromatografia por afinidade. A amostra foi aplicada em coluna de cromatografia com 1,5 ml de resina "Glutathione Sepharose 4B" (Pharmacia) e seguiu-se o protocolo do fabricante. A

proteína purificada foi eluída com 10 ml de tampão de eluição (item 10.1.3). A quantificação protéica foi determinada por espectrofotometria $A_{280\text{nm}}$.

10.24 Teste de hipersensibilidade

Foi realizado teste de hipersensibilidade imediata e tardia no bovino imunizado.

No bovino, foi inoculado, por via subcutânea, 5 μg de AgSG2 purificada num volume final de 50 μl , e igual volume de PBS (controle). O diâmetro do edema formado foi medido com um paquímetro.

10.25 Dosagem de Proteína

Para determinar concentração de proteínas extraídas, foi utilizado o Método de Bradford (BRADFORD, 1976) usando Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão.

11 RESULTADOS

11.1 *Sondagem Imunológica da Biblioteca de cDNA*

A partir da biblioteca de cDNA de glândula salivar de partenógena do carrapato *B. microplus* (item 10.6.4), um clone, denominado SG2, foi isolado dentre aproximadamente 8×10^3 pfu de fagos recombinantes, e parcialmente caracterizado.

11.2 *Excisão dos fasmídeos do Uni-ZAP® XR*

Os fasmídeos do clone SG2 obtido (item 10.16.2) foram extraídos do vetor conforme descrito no item 10.19. O DNA do clone extraído foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e *XhoI* para análise do fragmento inserido. O DNA digerido foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 2%.

11.3 *Sequenciamento de nucleotídeos de SG2*

O clone SG2 contendo o inserto de 864 pb foi seqüenciado. O inserto foi primeiramente seqüenciado parcialmente pelas extremidades utilizando os oligonucleotídeos iniciadores universais M13F, T7 e T3 com seqüências complementares flanqueando o sítio de inserção no vetor de clonagem utilizado. Para o seqüenciamento total do clone foram sintetizados três (3) oligonucleotídeos iniciadores internos (PF1SG2, PR1SG2 e PR2SG2) (item 10.10.3.1) baseados na seqüência obtida no primeiro seqüenciamento parcial.

11.4 *Análise de seqüência de nucleotídeos e amino ácidos de AgSG2*

Os 864 nucleotídeos do inserto do clone SG2 foram seqüenciados em ambas as direções. Na figura 3 estão a seqüência de nucleotídeos de SG2 e a seqüência de amino ácidos correspondentes. A fase de leitura aberta da seqüência e seus amino ácidos foram obtidos com auxílio do programa TRANSLATE/SWISS-PROT. A fase de leitura aberta, em teoria, codifica para uma proteína de 220 amino ácidos com massa molecular estimada de 25575 (proteína nativa não glicosada) e pI de 8,61. Na extremidade 5' da seqüência foi encontrado um códon ATG, o provável sítio de início da tradução. Na extremidade 3' não codificante foi observada a presença de uma seqüência consenso de nucleotídeos para o sítio de poliadenilação, AATAAA, e provável seqüência de parada de tradução ("stop codon"), TAA, sobrepostas em três (3) nucleotídeos (fig. 3).

Através do programa SWISS PROT/ScanProsite (HOFMANN *et al.*, 1999) foi possível identificar um provável sítio de glicosilação (Asn¹²¹) (figura 3) e obter a determinação da hidropatia da proteína (figura 4) onde foi observada a predominância de resíduos hidrofílicos ao longo de toda a seqüência. Não foi observado presença de resíduos de cisteína ao longo da seqüência deduzida.

Na figura 5 está demonstrado o alinhamento da seqüência de amino ácidos da proteína de *B. microplus*, denominada AgSG2, com quatro (4) seqüências do banco de dados GenBank (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/blastEMBLnet-CH.pl> - GenEMBL), sendo duas (2) que apresentaram maior similaridade com a seqüência estudada quando comparadas pelo programa BLAST e duas (2) que são antígenos candidatos as vacinas contra *Schistosoma japonicum* (SMITH *et al.*, 1986) e *Fasciola hepatica* (PANACCIO *et al.*, 1992). Foi verificado que estas proteínas pertencem a família de enzimas glutathione S-transferase (GST). A proteína AgSG2 apresenta uma maior similaridade com GSTs da classe Mu de mamíferos. O alinhamento múltiplo foi realizado pelo programa "ClustalW Multiple Sequence Alignment" versão 1.8 e submetido ao programa BOXSHADE (14/05/1999) para identificação de resíduos conservados, similares e idênticos. O resultado da análise das seqüências evidenciou a conservação de vários resíduos de amino ácidos ao longo de toda a seqüência (figura 5). Na extremidade N-terminal, um motivo altamente conservado, está presente na região do domínio I de todas as seqüências analisadas. Este motivo compreendido pelos resíduos 60 e 68 da AgSG2 parece ser a região do sítio de ligação com a GSH.

Também foi possível localizar outro motivo consenso SLAILRYL centrado no resíduo 78 da seqüência de AgSG2 (figura 5).

ggcacgagctgatatcgcataccggcgatcctctacatgctctgagagccacggttctgca
 gaaaccgcctgcgacaacacgagagaatcgttgaagagtgcgcatatagagccaagcata
M A P T P V V G Y T T A R G L A Q
 aactccggcatggcacctactccggtcggttggtacaccactgccagaggcctggcccag
 1 20 40
S I R N L L V Y K G V H F E D K R Y E F
 agcatccgcaacctgctggtgtacaagggcggtgcacttcgaggacaagcgctacgagttc
 60 80 100
G P A P T Y E K L G W A A D S A S L G F
 ggaccggcgcccacgtacgagaagctcggttggccgcccagtgccctcgtgggcttc
 120 140 160
T F P N L P Y Y I D G D V R L T Q S L A
 acgttccccaacctgccgtactacatcgatggcgacgtacggctcacgcagtccttagcc
 180 200 220
I L R Y L G K K H G L D A R S D Q E A A
 attctccggtacctgggcaagaagcacggctctcgacgccaggagtgaccaggaggctgcg
 240 260 280
 →→PF1 SG2→→→→ ←←←←←←
E L W L M E Q Q A N D L L W A L V V T A
 gaactgtggctcatggagcagcaggccaacgacctgctctgggctctcgtcgtgaccgcc
 300 320 340
 PR2 SG2 ↓
M N P N A T E A R K S Q E K R L A D S L
 atgaaccggaacgcgaccgaggcccgcaagagccaggagaagaggctggctgactcgctg
 360 380 400
P R W Q E L L K K R R W A L G N T L T Y
 ccccgctggcaggagctgctgaagaagcgccgctgggcccctcggcaacacgctcacctac
 420 440 460
V D F L L Y E A L D W N R Q F A P D A F
 gttgacttctgctctacgaggcgctcgactggaaccgcccagttcgcgcccggacgcgcttc
 480 500 520



Figura 3: **Seqüência de nucleotídeos de SG2 e seqüência de amino ácidos correspondentes.** A seqüência de nucleotídeos tem o ATG correspondente ao provável códon de início de tradução, que está em itálico sublinhado, assim como o provável sítio de poliadenilação no final da mesma. Os asteriscos indicam os códons de término de tradução. A seta indica o provável sítio de glicosilação. A seqüência de amino ácidos que codifica para a proteína de *B. microplus* está em negrito. Os oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para sequenciamento completo do gene estão indicados em vermelho (PF1SG2), verde (PR2SG2) e azul (PR1SG2). A setas indicam o sentido em que os oligonucleotídeos iniciam o sequenciamento.

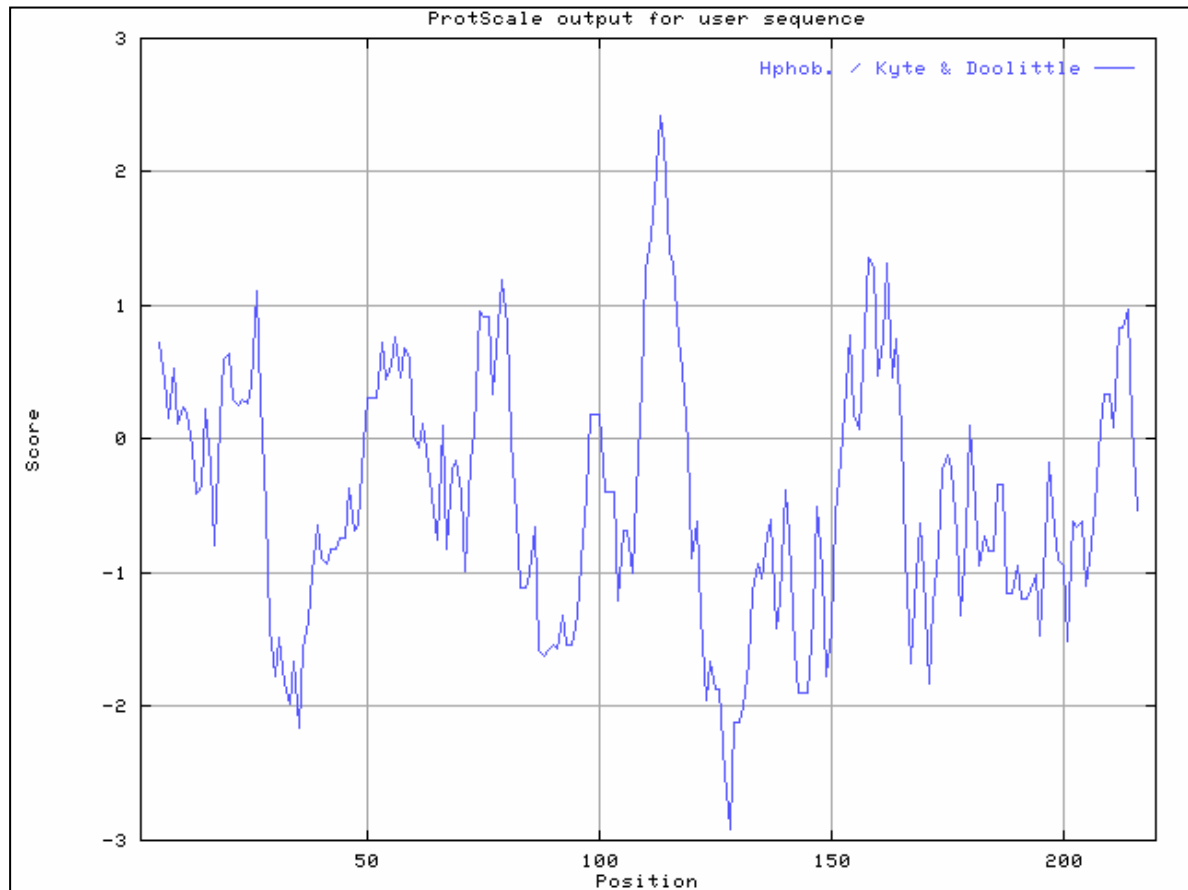


Figura 4: **Gráfico da hidropatia de AgSG2.** No eixo das abcissas estão indicados os números dos resíduos de amino ácidos e no eixo das ordenadas a hidropatia de cada um (KYTE & DOOLITTLE, 1982). Os valores positivos são hidrofóbicos e os negativos hidrofílicos.

AgSG2	1	MAPTPVVGYYTTARGLAQSIRNLLVYKGVHFEDKRYEFGPAPTYEKLGWAAADSASLGFTFPNLPYYIDGDVRLTQSLAILRRLGKKHGLDA	
BmGSTM	1	~~MAPVVGYYWDIRGLAQPIRLLLAHVDAKVDDKRYTCGPPDFDRSSLNEKTKLGLFEPNLPYYIDGDVKLTQSMAILRRLARKHGLEG	
DpGSTM	1	~MSQPILGYWDIRGYAQPIRLLLTYSGVDFVDKRYQIGPAPDFDRSEWLNEKFNGLDFPNLPYYIDGDMKMTQTFAILRRLGRKYKLNQ	
FhGSTA	1	~~~PAKLGYYWKIRGLQQPVRLFLEYLGEYYEHLGRN.....DREKWLGDKFNMGDLNLPNLPYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGMLG	
SjGSTA	1	~~MSPIILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERD.....EGDKWRNKKFELGLFEPNLPYYIDGDVKLTQSMAIRYIADKHMLG	
AgSG2	91	RSDQEAELWLMQQANDLLWALVVTAMNPNATEARKSQEKRLADSLPRWQELKKRRWALGNTLTYVDFLLYEALDWNRQFAPDAFANR	
BmGSTM	89	KTEAEKQRVDVSEQQFADFRMNWVRLCYNPDFEKLGKDYLNLPASLKAFSYDLGTHKFFAGDNLTYVDFIAYEMLAQHILFAPDCLKDF	
DpGSTM	90	SNDHEIRISMAEQQTEDMMAAMIRVCYDANCDKLPDYLKSLPDCLKLMSKVFGEHAFIAGANISYVDFNLYEYLCHVKVMVPEVFGQF	
FhGSTA	83	STPEERARISMIEGAAMDRLRIGFGLTCYNPKFEELKGDYLGKLPDCLKLMSKVFGEHAFIAGANISYVDFNLYEYLCHVKVMVPEVFGQF	
SjGSTA	84	GCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRVAYSKDFETLKVDFLSKLPKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDMFLYDAL.VVLYMDPMCLDAF	
			Identity (%)
AgSG2	181	PELLDYLRRFQELPNLKEYFASD..KYVKWPIMAPYMFVGHK~~~~~	
BmGSTM	179	ANLKAQVDRIEALPHVAAYLKSD..KCIKWPLNGDMASFGSRLQKKP	41
DpGSTM	180	ENLKRYVERMESLPRVSDYIKKQQPKTFNAPTSKWNASYA~~~~~	40
FhGSTA	173	PKLKEFKSRIEDLPKIKEYMKSE..RFIKWPLHSWTSPFGGGDAPPA	36
SjGSTA	173	PKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSS..KYIAWPLQGWQATFGGGDHPPK	32

Figura 5: Alinhamento da seqüência de amino ácidos correspondente a AgSG2 com seqüências de amino ácidos de GSTs de diferentes organismos. A seqüência de amino ácidos deduzida de AgSG2 de *B. microplus* foi alinhada com GST da classe Mu de larva de *B. microplus* (BmGSTM) (AAD15991); de *Dermatophagoides pteronyssinus* (DpGSTM) (P46419); de *Fasciola hepatica* (FhGSTA) (P31671); GSTs da classe Alpha de *Schistosoma japonicum* (SjGSTA) (P05815);. As seqüências alinhadas foram submetidas ao programa ClustalW versão 1.8 para identificação de resíduos conservados (rosa), idênticos (vermelho), similares (azul), e os diferentes (preto).

11.5 RT-PCR de tecidos de *B. microplus*

Para as reações de RT-PCR realizadas neste trabalho, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores PF1SG2 e PR1SG2 (item 10.10.3.1) que amplificam um fragmento de DNA de aproximadamente 435 pb.

Com o objetivo de localizar a ocorrência de transcrição para BmGST nos tecidos do carrapato *B. microplus*, foi feito RT-PCR, que demonstrou haver transcritos em intestino de partenógina e teleógina e em glândula salivar de partenógina (Figura 6). Não foi constatada presença de transcritos de BmGST em corpo gorduroso, ovário, larva de *B. microplus* e sangue bovino. O par de oligonucleotídeos iniciadores BmAct2 e BmAct3 (item 10.10.3.2) amplificaram um fragmento de actina de 337pb (controle positivo) em todos os tecidos testados, exceto em sangue bovino.

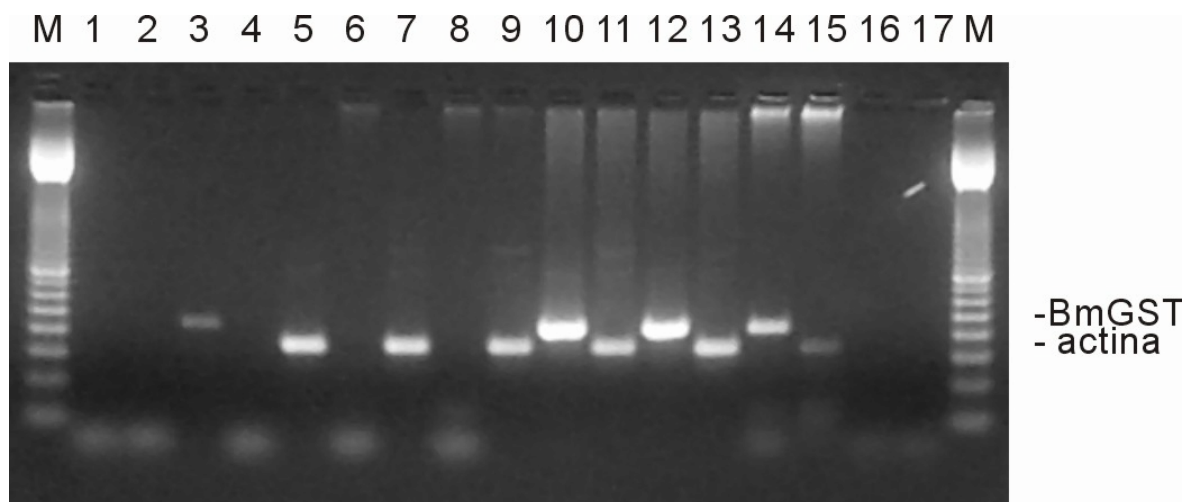


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de amplificação por RT-PCR dos tecidos do carrapato *B. microplus*. Estão indicados com M os marcadores de 100pb Ladder (Pharmacia Biotech). 1- Controle negativo da reação de transcriptase reversa (RT); 2- Controle negativo da reação de PCR; 3- Clone SG2; 4 e 5- RT-PCR de larva; 6 e 7- RT-PCR de ovário; 8 e 9- RT-PCR de corpo gorduroso; 10 e 11- RT-PCR de glândula salivar de partenógina; 12 e 13- RT-PCR de intestino de partenógina; 14 e 15- RT-PCR de intestino de teleógina; 16 e 17- RT-PCR de sangue bovino. Os oligonucleotídeos iniciadores para SG2 foram utilizados nas canaletes 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16. Os oligonucleotídeos iniciadores para actina utilizados como controle estão nas canaletes 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17.

11.6 "Western Blot" de extratos de tecidos de *B. microplus*

No ensaio de Western Blot, foi verificado a presença da BmGST em diferentes tecidos do carrapato, quando sondado com o soro policlonal produzido em coelho. Este reconheceu bandas, de aproximadamente 26900, correspondentes a BmGST nos extratos protéicos de glândula salivar de partenógina e teleógina e, mais fracamente, em intestino de teleógina. Não foi observada bandas nos extratos de corpo gorduroso, larva, hemolinfa (Figura 7) e saliva de partenógina (dado não mostrado). O soro pré-imune do coelho não reagiu com nenhum dos extratos testados em Western Blot (dado não mostrado).

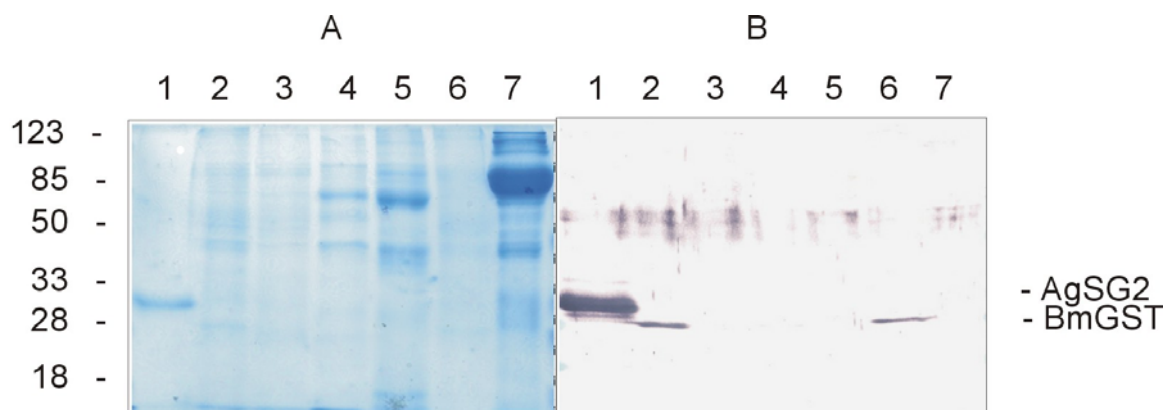


Figura 7: "Western Blot" de extrato protéico de tecidos de *B. microplus* e AgSG2 purificada com soro de coelho. A eletroforese foi realizada em gel SDS-PAGE 12%. Os soros foram utilizados em uma diluição 1:500. (A) SDS-PAGE corado com Coomassie Blue; (B) soro de coelho imunizado. 1- AgSG2 purificada (4µg); 2- glândula salivar de partenógina-GSPa- (30µg); 3- corpo gorduroso de partenógina-CGPa- (30µg); 4- intestino de teleógina - ITe- (30µg); 5- larva -L- (30µg); 6- glândula salivar de teleógina -GSTe- (30µg); 7- hemolinfa de teleógina - HTe-(30µg);

11.7 Purificação de AgSG2

A proteína AgSG2 foi purificada por cromatografia de afinidade Glutathione Sepharose 4B (item 10.23). Na figura 8 observamos que a proteína purificada, AgSG2 (canaleta 2) apresenta duas bandas majoritárias de massas moleculares de cerca de 30700 e 28400, ambas com massa molecular pouco maior do que a massa predita (25575) para a seqüência de amino ácidos deduzida no sequenciamento dos nucleotídeos, e do que a proteína nativa (BmGST) (figuras 7 e 8).

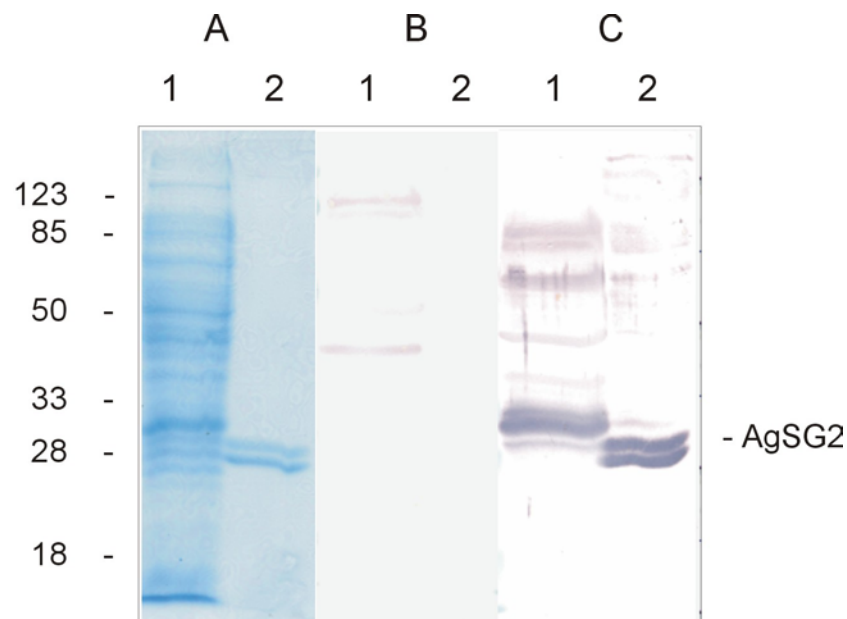


Figura 8: **SDS-PAGE 12% com amostras da purificação de AgSG2 por cromatografia de afinidade com Glutathione Sepharose 4B.** A- SDS-PAGE corado com Coomassie G-250. B- Western Blot sondado com soro pré-imune do coelho. C- Western Blot das amostras da purificação sondada com soro de coelho anti-AgSG2 (1:500). 1- extrato de XL1-Blue/SG2 (120µg); 2- AgSG2 (4µg).

11.8 Titulação de anticorpos contra AgSG2 por ELISA

O título de anticorpos produzidos pelo coelho e bovino imunizados com AgSG2, determinado por ELISA, foi de 2000 para o soro de coelho e 500 para bovino.

11.9 Western Blot com soro de bovino imunizado

No Western Blot realizado utilizando soro de bovino anti-GST como sonda, foi observado que as duas bandas majoritárias da proteína AgSG2 purificada foram reconhecidas pelo anticorpo anti-GST. Outra banda, de aproximadamente 26900, correspondente a BmGST é reconhecida no extrato proteico de glândula salivar de partenógina (figura 9).

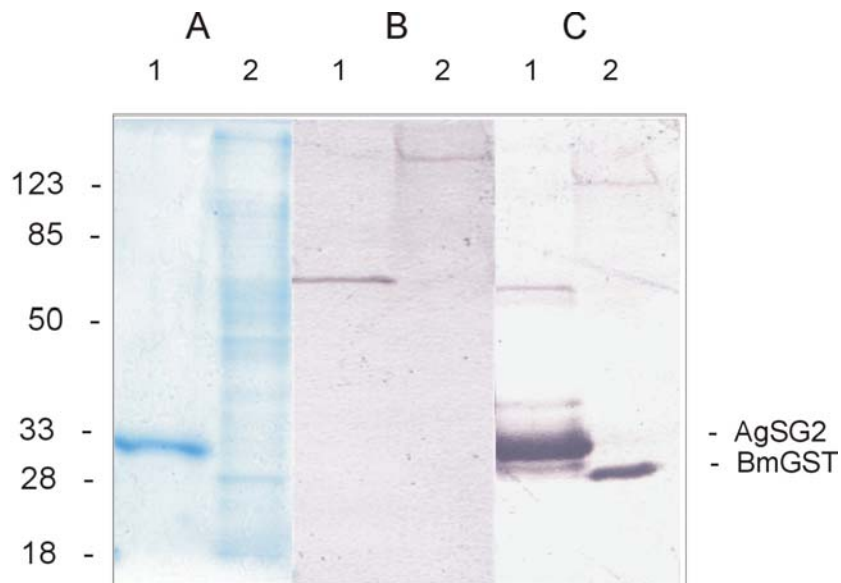


Figura 9: "Western Blot" de extrato proteico de glândula salivar de partenógina de *B. microplus* e AgSG2 purificada sondado com soro de bovino anti-AgSG2. A eletroforese foi realizada em gel SDS-PAGE 12%. Os soros foram utilizados em uma diluição 1:200. (A) SDS-PAGE corado com Coomassie Blue G-250; (B) soro de bovino pré-imune; (C) soro de bovino imunizado. 1- AgSG2 purificada (4µg); 2- glândula salivar de partenógina-GSPa- (30µg);

11.10 *Hipersensibilidades Imediata e Tardia no Bovino*

O bovino imunizado com AgSG2 purificada apresentou uma resposta cutânea característica de hipersensibilidade imediata (TABELA IV). O edema observado, após 15 minutos, no bovino, inoculado com PBS, corresponde ao volume de tampão que foi injetado, não sendo mais possível observá-lo decorridos 30 minutos do inóculo.

TABELA IV: Reações de hipersensibilidades do bovino imunizado com AgSG2 purificada.

Inóculo	15 minutos	30 minutos	24 horas	72 horas
5µg de AgSG2 purificada	Positivo 2,1 cm	Positivo 2,8 cm	Negativo	Negativo
PBS	Negativo 0,4 cm	Negativo	Negativo	Negativo

11.11 Ensaio de Atividade

Frações eluídas da coluna de cromatografia de afinidade contendo AgSG2 purificada, extratos de tecidos (figura 10), bem como secreções e excreções de fêmeas adultas de *B. microplus* (dados não mostrados) foram ensaiadas contra substrato cromogênico CDNB (item 10.1.4 e 10.22).

Com o objetivo de verificar a presença de GSTs ativas, foram testados extratos aquosos de intestino, glândula salivar e saliva de teleóquina e partenóquina e hemolinfa de teleóquina. Uma GST da classe alpha de *Schistosoma japonicum* (SjGST) foi utilizada como controle positivo do ensaio (dado não mostrado).

Mediante ensaio de atividade enzimática podemos observar que GSTs estão presentes, na forma ativa, em intestino e glândula salivar de teleóquina e partenóquina. Já em hemolinfa e saliva não foi observada atividade enzimática nas condições testadas.

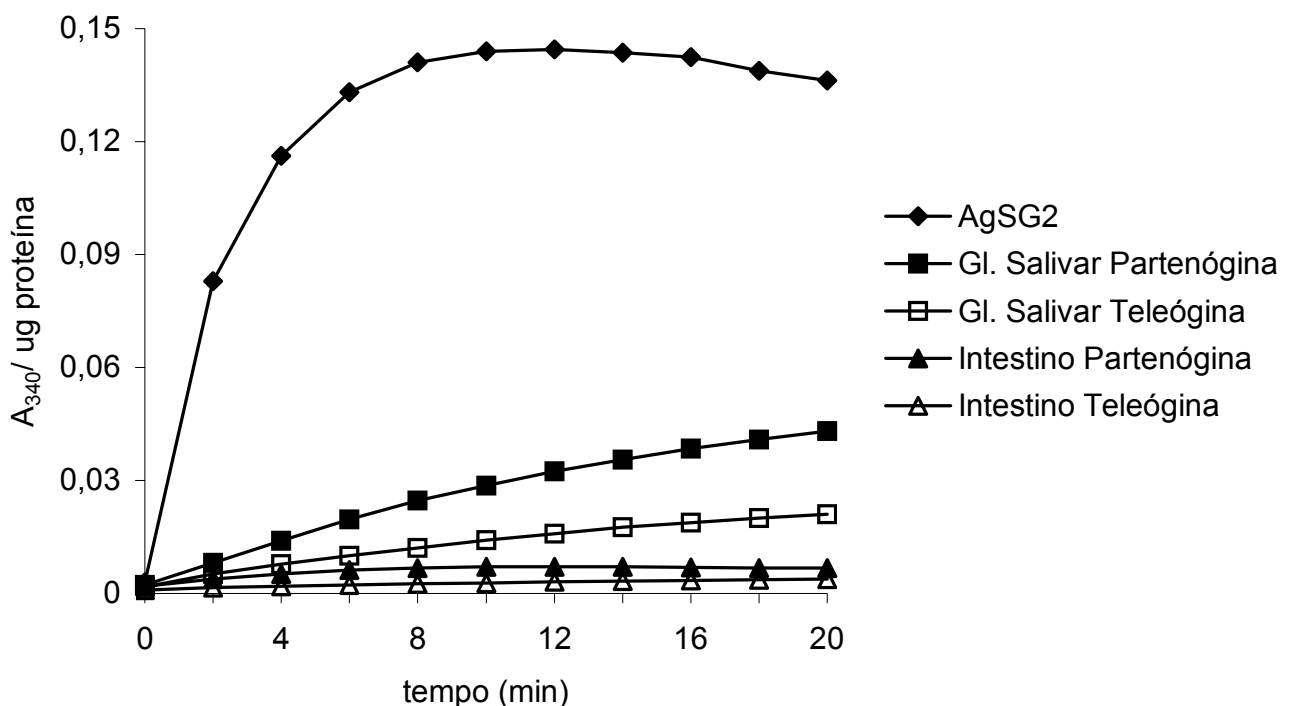


Figura 10: Gráfico do ensaio cromogênico de atividade enzimática para GSTs contra substrato cromogênico CDNB.

12 DISCUSSÃO

A sondagem imunológica é uma metodologia utilizada com sucesso na identificação de genes de parasitas animais (LIGHTOWLERS, 1994) e no isolamento de cDNAs correspondentes a genes de interesse.

No presente trabalho, através da sondagem imunológica com soro policlonal de coelho imunizado com extrato total de glândula salivar de partenógina, foi isolado um clone de cDNA (SG2) que codifica uma proteína similar a enzima glutationa S-transferase (GST) a partir de uma biblioteca unidirecional de cDNA, preparada a partir de RNA poli-A⁺ de glândula salivar de partenógina do carrapato *B. microplus*.

O clone SG2 contendo um inserto de 864 pb foi sequenciado em ambas as direções e analisado com auxílio de vários programas de análise de seqüência, onde foi possível determinar que o SG2 codifica uma proteína similar a GST. O códon ATG, que foi encontrado na extremidade 5' da seqüência é o provável sítio de iniciação da tradução por diversos motivos. Primeiramente, a seqüência de nucleotídeos ao redor deste ATG corresponde as regras de KOZAK (1991) que enfatiza a importância de uma purina (usualmente A) na posição -3, antes do ATG, para iniciar a tradução. Purina nesta posição é conservada em vários mRNAs de eucariotos. Além disto, KOZAK (1991) verificou a predominância de C nas posições -1, -2, -4 e -5 e cita que em 95% dos mRNAs analisados por ele, a tradução se inicia no primeiro AUG 5' proximal.

Segundo PROUDFOOT & BROWNLEE (1976), a seqüência AAUAAA, presente na extremidade 3' do mRNA (599-664 (fig. 3)) é uma seqüência consenso para poliadenilação que está presente em mRNAs de diferentes espécies. No entanto, na seqüência do clone SG2 a seqüência consenso de término da tradução (UAA) (fig. 3) se sobrepõe a seqüência de poliadenilação. FENG *et al.* (1999) publicou a seqüência deduzida de uma GST de *Choristoneura fumiferana* na qual também mostrou a sobreposição das seqüências consenso para poliadenilação e término da tradução. A ausência de resíduos de cisteína também foi relatado por FENG *et al.* (1999) indicando que resíduos de cisteína não são essenciais para atividade catalítica das GSTs da classe Mu (WIDERSTEN *et al.*, 1991).

A seqüência de resíduos de amino ácidos deduzida, indicou que o gene clonado (SG2) codifica uma proteína de 220 amino ácidos com massa molecular estimada de 25575 Da, pI de 8,61, similar a enzima glutationa S-transferase (GST) pertencente a classe Mu (BLAST 2 versão BLASTP2.0 5) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

A análise de hidropatia da proteína (figura 4) obtida através do programa SWISS PROT/ScanProsite (HOFMANN *et al.*, 1999) confirma a hipótese de que AgSG2 se trata de uma proteína citosólica devido a predominância de resíduos hidrofílicos.

Pela análise da seqüência de amino ácidos do sítio de ligação a GSH (sítio G) da proteína AgSG2 foi observado que os resíduos catalíticos conservados em todas as GSTs (entre resíduos 60 e 67), estão presentes em SG2. O motivo consenso SLAILRYL que contribui para ligação do sítio G com GSH e participa da interface entre os domínios I e II (WILCE & PARKER, 1994), está centrado no resíduo 78 da seqüência de amino ácidos de AgSG2 (figura 5).

Outros 6 resíduos, Tyr-9, Pro-63, Asp-67, Ile-78, Gly-152 e Asp-159, conservados em todas as seqüências de GSTs conhecidas (WILCE & PARKER, 1994) estão presentes na seqüência AgSG2 (figura 5).

Pela análise da seqüência de amino ácidos através do programa BLAST 2 versão BLASTP 2.0.5 (ALTSCHUL *et al.*, 1997), a proteína AgSG2 apresenta uma identidade de seqüência de 41%, 40%, 36% e 32% com GSTs isoladas a partir de larva de *B. microplus* (AAD15991) (HE *et al.*, 1999), do ácaro *Dermatophagoides pteronissinus* (P46419) (O'NEIL *et al.*, 1994), *Fasciola hepatica* (P31671) (PANACCIO *et al.*, 1992) e *Schistosoma japonicum* (P08515) (SMITH *et al.*, 1986), respectivamente. Segundo FAVALORO *et al.* (1997) a identidade de seqüência inter-classes é, geralmente, menor que 30%.

A proteína recombinante AgSG2 expressada em XL1-Blue foi purificada por cromatografia de afinidade com Glutathione Sepharose 4B e em SDS-PAGE apresentou duas bandas majoritárias com mobilidade relativa correspondente a massa molecular de aproximadamente 30700 e 28400 (figura 8). A massa molecular da banda correspondente à AgSG2 obtida em SDS-PAGE 12% sob condições redutoras foi superior à massa molecular estimada para BmGST nativa (26900) (figura 7 e 9) e da predita segundo análise da seqüência de amino ácidos pelo programa TRANSLATE/SWISS-PROT. A maior massa molecular AgSG2 em relação a GST nativa, presente em intestino de teleógina e glândula salivar de partenógina e teleógina (figura 7), provavelmente seja devido à porção da extremidade N-terminal da β -galactosidase, a proteína de fusão, presente no vetor de clonagem pBlueScript[®] SK(-). Durante a purificação da AgSG2, a porção referente a proteína de fusão não foi hidrolisada da AgSG2 purificada.

A AgSG2 purificada, mesmo com parte da proteína de fusão, manteve sua atividade enzimática, detectada no ensaio de atividade com substrato cromogênico CDNB (figura 10). Os resultados do ensaio de atividade enzimática contra CDNB foram confirmados pela

presença de GSTs nas mesmas amostras testadas em RT-PCR (figura 6) e Western Blot (figura 7).

O ensaio de atividade enzimática adotado neste trabalho não corrobora a hipótese de se tratar de uma GST da classe Mu, pois o substrato utilizado (CDNB) não é classe específico, podendo ser reconhecido pelo sítio H de GSTs das classes Alpha, Mu e Pi (TAKAMATSU *et al.*, 1994), exceto pelas GSTs da classe Theta (MEYER *et al.*, 1991). Portanto, os ensaios de atividade enzimática realizados com extratos protéicos aquosos de determinados tecidos do carrapato *B. microplus*, não nos permite afirmar que se trata da GST da classe Mu purificada neste trabalho. Com estes ensaios enzimáticos apenas podemos verificar a presença de GSTs em extrato aquoso de glândula salivar e intestino de partenógina e teleógina, sem especificar a classe da mesma.

Nas amostras de saliva de partenógina e teleógina e hemolinfa de teleógina não foi detectada atividade de GST. Estes resultados coincidem com os obtidos nos ensaios de Western Blot das amostras proteicas sondadas com soro de coelho imunizados com AgSG2 (figura 7). Desta forma, parece que a GST não é secretada, nem excretada, pelo menos durante os estágio de vida estudados (partenógina e teleógina). No entanto, outros motivos que poderiam justificar estes resultados seriam (1) a ação de proteases, que hidrolisariam a GST, (2) ligação de GST com componentes hidrofóbicos, atuando como transportador intracelular, função que inibe a atividade catalítica da GST contra CDBN (WILCE & PARKER, 1994; MANNERVIK *et al.*, 1985), (3) a quantidade relativa de GST nas amostras seria inferior a detectada pelos ensaios imunológicos e bioquímicos adotados.

Já o RT-PCR (figura 6), realizado utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores PF1SG2 e PR1SG2 sintetizados, parece ser específico para a AgSG2.

Os oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para sequenciamento completo do clone isolado foram também utilizados nas reações de RT-PCR. Para síntese dos oligonucleotídeos iniciadores foram selecionadas algumas regiões não codificantes da seqüência do cDNA isolado (figura 3). Desta forma, os oligonucleotídeos iniciadores eram complementares a regiões do cDNA não conservadas entre as GSTs, sendo, portanto, específica para a AgSG2 purificada.

A especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores para AgSG2, utilizados nas reações de RT-PCR, foi verificada devido ausência de uma banda correspondente ao produto de amplificação por estes oligonucleotídeos em RT-PCR de larva de *B. microplus*, já que HE *et al.* (1999) purificaram uma GST a partir de larva de *B. microplus*, também pertencente a classe Mu.

O ensaio de hipersensibilidade imediata e tardia realizado no bovino teve como objetivo verificar se AgSG2 purificada é capaz de induzir uma resposta humoral mediada por IgE, já que esta proteína recombinante (AgSG2), segundo análise comparativa pelo programa BLAST 2 versão BLASTP 2.0.5 (ALTSCHUL *et al.*, 1997), tem uma similaridade de 40% com uma GST de *D. pteronissinus* (O'NEILL *et al.*, 1994) também pertencente a classe Mu que atua como alérgeno, sendo reconhecida por IgE do soro de pacientes alérgicos. ARRUDA *et al.* (1997) identificaram uma GST de *Blattella germanica*, de massa molecular 23.000, como o principal alérgeno reconhecido pelo soro de pacientes alérgicos. Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata foram positivos com o inóculo de cerca de 3 pg da proteína recombinante. Segundo análise comparativa da seqüência de resíduos de amino ácidos pelo programa BLAST2 versão BLASTP 2.0.9 (ALTSCHUL *et al.*, 1997) a GST de *Blattella germanica* pertence a classe sigma. Através do alinhamento das seqüências de amino ácidos com o programa BLAST2 versão BLASTP2.0.14 (ALTSCHUL *et al.*, 1997) foi possível verificar que a GST de *B. germanica* tem uma identidade de 26% com AgSG2.

A reação de hipersensibilidade imediata positiva no bovino indica que a AgSG2 talvez induza resposta imune mediada por anticorpos da classe IgE (ARRUDA *et al.*, 1997), que beneficia a redução de infecções parasitárias, além da produção de anticorpos IgG.

O soro do bovino imunizado com AgSG2 purificada não reconheceu nenhuma banda correspondente a AgSG2 antes de ser imunizado (figura 9), apesar de já ter sido previamente infestado experimentalmente com *B. microplus*. Este fato sugere que a BmGST, por ser reconhecida pelo bovino somente quando imunizado artificialmente, pode se tratar de um "antígeno oculto" (WILLADSEN & KEMP, 1988; WILLADSEN *et al.*, 1993; RIDING *et al.*, 1994) e alvo vacinal em potencial.

TORO-ORTIZ *et al.* (1997) e DA SILVA VAZ Jr *et al.* (1998) inocularam anticorpos monoclonais contra "antígenos ocultos" de *B. microplus*, diretamente em teleóginas que haviam terminado o ciclo e observaram eficiência reprodutivas destas, que foram mantidas em condições ideais de temperatura (28°C) e umidade (85%). TORO-ORTIZ *et al.* (1997) observaram que o inóculo de BrBm1 e BrBm2 causaram uma redução de aproximadamente 50% e 70%, respectivamente, na quantidade de ovos eclodidos e, de 38% e 50% na quantidade de teleóginas que terminaram a postura, quando comparados com grupo inoculado com anticorpo monoclonal não relacionado. DA SILVA VAZ Jr *et al.* (1998) inocularam anticorpos monoclonais anti-BYC (LOGULLO *et al.*, 1998), nas teleóginas e demonstraram um efeito de dose-dependência sobre a quantidade de ovos postos e quantidade de teleóginas que terminaram a postura. As taxas de sobrevivência e postura de ovos variaram entre 5,4% -

60%, e 2,5% - 52,6%, respectivamente, havendo uma correlação significativa com a dose de anticorpo inoculado. Sugere-se que os anticorpos inoculados poderiam interferir no papel fisiológico da BYC, comprometendo a viabilidade dos ovos de *B. microplus*.

Baseando-se nos experimentos descritos acima tentamos inibir as funções fisiológicas da GST com imunoglobulina bovina anti-AgSG2 inoculada nas teleóginas caídas do bovino com o objetivo de verificar algum efeito sobre a eficiência de postura das fêmeas, mantidas em condições ideais de temperatura (28°C) e umidade (85%). Os resultados preliminares indicaram uma tendência de redução na sobrevivência das teleóginas para postura e no peso de ovos postos, quando comparados com grupos controle (dados não mostrados).

No que diz respeito aos experimentos de inoculação de anticorpos monoclonais diretamente nas teleóginas (TORO-ORTIZ *et al.*, 1997; DA SILVA VAZ Jr *et al.*, 1998), podemos fazer algumas considerações. Supondo que anticorpos monoclonais apresentam alta especificidade por determinado epitopo, seja linear ou conformacional, sua ação seria pela ocorrência direta dos epitopos alvos. Além disso, a concentração de anticorpos monoclonais específicos contra o antígeno de interesse, inoculados é possivelmente superior a concentração de anticorpos específicos contra o antígeno de interesse utilizando concentrações correspondentes de anticorpos policlonais, apesar de atuar em vários epitopos de um mesmo alvo de interesse.

As GSTs parecem desempenhar papéis importantes na detoxificação celular (STANLEY *et al.*, 1988; DIRR *et al.*, 1994), processos digestivos (DOUCH *et al.*, 1978), síntese de prostaglandinas (MEYER *et al.*, 1995), transporte intracelular de vários componentes hidrofóbicos, como bilirrubina, hormônios da tireóide, sais biliares e heme (MANNERVIK *et al.*, 1985, JAGT *et al.*, 1985) e desenvolvimento de resistência a produtos químicos, particularmente, organofosforados (FOURNIER *et al.*, 1992; PERITO *et al.*, 1996; NEUEFEIND *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 1998).

Estudos realizados com alguns parasitas, tais como, *H. contortus* (KAWALEK *et al.*, 1984) e *F. hepatica* (MILLER *et al.*, 1994) demonstraram haver correlação entre nível de atividade de GST e desenvolvimento de resistência a drogas.

Quanto aos possíveis papéis fisiológicos da GST na biologia do carrapato *B. microplus*, não se tem evidências claras. He *et al.* (1999) pretendendo verificar o papel desempenhado pela GST da classe Mu na resistência a acaricidas, não observaram alterações nos níveis de expressão dessa GST entre cepas susceptíveis e resistentes a acaricidas. No entanto, propõem que alterações nos níveis de expressão da GST podem ser ativadas após determinado tempo de exposição ao produto químico.

A AgSG2 por estar presente em glândula salivar e intestino de fêmeas adultas podem estar envolvidas na detoxificação celular, processos digestivos, síntese de prostaglandinas (vasodilatadores) e transporte intracelular, já que carrapatos neste estágio de desenvolvimento ingerem grandes volumes de sangue.

Infecções parasitárias, frequentemente, são caracterizadas pelo aparecimento de anticorpos e imunidade celular contra vários antígenos do parasita, os quais são muitas vezes imunodominantes e não essenciais à sua sobrevivência. Os parasitas desenvolveram maneiras de evadir ou suprimir respostas imunes contra moléculas essenciais a sua sobrevivência (WIKEL *et al.*, 1994; MITCHEL *et al.*, 1989 apud GOBERT *et al.*, 1998). Regiões de homologia entre enzimas do hospedeiro e parasita não são imunogênicas (SHARP *et al.*, 1991). Evolucionariamente, alguns parasitas adquirem vantagens ao "imitar" estrutura primária das enzimas do hospedeiro. Trata-se de uma estratégia do parasita de evadir da resposta imune do hospedeiro. Segundo bancos de dados e análise de seqüência pelo programa Blast versão Blastp 2. 1. 1 (ALTSCHUL *et al.*, 1997) foi identificada uma GST de *Bos taurus* (JIMENEZ-ASENSIO *et al.*, unpublished) pertencente a classe Mu, que apresenta identidade de seqüência de resíduos de amino ácidos de 37% com AgSG2. Apesar da semelhança entre AgSG2 esta GST de *B. taurus*, a proteína AgSG2 foi imunogênica para o bovino imunizado, que produziu imunoglobulinas do isotipo G (IgG) (figura 9).

Baseados nos resultados deste estudo e somados aos resultados obtidos para outros parasitas, as GSTs podem ser interessantes alvos vacinais e quimioterápicos. Devido a multifuncionalidade destas enzimas, se forem inibidas, podem interferir em vários processos biológicos vitais para o parasita, tais como imunomodulação da resposta do hospedeiro.

13 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, neste trabalho, levam às conclusões que:

↳ - O fragmento de DNA SG2 contém um gene que codifica para uma glutathione S-transferase (GST) do carrapato *B. microplus*.

↳ - A AgSG2 em estudo é similar a glutathione S-transferases (GSTs) da classe Mu de mamíferos.

↳ - A BmGST é sintetizada em glândula salivar e intestino de partenógina e teleógina. As reações de RT-PCR não indicaram a ocorrência de síntese de BmGST em corpo gorduroso, ovário e larva de *B. microplus*.

↳ A AgSG2 possui atividade enzimática contra substrato cromogênico CDNB.

↳ Aparentemente, a BmGST não é secretada na saliva e sequer excretada na hemolinfa.

13.1 *Perspectivas:*

- clonar seqüência em vetor de expressão em sistema heterólogo em eucarioto;
- imunizar bovinos com AgSG2 purificada e desafiá-los com *B. microplus*;
- caracterizar papel fisiológico da GST em *B. microplus*;

14 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALGAR, N. E. & CABRERA, E. J.. An increase in death rate of *Anopheles stephensi* fed on rabbits immunized with mosquito antigen. **Journal of Economic Entomology**, v.65, p.165-168, 1972.
- ALLEN, J. R. & HUMPHREYS, S. J.. Immunization of guinea pigs and cattle against ticks. **Nature**, v.280, n.9, p.491-493, 1979
- ALLEN, J. R. Host resistance to ectoparasites. **Rev. Sci. Off Int. Epiz.**, v.13, n.4, p.1287-1303, 1994.
- ALLEN, J. R. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. **Experimental & Applied Acarology**, v.7, p.5-13, 1989.
- 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.
- 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. 1: 1-4, 1983
- ARRUDA, L.K.; VAILES, L. D.; PLATTS-MILLS, T.A.; HAYDEN, M. L.; CHAPMAN, M. D.. Induction of IgE responses by glutathione S-transferase from the German cockroach (*Blattella germanica*). **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.33, p.20907-12, 1997.
- BALLOUL, J. M.; SONDERMEYER, P.; DREYER, D.; CAPRON, M.; GRZYCH, J. M.; PIERCE, R. J.; CARVALHO, D.; LECOCQ, J. P.; CAPRON, A.. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. **Nature** (London) v.326, p.149-153, 1987.
- BJORNESTEDT, R., WIDERSTEN, M., BOARD, P. G., MANNERVIK, B.. Design of two chimaeric human-rat class alpha glutathione transferases for probing the contribution of c-terminal segments of protein structure to the catalytic properties. **Biochemical Journal**, v. 282, p. 505-510, 1992.

- BOARD, P. G., BAKER, R. T., CHELVANAYAGAM, G., JERMIIN, L.S.. Zeta, a novel class glutathione transferase in a range of species from plants to humans. **Biochemical Journal**, v. 328, p. 929-935, 1997.
- BOARD, P. G.; COGGAN, M.; WILCE, M. C. J.; PARKER, M. W.. Evidence for an essential serine residue in the active site of the Theta class glutathione transferases. **Biochemical Journal**, v.311, p.247-250, 1995.
- BRADFORD, M. M.. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BROPHY, P. M., CROWLEY, P., BARRET, J.. Detoxification reactions of *Fasciola hepatica* cytosolic glutathione transferases. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 39, n.2, p. 155-161, 1990.
- BROPHY, P. M., PRITCHARD, D. I.. Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. **Experimental Parasitology**, v.79, n.1, p. 89-96, 1994.
- BROWN, S. J. Highlights of contemporary research on host immune responses to ticks. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.28, p.321-334, 1988.
- BROWN, S. J.; SHAPIRO, S. Z.; ASKENASE, P. W.. Characterization of ticks antigens inducing host immune resistance. I. Immunization of guinea pigs with *Amblyomma americanum*- derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein antigen with guinea pig anti-tick antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 133, n.6, p.3319-3325, 1984.
- 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.
- CAPRON, A., DESSAINT, J. P., CAPRON, M., PIERCE, R. J.. Vaccine strategies against schistosomiasis. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, supl. 4, p. 19-27, 1992.

- CASALONE, E.; ALLOCATI, N.; CECCARELLI, I.; MASULLI, M.; ROSSJOHN, J.; PARKER, M. W.; DI ILIO, C.. Site-directed mutagenesis of the *Proteus mirabilis* glutathione transferase B1-1 G-site. **FEBS Letter**, v.423, p.122-124, 1998.
- CASTRO, M.P. & PEREIRA, C. Alimentação das proteroninfas de *Boophilus (Uroboophilus) microplus* Canestrini, 1888 (Ixodidae) com os restos necróticos da reação tissular do hospedeiro. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo.v.17, p.149-62, 1946.
- CHEN, H., JUCHAU, M. R.. Recombinant human glutathione S-transferase catalyze enzymic isomerization of 13-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid *in vitro*. **Biochemical Journal**, v. 336 (Pt1), p. 223-226, 1998.
- COBON, G. S. & WILLADSEN, P. Vaccines to prevent cattle ticks infestations. In: **New Generation Vaccines**. (S.l.,s.n.) p.901-917, 1990.
- COLES, B., KETTERER, B.. **Biochemical Molecular Biology**, v. 25, p. 47-70, 1990.
- CORDOVÉS, C. O.. **Carrapato: controle e erradicação**. Alegrete: Gralha, 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.
- 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.
- DI ILIO, C., ACETO, A., BUCCIARELLI, T., ANGELUCCI, S., FELACO, M., GRILLI, A., FEDERICI, G.. Glutathione transferase isoenzymes from human prostate. **Biochemical Journal**, v. 271, n. 2, p. 481-485, 1990.

- DIRR, H., REINEMER, P., HUBER, R.. Refined crystal structure of porcine class pi glutathione S-transferase (pGST P1-1) at 2.1 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 243, p. 72-92, 1994.
- DOUCH, P. G. C. & BUCHANAN, L.L.. Glutathione conjugation of some xenobiotics by *Ascaris suum* and *Moniezia expansa*. **Xenobiótica**, v.8, p.171-176, 1978.
- DUNM, S.D. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western-blot by monoclonal antibodies. **Analytical Biochemistry**, v.157, p.144-153, 1986.
- 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.
- FAVALORO, B., TAMBURRO, A., ANGELUCCI, S., DE LUCCA, A., MELINO, S., DI ILIO, C., ROTILIO, D.. Molecular cloning, expression and site-directed mutagenesis of glutathione S-transferase from *Ochrobactrum anthropi*. **Biochemical Journal**, v. 335, p. 573-579, 1998.
- FENG, Q.-L., DAVEY, K. G., PANG, A. S. D., PRIMAVERA, M., LADD, T. R., ZHENG, S.-C., SOHI, S. S., RETNAKARAN, A., PALLI, S. R.. Glutathione S-transferase from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*: identification, characterization, cDNA, cloning, and expression. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 779-793, 1999.
- FOURNIER, D., BRIDE, J. M., POIRE, M., BERGE, J. -B., PLAPP, F. W.. Insect glutathione S-transferases: Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 1840-1845, 1992.
- FRAZZON, A. P., VAZ JUNIOR, I. S., 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.

- GOBERT, G. N., STENZEL, D. J., McMANUS, D. P.. Immunolocalisation of the glutathione S-transferases, GST-26 and GST-28, within adult *Schistosoma japonicum*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1437-1443, 1998.
- GOBERT, G. N.. Immunolocalization of Schistosome proteins. **Microscopy Research and Technique**, v.42, p.176-185, 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>. Arquivo capturado em 02 de fevereiro de 2000.
- 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.
- 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.
- HABIG, W. H., PABST, M. J. e JAKOBY, W. B.. Glutathione S-Transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v.249, p.7130-7139, 1974.
- HANSSON, L., WIDERSTEN, M., MANNERVIK, B.. An approach to optimizing the active site in a glutathione transferase by evolution *in vitro*. **Biochemical Journal**, v. 344, p. 93-100, 1999.
- HARLOW, E.; LANE, D.. **Antibodies: A Laboratory Manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- HE, H.; CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W.; GEORGE, J. E.. Characterization and molecular cloning of glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Insect and Biochemistry and Molecular Biology**, v.29, p. 737-743, 1999.

- HEBER BIOTEC. GAVAC - Vacina contra carrapato dos bovinos. 1996. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://iis.com.br/gavac/main.htm> Capturado em 19 de maio de 2000.
- HEWETSON, R. H. Resistance to cattle to cattle tick, *Boophilus microplus*: III. Development of resistance to experimental infestations. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v.22, p.331-342, 1971.
- HOFMANN, K., BUCHER, P., FALQUET, L., BAIROCH, A.. The Prosite database, its status in 1999. **Nucleic Acids Research**, v.27, p. 215-219, 1999.
- HOLY, J. M.; O'LEARY, K. A.; OAKS, J. A.; TRACY, J. M.. Immunocytochemical localization of the major glutathione S-transferase in adult of *Schistosoma mansoni* **Journal of Parasitology**, v.75, p.181-190, 1989.
- HORN, S. C. & ARTECHE, C. C. P.. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A hora Veterinária**, v.23, p.12-32, 1985.
- HOWELL, M. J., BOARD, P. G., BORAY, J. C.. Glutathione S-transferases in *Fasciola hepatica*. **Journal for Parasitology**, v. 74, n. 4, p. 715-8, 1988.
- HUANG, H. S., HU, N. T., YAO, Y. E., WU, C. Y., CHIANG, S. W., SUN, C. N.. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, p. 651-658, 1998.
- JAGT, D. L. V., HUNSAKER, L. A., GARCIA, K. B., ROYER, R. E.. Isolation and Characterization of the multiple glutathione S-transferases from human liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 21, p. 11603-11610, 1985
- JI, X., ZHANG, P., ARMSTRONG, R. N., GILLILAND, G. L.. The three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the mu gene class. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3-3 and glutathione at 2.2-Å resolution. **Biochemistry** v. 31, n. 42, p. 10169-10184, 1992.

- JI, X.; ROSENVINGE, E. C. V.; JOHNSON, W. W.; TOMAREV, S. I.; PIATIGORSKY, J.; ARMSTRONG, R. N.; GILLILAND, G. L.. Three-dimensional structure, catalytic properties and evolution of a Sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. **Biochemistry**, v.34, p. 5317-5328, 1995.
- JIMENEZ-ASENSIO, J. V. and GARLAND, D.. A lens glutathione S-transferase, class mu, with thiol-specific antioxidant activity. Submitted 28-MAR-2000.
- JOHNSON, D. A.; GAUTSCH, J. W.; SPORTMAN, J. R.; ELDER, J. H.. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. **Gene Analytical Techn.**, v.1, p.3, 1984.
- JOHNSTON, L.A.Y.; KEMP, D. H. & 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.
- JOHNSTONE, A.; THORPE, R.. Immunoassays. In: JOHNSTONE, A.; THORPE, R.. **Immunochemistry In Practice**. London, Blackwel Scientific Publications, 1982;
- 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.
- KAWALEK, J. C.; REW, R. S.; HEAVNER, J.. Glutathione S-transferase, a possible drug-metabolizing enzyme, in *Haemonchus contortus*: comparative activity of a combendazole-resistant and a susceptible strain. **International Journal for Parasitology**, v.14, p.173-175, 1984.
- KEMP, D. H., AGBEDE, R. I. S., JOHNSTON, L. A. Y., GOUCH, J. M.. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 16, n. 2, p. 115-120, 1986.
- KITE, J.; DOLITTLE, R. F.. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, p. 105-132, 1982.

- KOCAN, K. M.. Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.121-151, 1995.
- KOTZE, A. C. & ROSE, H. A.. Glutathione S-transferase in the Australian Sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.29, p.77-86, 1987.
- KOZAK, M.. An analysis of vertebrate mRNA sequences: Intimations of translational control. **The Journal of Cell Biology**, v.115, p.887-903, 1991.
- LAEMMLI, E. K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LIGHTOWLERS, M. W.. Vaccination against animal parasites. **Veterinary Parasitology**, v.54, p.177-204, 1994.
- LIU, S. X., SONG, G. C., XU, Y. X., YANG, ., McMANUS, D. P.. Anti-fecundity immunity induced in pig vaccinated with recombinant *Schistosoma japonicum* 26KDa glutathione S-transferase. **Parasite Immunology**, v. 7, p. 355-340, 1995.
- LIU, S. X., SONG, G. C., XU, Y. X., YANG, ., McMANUS, D. P.. Immunization of mice with recombinant Sjc26GST induce a pronounced anti-fecundity effect after experimental infection with Chinese *Schistosoma japonicum*. **Vaccine**, v 6, p. 603-607, 1995.
- LOGULLO, C., DA SILVA VAZ Jr, I., SORGINE, M. H., PAIVA-SILVA, G. O., FARIA, F. S., ZINGALI, R. B., ROSA DE LIMA, M. F., ABREU, L., OLIVEIRA, E. F., ALVES, E. W., MASUDA, H., GONZALES, J. C., MASUDA, A., OLIVEIRA, P.L.. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 116 (Pt6), p. 525-532, 1998.
- LONDT, J.G.H. & WHITEHEAD, G. B.. Ecological studies of larval ticks in South Africa. **Parasitology**, v.65, p.469-490, 1972.

- MANNERVIK, B., ALIN, P., GUTHENBERG, C., JENSSON, H., TAHIR, M. K., WARHOLM, M., JORNVALL, H.. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United State of America**, v. 82, p. 7202-7206, 1985.
- MANNERVIK, B., CASTRO, V. M., DANIELSON, U. H., TAHIR, M. K., HANSSON, J., RINGBORG, U.. Expression of class pi glutathione transferase in human malignant melanoma cells. **Carcinogenesis**, v. 8, n.12, p. 1929-1932, 1987.
- MANNERVIK, B., DANIELSON, U. H.. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. **CRC Crit Rev Biochem** ;v.23, n.3, p.283-337, 1988
- 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 form homogenized ticks *Amblyomma maculatum* koch (Acarina: Ixodidae). **Journal for Parasitology**, v.66, n.1, p.42-48, 1980.
- MEYER, D. J., COLES, B., PEMBLE, S. E., GILMORE, K. S., FRASER, G. M., KETTERER, B.. Theta, a new class of glutathione transferase purified from rat and man. **Biochemistry Journal**, v.274, p.409-414, 1991.
- MEYER, D. J., THOMAS, M.. Characterization of rat spleen prostaglandin H D-isomerase as a sigma class GSH transferase. **Biochemical Journal**, v. 311, 739-742, 1995.
- MILLER, C. M. D.; HOWELL, M. J.; BORAY, J. C.. Glutathione S-transferase as markers of salicylanilide resistance in isolates of *Fasciola hepatica*. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n.4, p.533-542, 1994.
- MITCHELL, G. F., GARCIA, E. G., DAVERN, K. M., TIU, W. U., SMITH, D. B.. Sensitization against the parasite antigen Sj26 is not sufficient for consistent expression of resistant to *Schistosoma japonicum* in mice. **Trans. R. Soc. Trop. Health Hyg.**, v. 82, p. 885-889, 1988.

- MITCHELL, G. F.. Glutathione S-transferase: Potential components of anti-schistosome vaccine. **Parasitology Today**, v. 5, p. 34-37, 1989.
- MORGENSTERN, R., DEPIERRE, J. W., JORNVALL, H.. Microsomal glutathione transferase. Primary structure. **Journal of Biological Chemistry**, v.260, n. 26, p.13976-13983, 1985.
- MORRISON, C. A., COLIN, T., SEXTON, J. L., BOWEN, F., WICKER, J., FRIEDEL, T., SPITHILL, T. W.. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. **Vaccine**, v. 14, p. 1603-12, 1996.
- MURO, A.; RODRIGUES-MEDINA, J. R.; HILLYER, G. V.. Sequence analysis of *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase cDNA clone. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 48, p. 457-463, 1993.
- NAGAR, S.K. On the significance of the duration of preoviposition and oviposition periods in ixodid ticks. **Acarology**. v.10, p.621-29, 1968.
- 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.
- NEUEFEIND, T., REINEMER, P., BIESELER, B.. Plant glutathione S-transferase and herbicide detoxification. **Biochemical Journal**, v. 378 (3-4), p. 199-205, 1997.
- NISHIDA, M.; KONG, K. H.; INOUE, H.; TAKAHASHI, K.. Molecular cloning and site-directed mutagenesis of glutathione S-transferase from *Escherichia coli*. The conserved tyrosyl residue near the N terminus is not essential for catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p.32536-32541, 1994.
- NOLAN, J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. v. 18, p.155-166, 1985.
- O'KELLY, J. C. & SPIERS, W. G. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in genetically different types of calves in early life. **The Journal of Parasitology**, v. 62, n.2, p.312-317, 1976.

- OLIVEIRA, G. P.; COSTA, R. P.; MELLO, R. P. & MENEGUELLI, C.A. Estudo ecológico da fase não parasítica do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina; Ixodidae) no estado do Rio de Janeiro. *Arq. Univ. Fed. Rural R. Janeiro* v. 4, p.1-10, 1974.
- O'NEILL, G. M.; DONOVAN, G. R.; BALDO, B. A.. Cloning and characterization of a major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase. ***Biochimica et Biophysica Acta***, v.1219, 521-528, 1994.
- OPDEBEECK, J. P.; WONG, J. Y. M.; DOBSON, C.. Hereford cattle protected against *Boophilus microplus* with antigens purified by immunoaffinity chromatography from larval and adult ticks. ***Immunology***, v.67, p. 388-393, 1989.
- OUWERKERK-MAHADEVAN, S.; BOOM, J. H.; DREEF-TROMP, M. C.; PLOEMEN, J. H. T. M.; MEYER, D. J.; MULDER, G. J.. Glutathione analogues as novel inhibitors of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes, as well as of glutathione conjugation in isolated rat hepatocytes and in the rat *in vivo*. ***Biochemical Journal***, v. 308, p.283-290, 1995.
- PANACCIO, M.; WILSON, L. R.; CRAMERI, S. L.; WIJFFELS, G. L.; SPITHILL, T. W.. Molecular characterization of cDNA sequences encoding glutathione S-transferase from *Fasciola hepatica*. ***Experimental Parasitology***, v. 74, p. 232-237, 1992.
- PEMBLE, S. E., TAYLOR, J. B.. An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences. ***Biochemical Journal***, v. 287 (Pt 3), p. 957-63, 1992.
- PEMBLE, S. E., WARDLE, A. F., TAYLOR, J. B.. Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. ***Biochemical Journal***; v. 319 (Pt 3):p.749-54, 1996.
- PERITO, B., ALLOCATI, N., CASALONE, E., MASULLI, M., RAGANI, B., POLSINELLI, M., ACETO, A., DI ILIO, C.. Molecular cloning and overexpression of a glutathione transferase gene from *Proteus mirabilis*. ***Biochemical Journal***, v. 318, p 157-162, 1996.

- PROUDFFOT, N. J.; BROWNLEE, G. G.. 3' Non-coding region sequences in eukariotic messenger RNA. **Nature**, v. 263, 1976.
- PRUETT, J. H. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.25-32, 1999.
- 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.
- 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.; MICKENNA, R. V.; PEARSON, R.; COBON, G. S.; WILLADSEN, P.A.. Protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization and possible function. **The Journal of Immunology**, v.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.
- RODRIGUEZ, M.; PENICHET, 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.; LLEONRT, 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.; PENICHET, 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.

- ROSSJOHN, J.; FEIL, S.C.; WILCE, M. C. J.; SEXTON, J. L.; SPITHILL, T. W.; PARKER, M. W.. Crystallization, structural determination and analysis of a novel parasite vaccine candidate: *Fasciola hepatica* Glutathione S-transferase. **Journal of Molecular Biology**, v.273, p. 857-872, 1997.
- SCHLEIN, Y., LEWIS, C. T.. Lesions in haematophagus flies after feeding on rabbits immunized with fly tissues. **Physiological Entomology**, v.1, p.55-59, 1976.
- SEIFERT, G. W. Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of cattle ticks (*Boophilus microplus*). **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourn, v.22, p.159-169, 1971.
- SEIFERT, G.W.; SPRINGELL, P.H. & 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.
- SEXTON, J. L., MILNER, A. R., PANACCIO, M., WADDINGTON, J., WIJFFELS, G., CHANDLER, D., THOMPSON, C., WILSON, L., SPITHILL, T. W., MITCHELL, G. F., *et al.*. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 11, p. 3905-10, 1990.
- SEXTON, J. L., WILCE, M. C., COLIN, T., WIJFFELS, G. L., SALVATORE, L., FEIL, S., PARKER, M. W., SPITHILL, T. W., MORRISON, C. A.. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. Identification and mapping of antibody epitopes on a three-dimensional model of the antigen. **Journal of Immunology**, v. 152 (4), p. 1861-1872, 1994.
- SHAPIRO, S. Z.; VOIGT, W. P.; FUJISAKI, K.. Tick antigens recognized by serum from guinea pig resistant to infestation with the tuck *Rhipicephalus appendiculatus*. **Journal of Parasitology**, v.72, n.3, p. 454-463, 1986.
- SHARP, P. J.; SMITH, D. R. J.; BACH, W.; WAGLAND, B. M.; COBON, G. S.. Purified glutathione S-transferase from parasites as candidate protective antigens. **International Journal for Parasitology**, v.21, n.7, p.938-946, 1991.

- SINNING, I., KLEYWEGT, G. J., COWAN, S. W., REINEMER, P., DIRR, H. W., HUBER, R., GILLILAND, G. L., ARMSTRONG, R. N., JI, X., BOARD, P. G., OLIN, B., MANNERVIK, B., JONES, T. A.. Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the Mu and Pi class enzymes. **Journal of Molecular Biology**, v. 232, p. 192-212, 1993.
- SMITH, D. B.; DAVERN, K. M.; BOARD, P. G.; TIU, W. U.; GARCIA, E. G.; MITCHELL, G. F.. Mr 26000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite GST. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United State of America**, v. 83, p. 8703-8707, 1986.
- SOLOMON, K. R. Acaricide resistance in ticks. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, San Diego, CA-USA, v.27, p.273-296, 1983.
- SPITHILL, T. W., PIEDRAFITA, D., SMOOKER, P. M.. Immunological approaches for the control of Fasciolosis. **International Journal for Parasitology**, v.27, n.10, p. 1221-1235, 1997.
- STANLEY, J. S., BENSON, A. M.. The conjugation of 4-nitroquinoline 1-oxide, a potent carcinogen, by mammalian glutathione transferase. **Biochemical Journal**, v. 256, p. 303-306, 1988.
- 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**, Melbourn, v.34, p.317-27, 1983.
- 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.
- SUZUKI, T., COGGAN, M., SHAW, D. C., BOARD, P. G.. Electrophoretic and immunological analysis of human glutathione S-transferase isozymes. **Ann Hum Genet.**, v. 51 (Pt 2), p. 95-106, 1987.
- TAKAHASHI, Y., CAMPBELL, E. A., HIRATA, Y., TAKAYAMA, T., LISTOWSKY, I.. A basis for differentiating among the multiple human Mu-glutathione S-transferases and molecular cloning of brain GSTM5. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 12, p. 8893-8898, 1993.

- TAKAMATSU, Y.; INABA, T.. Inter-individual variability of human hepatic glutathione S-transferase isozymes assessed by inhibitory capacity. **Toxicology**, v.88 (1-3), p. 191-200, 1994.
- TATCHELL, R. J. Interactions between ticks and their hosts. **International Journal for Parasitology**, v.17, n.2, p.597-606, 1987.
- TAYLOR, J. B.; VIDAL, A.; TORPIER, G.; MEYER, D. J.; ROITSCH, C.; BALLOUL, J. M.; SOUTHAN, C.; SONDERMEYER, P.; PEMBLE, S.; LECOCQ, J. P.; CAPRON, A.; KETTERER, B.; The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. **The EMBO Journal**, v. 7, p. 465-472, 1988.
- TERRIER, P., TOWNSEND, A. J., COINDRE, J. M., TRICHE, T. J., COWAN, K. H.. An immunohistochemical study of Pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. **American Journal Pathology**, v. 137, p. 845-853, 1990.
- TORO-ORTIZ, R. D.; DA SILVA VAZ Jr, I.; GONZALES, J. C.; MASUDA, A.. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on ticks reproductive efficiency. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 297-306, 1997.
- TRAGER, W. Acquired immunity to ticks. **Journal of Parasitology**, v.25, p.57-81, 1939.
- 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.
- UTECH, K. B. W. & WHARTON, R. H. Breeding for resistance to *Boophilus microplus* in Australian Illawarra Shorthorn and Brahman X Australian Illawarra Shorthorn cattle. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, Australia, v.58, p.41-46, 1982.
- VIBANCO-PEREZ, N., JIMENEZ, L., MERCHANT, M. T., LANDA, A.. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. **Journal for Parasitology**, v. 85 (3), p. 448-453, 1999.

- WAGLAND, B. M.. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. I. Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20.000 larvae. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourn, v. 26, p. 1073-1080, 1975.
- 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.
- WALADDE, S.M. & RICE, M. J. The sensory basis of tick feeding behavior. In: OBENCHAIN, F. D.; GALUN, R. (Eds.) **Physiology of ticks**. New York, Pergamon Press. 1982.
- WHARTON, R. H.; UTECH, K. B. W.; TURNER, H. G. Resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus* in a herd of australian Illawarra shorthorn cattle: its assessment and heritability. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.21, p.163-181, 1970.
- WIDERSTEN, M., HOLMSTROM, E., MANNERVIK, B.. Cysteine residues are not essential for the catalytic activity of human class Mu glutathione transferase M1a-a. **FEBS Letter**, v. 293, n. 1-2, p. 156-159, 1991.
- WIJFFELS, G. L., SEXTON, J. L., SALVATORE, L., PETTITT, J. M., HUMPHRIS, D. C., PANACCIO, M., SPITHILL, T. W.. Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathione S-transferases of *Fasciola hepatica*. **Experimental Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 87-99, 1992.
- WIKEL, S. K. & ALLEN, J. R. Acquired resistance to ticks I. Passive transfer of resistance. **Immunology**. v.30, p.311-316, 1976a.
- WIKEL, S. K. & BERGMAN, D. Ticks-host immunology: significant advances and challenging opportunities. **Parasitology Today**, v.13, p. 383-389, 1997.
- WIKEL, S. K. & WHELEN, A. C. Ixodid-host immune interaction. Identification and characterization of relevant antigens and tick-induced host immunosuppression. **Veterinary Parasitology**, v.20, p.149-174, 1986.

- WIKEL, S. K., RAMACHANDRA, R. N., BERGMAN, D. K.. Tick-induced modulation of the host immune response. **International Journal for Parasitology**, v. 24, p. 59-66, 1994.
- WIKEL, S. K.. The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n.1, p. 284-288, 1981.
- WILCE, M. C. J. & PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1205, p.1-18, 1994.
- WILLADSEN, P.. Immunity to ticks. **Advances in Parasitology**, v.18, p.23-313, 1980.
- WILLADSEN, P.. Immunological approaches to the control of ticks. **International Journal for Parasitology**, v.17, n.2, p. 671-677, 1987.
- WILLADSEN, P.. Immunological control of ectoparasites: past achievements and future research priorities. **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering**. v.15, p.131-137, 1999.
- WILLADSEN, P.; McKENNA, R. V.; RIDDING, G. A.. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. **International Journal for Parasitology**. v. 18, n. 2, p. 183-189, 1988.
- WILLADSEN, P.; EISEMANN, C. H.; TELLAN, R. L.. "Concealed" antigens expanding the range of immunological targets. **Parasitology Today**, v. 87, p. 289-294, 1993.
- 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.; GOUCH, J. M.. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of protective antigen from *Boophilus microplus*. **The Journal of Immunology**, v.143, n.4, p. 1346-1351, 1989.

- WONG, J. Y. M; OPDEBEECK, J. P.. Immunity in vaccinated cattle exposed to experimental and natural infestations with *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v.23, n. 5, p. 689-692, 1993.
- YOUNG, A.S. & MORZARIA, S. P. Biology of *Babesia*. **Parasitology Today**. v. 2, n. 8, p. 211-219, 1986.
- ZHANG, P., LIU, S., SHAN, S. O., JI, X., GILLILAND, G.L., ARMSTRONG, R. N.. Modular mutagenesis of exons 1, 2, and 8 of a glutathione S-transferase from the mu class. Mechanistic and structural consequences for chimeras of isoenzyme 3-3. **Biochemistry**, v. 31, n.42, p.10185-10193, 1992.
- ZHIOUZ, 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, n.5, p.815-818, 1997.
- ZHONG, S., SPURR, N. K., HAYES, J. D., WOLF, C. R.. Deduced amino acid sequence, gene structure and chromosomal location of a novel human class Mu glutathione S-transferase, GSTM4. **Biochemical Journal**, v. 291, (Pt 1), p. 41-50, 1993.

ANEXO

Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae)
glutathione S-transferase

Artigo a ser submetido à
Insect Biochemistry and Molecular Biology

15 Title

Cloning and partial characterization of a Boophilus microplus (Acari: Ixodidae)
glutathione S-transferase

16 Name of authors

Mônica Fernandes Rosa de Lima ^{a,b}

Carlos Alexandre Sanchez Ferreira ^{a,b}

Daniela Reis Joaquim de Freitas ^a

Jesus G. Valenzuela^d

Aoi Masuda ^{a,c}

17 Affiliations

^aCentro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, ^bDepartamento de Bioquímica and ^cDepartamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C. P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil and ^dLaboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Building 4, Room 126, 4 Center Drive MSC-0425, 20892-0425, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA.

*Corresponding author

Aoi Masuda

Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul - UFRGS

C. P. 15005 - Campus do Vale

91501-970 Porto Alegre RS Brasil

Phone: 55 (51) 3166078

Fax: 55 (51) 3191079

E-mail: aoi@dna.cbiot.ufrgs.br

18 Abstract

A cDNA of glutathione S-transferase (GST) was isolated from a cDNA library of salivary glands of Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). The recombinant GST (AgSG2) was purified by glutathione affinity chromatography and assayed upon the chromogenic substrate CDNB. The 864 bp cloned fragment was sequenced and showed an open reading frame coding for a protein of 220 amino acids. Expression of the GST gene was tested by RT-PCR in tick tissues and larvae mRNA. Comparison of the deduced amino acid sequence with GSTs from other species revealed that the enzyme is closely related to the mammalian class mu GSTs.

Key words:

Boophilus microplus, glutathione S-transferase, ectoparasites, cDNA cloning,

19 Introduction

The tick B.microplus is a cattle ectoparasite, present in America, Asia, Africa and Oceania (Johnston et al., 1986). Conventional tick control methods are based mainly on the use of acaricides in spite of the high cost of these products and the quick appearance of resistance in the populations (Nolan, 1985). The presence of chemical residues in meat and milk emphasizes the need for other control methods (Kunz and Kemp, 1994). Thus, efforts are being made to develop new methodologies to monitor the appearance of acaricide resistance (Baxter et al., 1999) as well as alternative means of tick control, like vaccines (Willadsen et al., 1989; Riding et al., 1994; Rodriguez et al., 1994; Logullo et al., 1998; Da Silva Vaz Jr et al., 1998) and biological control (Farias et al., 1986; Kaaya et al., 1996, Frazzon, et al., 2000).

GSTs belong to a multigene family of proteins that play a central role in detoxication of xenobiotic compounds. Increased expression levels of GST have been correlated with resistance to insecticides in various organisms (Kawalek et al., 1984; Huang

50 et al., 1998; Wilce & Parker, 1994). A B. microplus GST isolated from larvae could not be
51 correlated with tick resistance against organophosphorus compounds (He et al., 1999),
52 however, the role of GSTs in resistance to acaricides can not be ruled out since it is known
53 that the functional properties of their isoforms are distinct (Jagt et al., 1985). Some GSTs
54 may act as intracellular transporters of various non-substrate hydrophobic compounds
55 (Mannervik et al., 1985). Also, GSTs may be involved in digestive processes (Douch et al.,
56 1978), prostaglandin synthesis (Meyer et al.,1995), and in a series of reactions which are
57 essential to protect cell constituents from oxidative attack by oxygen and oxygen-
58 associated free radicals (Sharp et al., 1991; Feng et al., 1999). Within parasites, GSTs have
59 been studied for their potential as targets for an immunological intervention against
60 helminthic diseases (Balloul et al.,1987;Yang et al., 1997). Because of the wide range of
61 GST functions described (Wilce & Parker, 1994), further studies in B. microplus GSTs
62 could be a valuable subject, in the search for new methodologies to control tick
63 populations.

64 In the present study we report the cloning, expression and partial characterization
65 of a B. microplus GST.

66 **20 Material and Methods**

67 20.1 GenBank Acession Number: AF366931.

68 20.2 Ticks

69 B. microplus ovipositing females, eggs and larvae (Porto Alegre isolate) were
70 experimentally maintained in the Laboratory of Entomozooses (UFRGS, Porto Alegre,
71 Brazil) at 28°C and 85% relative humidity and their parasitic life were completed in calves,
72 housed in individual pens on slatted floors.

73 20.3 Immunizations

74 The antibodies were raised against salivary glands extracts and AgSG2 in rabbits.
75 A bovine was immunized with AgSG2.

76 20.4 Antigen preparation

77 Fully and partially-engorged female ticks were washed with phosphate buffered
78 saline (PBS pH 7.2) plus 500 IU penicillin ml⁻¹. The dorsal surface was dissected with a
79 scalped blade. Salivary gland, gut, ovary and fat body were separated with fine-tipped
80 forceps and washed in PBS. These materials were kept frozen at -70°C until use.

81 The frozen tissues were thawed and solubilized in medium containing 0.5%
82 sodium deoxicolate, 0.1% pepstatin A, 0.1% leupeptin and 0.1 mM N-tosyl-L-
83 phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) in 10 mM Tris buffer pH 8.2. After incubation
84 for 15 min in an ice bath, the material was centrifuged at 32,000g for 40 min. The
85 supernatants were stored at -70°C. The protein concentration of the extract was measured
86 using the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

87 20.5 cDNA library immunological screening

88 An immunological screening of a cDNA library (UNIZAP[®] XR Stratagene)
89 synthesized with salivary glands poly A⁺ RNA of partially engorged adult females was
90 performed using sera from a rabbit immunized with B. microplus salivary gland extract.
91 Nine thousand recombinant phages were screened on nitrocellulose membranes
92 (Schleicher & Schüll, USA) resulting in a single positive GST cDNA, named SG2.
93 Membranes were blocked with blotto (5% skin milk in PBS) for at least 1h at room
94 temperature. They were then incubated with anti-salivary glands antibodies at room
95 temperature for 18h. After three washes in blotto, goat anti-IgG-phosphatase alkaline
96 conjugate (Gibco -BRL) was incubated for 1h at room temperature. After three washes

97 with PBS and once with revelation buffer (5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl in 100 mM Tris
98 pH 9.5), the reaction was revealed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) and
99 nitroblue tetrazolium (NBT).

100 The pBluescript[®] II (Stratagene) plasmid excision from the UNIZAP lambda
101 vector was performed according to the manufacturer's instructions.

102 20.6 DNA sequencing

103 DNA sequencing was performed on an ABI-PRISM 377 automated DNA
104 sequencer (Perkin-Elmer, Foster City, CA) at Molecular Genetics Facility, Georgia, USA.
105 The following oligonucleotides were used for total sequence of the SG2: M13 universal
106 forward, T7 and T3 from the vector sequence, primers 1 (5'-
107 GCAAGAAGCACGGTCTCG-3') corresponding to nucleotides 378-395, primers 2 (5'-
108 CCACAGTTCCGCAGCCTC-3') corresponding to the inverse complement of nucleotides
109 413-430, and primer 3 (5'-GTCAACCGCTGAACGCAC-3') corresponding to the inverse
110 complement of nucleotides 795-812 in SG2 (figure 2).

111 20.7 Enzyme Purification

112 Glutathione-Sepharose 4B (Pharmacia Biotech Inc.) affinity chromatography was
113 used to purify AgSG2. Lysogens of XL1-Blue/AgSG2 clones were prepared, grown and
114 induced with IPTG 0.1mM. Cell pellet from 2000 ml culture were resuspended in 20 ml
115 of PBS and frozen at -70°C. Cells were thawed and disrupted in a French press. Triton X-
116 100 was added to the supernatant to a final concentration of 1%. The supernatant were then
117 loaded on the column that was equilibrated and washed with buffer A (140mM NaCl,
118 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄) and eluted with buffer B (50mM Tris-HCl
119 + 10mM glutathione, pH 8.0) according to the manufacturer's instructions (Pharmacia
120 Biotech).

121 Protein purity was monitored by SDS-PAGE (Laemmli, 1970) with 5% stacking
122 gel and 12% running gel stained with Coomassie Blue G-250.

123 20.8 RNA poly A⁺ isolation and RT-PCR

124 RNA poly A⁺ was isolated from B. microplus tissues and bovine blood collected
125 with citrate, and stored at -70°C . For RNA poly A⁺ isolation was used the Quick Prep
126 Micro mRNA purification kit (Pharmacia) as described by the manufacturer. Five hundred
127 ng of RNA poly A⁺ were submitted to reverse transcription (RT) at 37°C , in the presence
128 of oligo (dT) (Pharmacia Biotech Inc.) and M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco-BRL
129 Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were
130 performed using 1/20 of the RT reaction, 20 pmol of each primer (1 and 3) and 1 U
131 Elongase Mix (Gibco) in a final volume of 50 μl . Samples were denatured for 10 min at
132 94°C and amplification was achieved through 35 cycles of 30 s at 94°C , 30 s at 53°C and 3
133 min at 72°C , with a final extension cycle of 30 s at 53°C and 10 min at 72°C . A parallel
134 cDNA sample with tick actin-specific primers was also amplified (337bp) as a positive
135 control. Negative controls for the RT and PCR amplifications were always included into
136 the assay.

137 20.9 Western Blot

138 For Western Blot analysis, tissue extracts (30 μg protein. lane⁻¹), XL1-Blue/SG2
139 extracts (120 μg protein. lane⁻¹) and AgSG2 purified (4 μg protein. lane⁻¹) in sample buffer
140 containing 2% SDS, 250mM Tris pH 6.8, 0.025% bromophenol blue, 5% glycerol, 10% β -
141 mercaptoethanol and 5M urea were separated in SDS-PAGE 12% gel electrophoresis and
142 transferred to nitrocellulose at 70V for 1h at 4°C in 12mM carbonate buffer pH 9.9 (Dunm,
143 1986). The nitrocellulose sheet was blocked with blotto for 2h at room temperature. The

144 anti-SG2 rabbit sera (1:500) was incubated in blotto overnight at 4°C. The revelation
145 procedure was the same used in the immunological screening.

146 20.10 Enzyme Activity Assay

147 GST activity was measured as described by Habig *et al.* (1974) using 1-chloro-
148 2,4-dinitrobenzene (CDNB) (Sigma) as substrate. The reaction mixture consisted of
149 50 mM substrate into methanol, 5mM glutathione into 100mM Tris-HCl, pH 7.5 and
150 purified enzyme was added to a final volume of 100µl. The activity was determined by
151 measuring absorbance at 340nm (A_{340}), in a 96-well plate using a SpectraMAX 250
152 microplate spectrophotometer (Molecular Devices) at 25°C. Protein was assayed by the
153 method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as the standard.

154 21 Results and Discussion

155 21.1 Immunological Screening

156 A *B. microplus* cDNA named SG2 was isolated from a salivary glands cDNA
157 library by immunoscreening using a rabbit anti-salivary glands sera. The SG2 cDNA was
158 excised from the lambda clone into the pBluescript II (STRATAGENE) plasmid and the
159 864 bp insert was separated from the vector by digestion with *Xho*I and *Eco*RI restriction
160 endonucleases.

161 21.2 Sequence analysis of SG2

162 The total nucleotide sequence of SG2 and its deduced amino acid sequence are
163 shown in figure 1. A putative initial ATG codon (Kozak, 1991) is found 130 nucleotides
164 downstream of the 5'cDNA end. The putative polyadenilation signal (Proudfoot and
165 Brownlee, 1976), AATAAA (nucleotides 789-794) overlapped the translation stop codon
166 TAA (nucleotide 790) (see figure 1). Feng *et al.* (1999) reported an overlapped stop codon

167 and polyadenylation signal in a sequence of GST from the spruce budworm,
168 Choristoneura fumiferana. Within the cDNA sequence a single main open reading frame
169 (ORF) is found which encodes a predicted protein of 220 amino acids (AgSG2) and pI
170 8.61. The predicted molecular weight for the deduced protein is 25575. Similar molecular
171 sizes are found for other glutathione S-transferases (GST) of some organisms (He et al.,
172 1999; O'neil et al., 1994; Sharp et al., 1991; Smith et al., 1986; Balloul et al., 1987).
173 Comparing the deduced amino acid sequence with sequences in the GenBankTM we found
174 that AgSG2 is most similar to the class Mu GSTs (Blast 2 version Blastp 2.0.5) (Altschul
175 et al., 1997) (figure 2). According to SWISS PROT/ScanProsite program (Hofmann et al.,
176 1999), the deduced protein is composed predominantly of hydrophilic residues
177 characteristic of cytosolic protein and a potential glycosylation site is present at residue
178 Asn¹²¹ (figure 1). Cysteines are absent in the sequence of AgSG2 like as in sequence of
179 GST of C. fumiferana (Feng et al., 1999) corroborating the indication that cysteine residues
180 are not essential to the catalytic activity of the class Mu GSTs (Widersten et al., 1991).

181 The cytosolic GST enzymes have two active sites per dimer which behave
182 independently from each other. The G-site binds GSH with high specificity and is located
183 in domain I close to the N-terminal end of the sequence. Domain II is at the C-terminal end
184 and contain the H-site that interacts with the second, hydrophobic substrate in a more
185 unspecific manner (Hansson et al., 1999). Like other GSTs, the recombinant AgSG2
186 contains the conserved active site motif between residues 60 and 68, where GSH binds (G-
187 site). AgSG2 also have the motif SLAILRYL centered into residue 78, and it was
188 suggested that it has an important structural role contributing to both the GSH binding site
189 and to the domain interface (Wilce & Parker, 1994). The degree of similarity is much
190 higher at the N-terminus than at the C-terminus among GSTs (figure 2). The crystal

191 structure of mammalian and insect GSTs have indicated that most active-site residues are
192 in the N-terminal region of the protein (Sinning et al., 1993; Reinemer et al., 1991)

193 The AgSG2 sequence analysis in the Blast 2 version Blastp 2.0.5 (Altschul et
194 al., 1997) within sequence databases showed a high similarity to GSTs from several
195 organisms. AgSG2 showed the highest similarity with 41% identity with the class Mu GST
196 isolated from B. microplus larvae (AAD15991) (He et al., 1999). A multiple alignment
197 (ClustalW program - version 1.8) of the deduced protein of AgSG2 with other GSTs is
198 shown in figure 2. The sequence comparison showed 40% identity with class Mu GST
199 from Dermatophagoides pteronissinus (P46419) (O'neil et al., 1994), 36% with class alpha
200 GST from Fasciola hepatica (P31671) (Panaccio et al., 1992), 32% with class alpha GST
201 from Schistosoma japonicum (P08515) (Smith et al., 1986) and 26% with class sigma GST
202 from Blattella germanica (Arruda et al., 1997). Favaloro et al. (1997) reported that
203 interclass sequence identity is generally lower than 30%.

204 Some GSTs were shown to behave as allergens, like the class mu GST of the
205 house dust mite D. pteronissinus (O'neil et al., 1994), which showed the highest identity
206 with the AgSG2 sequence excluding the B. microplus larvae GST already described (He et
207 al., 1999). A class sigma GST from Blattella germanica (Arruda et al., 1997) was also
208 identified as a major allergen. It was reported that recombinant B. germanica GST causes
209 IgE antibodies responses in approximately 70% of cockroach-allergic asthmatic patients.
210 Other GST allergen was also identified in the helminth parasite S. mansoni (class alpha)
211 (Capron et al., 1992), thus defining the importance of GST superfamily in causing IgE
212 antibody responses. Hypersensitivity skin test in bovine was used to evaluate the reactivity
213 of recombinant B. microplus AgSG2 *in vivo*. An immunized bovine showed a positive
214 reaction indicating that AgSG2 is able to induce a cellular immune response beyond the
215 production of IgG. The S. mansoni GST, a promising candidate for a vaccine against

216 schistosomiasis induces the production of IgE and IgA antibodies which are thought to be
217 beneficial in reducing parasitic infection (Arruda et al., 1997).

218 21.3 Characterization of recombinant AgSG2

219 SDS-PAGE analysis of affinity-purified recombinant AgSG2 is show in figure 3.
220 The purified AgSG2 protein appeared as two major components after Coomassie Blue
221 staining and had an apparent molecular weight of 30.700 and 28.400. AgSG2 contains a
222 fragment of the fusion protein β -galactosidase at the 5' end that corresponds for the
223 difference between the purified fusion protein and the estimated GST molecular masses.

224 21.4 RT-PCR

225 The forward primer 1 and reverse primer 3 (see figure 4) were used in RT-PCR
226 experiments to analyze the expression of the AgSG2 gene in fully and partially-engorged
227 female gut as well as in partially-engorged salivary glands, fully engorged female ovaries,
228 partially-engorged female fat bodies and 20 days old larvae using mRNA as template. The
229 expected-DNA fragments of 435 bp were amplified from RNA of partially and fully-
230 engorged female guts and from partially-engorged female salivary glands (figure 4).
231 Control RT-PCR amplifications (337 bp) using actin-specific primers confirmed sample
232 integrity.

233 As the AgSG2 mRNA and protein were not detected by RT-PCR and Western
234 Blot in B. microplus larvae, and the low sequence identity between them suggest that the
235 SG2 gene is different from the already reported class mu GST isolated from B. microplus
236 larvae (He et al., 1999). The SG2 was isolated from partially-engorged female salivary
237 glands but seems to be transcribed in others tick tissues, except in 20 days old larvae.

238 21.5 Western Blot analysis

239 Partially-engorged and fully-engorged female salivary glands and fully-engorged
240 female gut extracts probed with rabbit anti-sera against AgSG2 showed bands of 26.900,
241 which correspond to BmGST (figure 5). The anti-AgSG2 rabbit sera did not react with any
242 antigen in fat body, larvae, haemolymph extracts (figure 5) and saliva from partially-
243 engorged female tick (data not show) in the conditions tested.

244 The apparent localization of AgSG2 within the B. microplus body might shed
245 some light on their physiological roles. A major function of GSTs has long been believed
246 to be detoxification of xenobiotics (Stanley et al., 1988; Dirr et al., 1994; He et al., 1999)
247 digestive processes (Douch et al., 1978), prostaglandin synthesis (Meyer et al., 1995) and in
248 a series of reactions which are essential to protect cell constituents from oxidative attack by
249 oxygen and oxygen-associated free radicals (Sharp et al., 1991; Feng et al., 1999). GSTs
250 are also implicated in the development of resistance in cells and organisms toward drugs,
251 pesticides, herbicides and antibiotics (Mannervik et al., 1988, Fournier et al., 1992; Spithill
252 et al., 1997; Neufeind et al., 1997; Perito et al., 1996). Increased expression levels of GST
253 have been correlated with insect resistance, particularly against the organophosphorus type
254 (Huang, et al., 1998). In H. contortus, Kawalek et al., (1984) demonstrated that the activity
255 of GST was 1.5 - 1.8 times higher in a cambendazole-resistant strain compared with a
256 susceptible one. Preliminary results with class mu GST of B. microplus larvae showed no
257 differences in mRNA levels between untreated larvae of susceptible and
258 organophosphorus- resistant strains (He et al., 1999).

259 The results obtained in RT-PCR and Western Blot are coincident regarding to the
260 presence of GST in tissues extracts of B. microplus. The presence of AgSG2 in salivary
261 glands and guts of adult females suggests that it can be involved in cellular detoxification,
262 digestive processes, prostaglandin synthesis or protection from oxidative damage

263 considering that adult females ingest a large content of blood from the host. GSTs may
264 function as intracellular transporters of various non-substrate hydrophobic compounds
265 such as heme (Jagt et al., 1985) as well as bilirubin, steroids, thyroid hormones and bile
266 salts (Mannervik et al., 1985).

267 21.6 Enzyme activity

268 The fraction eluted from Glutathione Sepharose 4B (see Materials and Methods)
269 column containing the purified protein AgSG2 and extracts from B. microplus female
270 tissues, were assayed for its activity upon the chromogenic substrate CDNB. The substrate
271 CDNB is not class specific and can interact with class as alpha, mu, pi and sigma GSTs
272 (Takamatsu et al., 1994), except to class theta GST (Meyer et al., 1991). Substrate
273 hydrolysis is observed in assays with purified AgSG2, fully and partially-engorged female
274 guts and salivary glands aqueous extracts (figure 6), being much higher the activity level
275 detected in salivary glands than in guts. Enzyme activity was absent in haemolymph and
276 saliva of B. microplus females (data not shown). Class alpha GST from Schistosoma
277 japonicum (SjGST) (Pharmacia Biotech) was used as positive control (data not show). An
278 endogenous bacterial GSTs control were included in the assays and activity were not
279 detected (data not show). AgSG2 showed GST activity even containing a fragment of β -
280 galactosidase on its 5' end but possibly with an altered level of activity. The results of GST
281 enzymatic activity assays against CDNB confirmed the presence of GST in the same
282 samples that showed positive results by RT-PCR and Western Blot.

283 In this paper, we described the cloning, expression and the partial characterization
284 of a B. microplus recombinant similar to mammals class Mu glutathione S-transferase
285 (AgSG2). We also detected its presence in adult female salivary glands and gut, but further
286 work is needed to understand it's physiological role within the tick metabolism as well as
287 to evaluate if it performs a function in the tick-host relationship.

288 **22 Acknowledgements**

289 We wish to thank Prof. Hélio M. M. Maia and Luis Paulo da Silva Braga for
290 helpful assistance in the French Press use. We are also grateful to Elisabete Herrera, Gaby
291 Renard, Valesca do Santos Gomes and Itabajara da Silva Vaz Jr. for important cooperation.
292 This work was supported by grants from CAPES, CNPq, CNPq/PADCT, FINEP/PRONEX
293 and FAPERGS.

294 **23 References**

295 Altschul; Stephen F., Madden, T. L., Shaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W.,
296 Lipman, D. J., 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein
297 database search programs". Nucleic Acids Research, v. 25, p. 3389-3402.

298 Arruda, L.K.; Vailes, L. D.; Platts-Mills, T.A.; Hayden, M. L.; Chapman, M, D., 1997.
299 Induction of IgE responses by glutathione S-transferase from the German cockroach
300 (*Blattella germanica*). Journal of Biological Chemistry, v.272, n.33, p.20907-12.

301 Balloul, J. M.; Sondermeyer, P.; Dreyer, D.; Capron, M.; Grzych, J. M. Pierce, D. C.;
302 Lecocq, J. P.; Capron, A., 1987. Molecular cloning of a protective antigen of
303 schistosomes. Nature, v.326, p.149-153.

304 Baxter, G. D., Green, P., Stuttgen, M., Barker, S. C., 1999. Detecting resistance to
305 organophosphates and carbamates in the cattle tick *Boophilus microplus*, with a
306 propoxur-based biochemical test. Experimental Appl. Acarology, v. 23, n. 11, p.
307 907-914.

308 Bradford, M. M.. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of
309 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
310 Analytical Biochemistry, v.72, p.248-254.

- 311 Capron, M., Dessaint, J. P., Capron, M., Pierce, R. J., 1992. Vaccine strategies against
312 schistosomiasis. Memorial Instituto Oswaldo Cruz, v87, p. 1-9.
- 313 Da Silva Vaz Jr, I.; Logullo, C.; Sorgine, M.; Velloso, F. F.; Rosa de Lima, M. F.;
314 Gonzales, J. C.; Masuda, H.; Oliveira, P. L.; Masuda, A., 1998. Immunization of
315 bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus*
316 eggs. Veterinary Immunology and Immunopathology, v.66, p.331-341.
- 317 Dirr, H., Reinemer, P., Huber, R., 1994. Refined crystal structure of porcine class pi
318 glutathione S-transferase (pGST P1-1) at 2.1 A resolution. Journal of Molecular
319 Biology, v. 243, p. 72-92.
- 320 Douch, P. G. C. & Buchanan, L.L., 1978. Glutathione conjugation of some xenobiotics
321 by *Ascaris suum* and *Moniezia expansa*. Xenobiotica, v.8, p.171-176.
- 322 Dunm, S. D., 1986 Effects of the modification of transfer buffer composition and the
323 renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western-blot by
324 monoclonal antibodies. Analytical Biochemistry, v.157, p.144-153.
- 325 Farias, N. A. R.; Gonzales, J. C.; Saibro, J. C., 1986. Antibiose e antixenose entre
326 forrageiras em larvas de carrapato do boi. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília,
327 D.F., v.21, p.1313-1320.
- 328 Favaloro, B., Tamburro, A., Angelucci, S., De Lucca, A., Melino, S., Di Ilio, C.,
329 Rotilio, D., 1998. Molecular cloning, expression and site-directed mutagenesis of
330 glutathione S-transferase from *Ochrobactrum anthropi*. Biochemical Journal, v. 335,
331 p. 573-579.

- 332 Feng, Q.-L., Davey, K. G., Pang, A. S. D., Primavera, M., Ladd, T. R., Zheng, S. C.,
333 Sohi, S. S., Retnakaran, A., Palli, S. R., 1999. GST from the spruce budworm,
334 *Chorestoneura fumiferana*: identification, characterization, localization, cDNA
335 cloning and expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 29, p. 779-
336 793.
- 337 Fournier, D., Bride, J. M., Poire, M., Berge, J. -B., Plapp, F. W., 1992. Insect
338 glutathione S-transferases: Biochemical characteristics of the major forms from
339 houseflies susceptible and resistant to insecticides. *Journal of Biological Chemistry*.
340 v. 267, p. 1840-1845.
- 341 Frazzon, A. P. G.; Da Silva Vaz Jr, I.; Masuda, A.; Schrank, A.; Vainstein, M. H., 2000.
342 In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick
343 *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 94, p. 117-125.
- 344 Habig W. H., Pabst, M. J E Jakoby W. B., 1974. Glutathione S-Transferase. The first
345 enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*,
346 v.249, p.7130-7139.
- 347 Hansson, L., Widersten, M., Mannervik, B., 1999. An approach to optimizing the active
348 site in a glutathione transferase by evolution *in vitro*. *Biochemical Journal*, v. 344, p.
349 93-100.
- 350 He, H.; Chen, A. C.; Davey, R. B.; Ivie, G. W.; George, J. E., 1999. Characterization
351 and molecular cloning of glutathione S-transferase gene from the tick,
352 *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect and Biochemistry and Molecular*
353 *Biology*, v.29, p. 737-743.

- 354 Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L., Bairoch, A., 1999. The Prosite database, its status
355 in 1999. *Nucleic Acids Research*, v.27, p. 215-219.
- 356 Huang, H. S., Hu, N. T., Yao, Y. E., Wu, C. Y., Chiang, S. W., Sun, C. N., 1998.
357 Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase
358 involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*.
359 *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 28, p. 651-658.
- 360 Jagt, D. L. V., Hunsaker, L. A., Garcia, K. B., Royer, R. E., 1985. Isolation and
361 Characterization of the multiple glutathione S-transferases from human liver. *The*
362 *Journal of Biological Chemistry*, v. 260, n. 21, p. 11603-11610.
- 363 Johnston, L.A.Y.; Kemp, D. H. & Pearson, R. D., 1986. Immunization of cattle against
364 *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of
365 induced immunity on tick populations. *International Journal for Parasitology* v.16,
366 n.1, p.27-34.
- 367 Kaaya, G. P.; Mwangi, E. N.; Ouna, E. A., 1996. Prospects for biological control of
368 livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the
369 entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of*
370 *Invertebrate Pathology*, v. 67, n.1, p.15-20.
- 371 Kawalek, J. C.; Rew, R. S.; Heavner, J., 1984. Glutathione S-transferase, a possible
372 drug-metabolizing enzyme, in *Haemonchus contortus*: comparative activity of a
373 combendazole-resistant and a susceptible strain. *International Journal for*
374 *Parasitology*, v.14, p.173-175.
- 375 Kozak, M., 1991. An analysis of vertebrate mRNA sequences: Intimations of
376 translational control. *The Journal of Cell Biology*, v.115, p.887-903.

- 377 Kunz, S. E., Kemp, D. H., 1994. Insecticides and acaricides: resistance and
378 environmental impact. *Rev Sci Tech.* v. 13, n. 4, p. 1249-86.
- 379 Logullo, C., Da Silva Vaz Jr, I., Sorgine, M. H., Paiva-Silva, G. O., Faria, F. S., Zingali,
380 R. B., Rosa De Lima, M. F., Abreu, L., Oliveira, E. F., Alves, E. W., Masuda, H.,
381 Gonzales, J. C., Masuda, A., Oliveira, P. L., 1998. Isolation of an aspartic proteinase
382 precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*, v. 116
383 (Pt6), p. 525-532.
- 384 Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M. K., Warholm, M.,
385 Jornvall, H., 1985. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase
386 common to several mammalian species: correlation between structural data and
387 enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United*
388 *State of America.* v. 82, p. 7202-7206.
- 389 Mannervik, B., Danielson, U. H., 1988. Glutathione transferases--structure and catalytic
390 activity. *CRC Crit Rev Biochem* ;v.23, n.3, p.283-337.
- 391 Meyer, D. J., Coles, B., Pemble, S. E., Gilmore, K. S., Fraser, G. M., Ketterer, B., 1991.
392 Theta, a new class of glutathione transferase purified from rat and man. *Biochemistry*
393 *Journal*, v.274, p.409-414.
- 394 Meyer, D. J., Thomas, M., 1995. Characterization of rat spleen prostaglandin H D-
395 isomerase as a sigma class GSH transferase. *Biochemical Journal*, v. 311, p.739-742.
- 396 Neufeind, T., Reinemer, P., Bieseler, B., 1997. Plant glutathione S-transferase and
397 herbicide detoxification. *Biochemical Journal*, v. 378 (3-4), p. 199-205.

- 398 Nolan, J., 1985. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of
399 veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. v.18, p.155-166.
- 400 O'neil, G. M.; Donovan, G. R.; Baldo, B. A., 1994. Cloning and characterization of a
401 allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with
402 glutathione S-transferase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1219: 521-528.
- 403 Panaccio, M.; Wilson, L. R.; Cramer, S. L.; Wijffels, G. L.; Spithill, T. W., 1992.
404 Molecular characterization of cDNA sequences encoding glutathione S-transferase
405 from *Fasciola hepatica*. *Experimental Parasitology*, v. 74, p. 232-237.
- 406 Perito, B., Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Ragani, B., Polsinelli, M., Aceto, A.,
407 Di Ilio, C., 1996. Molecular cloning and overexpression of a glutathione transferase
408 gene from *Proteus mirabilis*. *Biochemical Journal*, v. 318, p 157-162.
- 409 Proudfoot, N. J.; Brownlee, G. G., 1976. 3' Non-coding region sequences in eukariotic
410 messenger RNA. *Nature*, v. 263, p. 211-214.
- 411 Reinemer, P., Dirr, H. W., Ladenstein, R., Schaffer, J., Gallay, O., Huber, R., 1991. The
412 three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with
413 glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *EMBO Journal*, v. 10, n. 8, p. 1997-2005.
- 414 Riding, G. A.; Jarmey, J.; Mickenna, R. V.; Pearson, R.; Cobon, G. S.; Willadsen, P.A.,
415 1994. Protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification,
416 localization and possible function. *The Journal of Immunology*, v.153, p. 5158-5166.

- 417 Rodriguez, M.; Rubiera, R.; Penichet, M.; Montesinos, R.; Cremata, J.; Falcon, V.;
418 Sánchez, G.; Bringas, R.; Cordovés, C.; Valdés, M.; Lleonart, R.; Herrera, L.; Fuente,
419 J., 1994. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast
420 *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. Journal of
421 Biotechnology, v.33, p. 135-146.
- 422 Sharp, P. J.; Smith, D. R. J.; Bach, W.; Wagland, B. M.; Cobon, G. S., 1991. Purified
423 glutathione S-transferase from parasites as candidate protective antigens.
424 International Journal for Parasitology, v.21, n.7, p.938-946.
- 425 Sinning, I., Kleywegt, G. J., Cowan, S. W., Reinemer, P., Dirr, H. W., Huber, R.,
426 Gilliland, G. L., Armstrong, R. N., Ji, X., Board, P. G., Olin, B., Mannervik, B.,
427 Jones, T. A., 1993. Structure determination and refinement of human alpha class
428 glutathione transferase A1-1, and a comparison with the Mu and Pi class enzymes.
429 Journal of Molecular Biology, v. 232, p. 192-212.
- 430 Smith, D. B.; Davern, K. M.; Board, P. G.; Tiu, W. U.; Garcia, E. G.; Mitchell, G. F.,
431 1986. Mr 26000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI
432 129/J mice is a parasite GST. Proct. Natl. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 8703-8707.
- 433 Spithill, T. W.; Piedrafita, D.; Smooker, P. M., 1997. Immunological Approaches for
434 the control of Fasciolosis. International Journal for Parasitology, v. 27, n. 10,
435 p. 1221-1235.
- 436 Stanley, J. S., Benson, A. M., 1988. The conjugation of 4-nitroquinoline 1-oxide, a
437 potent carcinogen, by mammalian glutathione transferase. Biochemical Journal,
438 v. 256, p. 303-306.

- 439 Takamatsu, Y.; Inaba, T., 1994. Inter-individual variability of human hepatic
440 glutathione S-transferase isozymes assessed by inhibitory capacity. *Toxicology*, v.88
441 (1-3), p.191-200.
- 442 Widersten, M., Holmstrom, E., Mannervik, B., 1991. Cysteine residues are not essential
443 for the catalytic activity of human class Mu glutathione transferase M1a-a. *FEBS*
444 *Letter*, v. 293, n. 1-2, p. 156-159.
- 445 Wikel, S. K., 1988. Immunological control of hematophagous arthropod vectors:
446 utilization of novel antigens. *Veterinary Parasitology*, v. 29, . 235-264.
- 447 Wilce, M. C. J. & Parker, M. W., 1994. Structure and function of glutathione S-
448 transferases. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1205, p.1-18.
- 449 Willadsen, P.; Riding, G. A.; Mckenna, R. V.; Kemp, D. H.; Tellam, R. L.; Nielsen, J.
450 N.; Lahnstein, J.; Cobon, G. S.; Gouch, J. M., 1989. Immunologic control of a
451 parasitic arthropod. Identification of protective antigen from *Boophilus microplus*.
452 *The Journal of Immunology*, v.143, n.4, p. 1346-1351.
- 453 Yang, W.; Gobert, G. N.; McManus, D. P., 1997. Oral vaccination of mice with
454 recombinant *Schistosoma japonicum* proteins induces specific anti-parasite
455 antibodies and damage to adult worms after a challenge infection. *International*
456 *Journal for Parasitology*, 27 (7): 843-853.

457 Figure 1: Nucleotide and the corresponding deduced amino acid sequence of
458 B. microplus glutathione S-transferase gene (AgSG2). The regions used for the synthesis
459 of primers 1, 2 and 3 are underlined. The arrow indicates a potential glycosilation site. The
460 stop codon is in bold and the polyadenilation signal is in italic. This sequence has been
461 submitted to GenBank and assigned the acesion number AF366931.

462 Figure 2: Alignment of the deduced amino acid sequence of GSTs. Recombinant
463 polypeptide (AgSG2); class mu GST from larvae of the B. microplus (BmGSTM)
464 (AAD15991); mu-GST from mite Dermatophagoides pteronissinus (DpGSTM) (P46419);
465 alpha-GST from F. hepatica (FhGSTA) (P31671); alpha-GST from S. japonicum
466 (SjGSTA) (P05815). The boxshade represents identity. Sequence submitted to ClustalW
467 program version 1.8.

468 Figure 3: SDS-PAGE (A) and Western Blot (B, C) of purified AgSG2. (A) Stained
469 with Coomassie Blue; (B) pre-vaccinated and (C) post-vaccinated rabbit sera against
470 AgSG2. Lane 1 XL1-Blue/SG2 extracts (120 μg protein. lane⁻¹), lane 2 recombinant
471 purified AgSG2 (4 μg protein. lane⁻¹). Numbers in the margins are molecular mass
472 standards expressed in thousands (Broad - BioRad).

473 Figure 4: PCR fragments generated from SG2 and cDNAs from different tissues of
474 B. microplus. In lane M are the molecular mass markers (100bp ladder, Pharmacia). Lane 1
475 shows the negative control of reverse transcriptase reaction; lane 2, the negative control of
476 PCR reaction; lane 3, the fragments amplified from SG2; lanes 4 and 5 the fragments
477 amplified from larvae cDNA; lanes 6 and 7 the fragments amplified from fully-engorged
478 ovary cDNA; lanes 8 and 9 the fragments amplified from fat body; lanes 10 and 11 the
479 fragments amplified from partially-engorged female salivary gland cDNA; lanes 12 and 13
480 fragments amplified from partially-engorged female gut cDNA; lanes 14 and 15 fragments
481 amplified from fully-engorged female gut cDNA; lanes 16 and 17 shows the RT-PCR
482 reaction from bovine blood cDNA. The primers used were 1 and 3 for the SG2
483 amplifications (lanes 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16) and primers specific for an actin gene of
484 B. microplus were used as a cDNA positive control (lanes 5, 7, 9, 11, 13, 15 and 17).
485 Samples were submitted to electrophoresis on 2% agarose gel stained with ethidium
486 bromide.

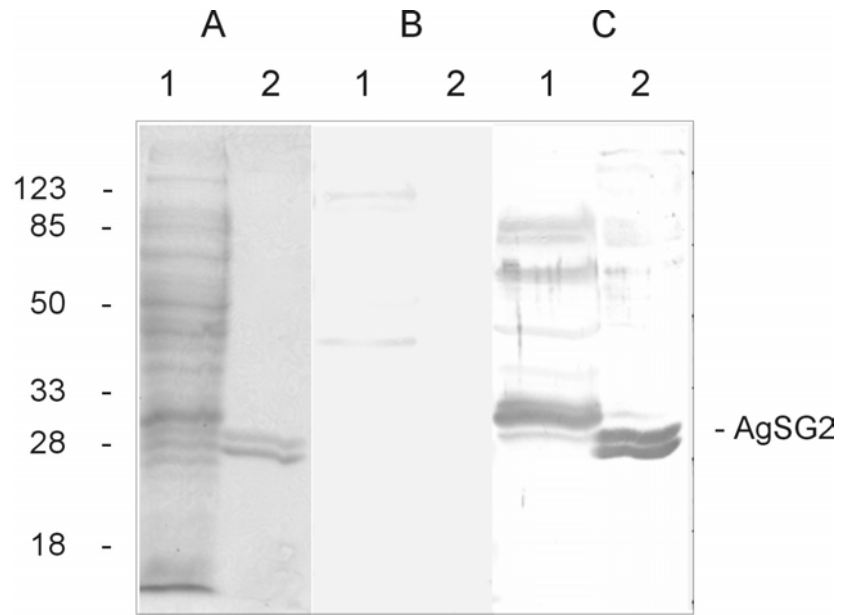
487 Figure 5: Western Blot of B. microplus tissues extracts and purified AgSG2. Samples
488 were run on a 12% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Anti-
489 AgSG2 rabbit sera was used for Western Blot analysis. (A) SDS-PAGE stained with
490 Coomassie Blue; (B) membrane probed with anti-AgSG2 sera. Lane 1, recombinant
491 purified AgSG2 (4 µg); lane 2, partially-engorged female salivary gland; lane 3, partially-
492 engorged female fat body; lane 4, fully-engorged female gut; lane 5, larvae; lane 6, fully-
493 engorged female salivary gland; lane 7, fully-engorged female haemolymph. Numbers at
494 left are molecular weight standards expressed in thousands (Broad - BioRad).

495 Figure 6: Enzymatic activity of purified AgSG2 and extracts from different tick
496 tissues using CDNB as substrate.

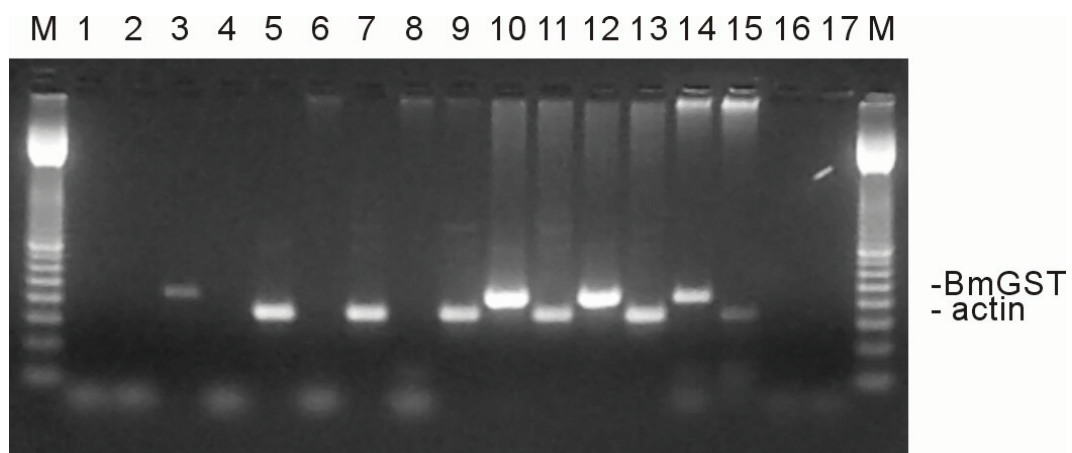
497 1 ggcacgagctgatatcgcataccggcgatcctctacatgctctgagagccacggttctgca
 498 62 gaaaccgcctgcgacaacacgagagaatcgttgaagagtgcgcatatagagccaagcata
 499 1 M A P T P V V G Y T T A R G L A Q
 500 122 aactccggcatggcacctactccggtcggttggttacaccactgccagaggcctggcccag
 501
 502 18 S I R N L L V Y K G V H F E D K R Y E F
 503 182 agcatccgcaacctgctgggtgtacaagggcgctgcacttcgaggacaagcgctacgagttc
 504
 505 38 G P A P T Y E K L G W A A D S A S L G F
 506 242 ggaccggcgcccacgtacgagaagctcggttgggcccgcgacagtgcctcgctgggcttc
 507
 508 58 T F P N L P Y Y I D G D V R L T Q S L A
 509 302 acgttccccaacctgccgtactacatcgatggcgacgtacggctcacgcagtccttagcc
 510
 511 78 I L R Y L G K K H G L D A R S D Q E A A
 512 362 attctccgggtacctgggcaagaagcacggctctcgacgccaggagtgaccaggaggctgcg
 513
 514 98 E L W L M E Q Q A N D L L W A L V V T A
 515 422 gaactgtggctcatggagcagcaggccaacgacctgctctgggctctcgctgacccg
 516 ↓
 517 118 M N P N A T E A R K S Q E K R L A D S L
 518 482 atgaacccgaacgcgacccgaggcccgcaagagccaggagaagaggctggctgactcgctg
 519
 520 138 P R W Q E L L K K R R W A L G N T L T Y
 521 542 ccccgctggcaggagctgctgaagaagcgccgctgggcccctcggcaacacgctcacctac
 522
 523 158 V D F L L Y E A L D W N R Q F A P D A F
 524 602 gttgacttctgctctacgaggcgctcgactggaaccgccagttcgcgccggacgcgcttc
 525
 526 178 A N R P E L L D Y L R R F E Q L P N L K
 527 662 gccaacccgacccgagctgctggactacctgcgcccgttcgagcagctgccaacctgaag
 528
 529 198 E Y F A S D K Y V K W P I M A P Y M F W
 530 722 gagtacttcgctccgacaaatacgtcaagtggccgatcatggcgccttacatggttttgg
 531
 532 218 G H K *
 533 782 ggacacaaataaagtgcttcagcggttgaccgctctacgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
 534
 535 842 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

540

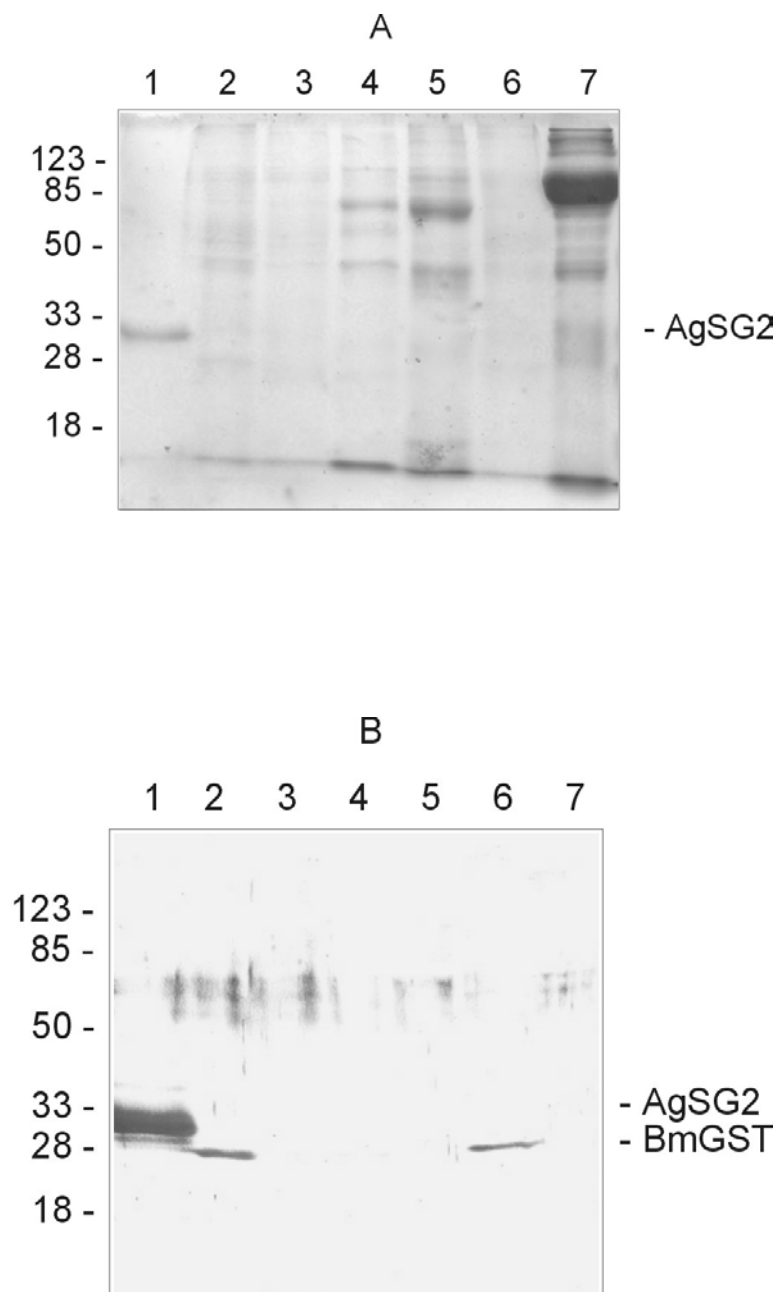
Figure 3



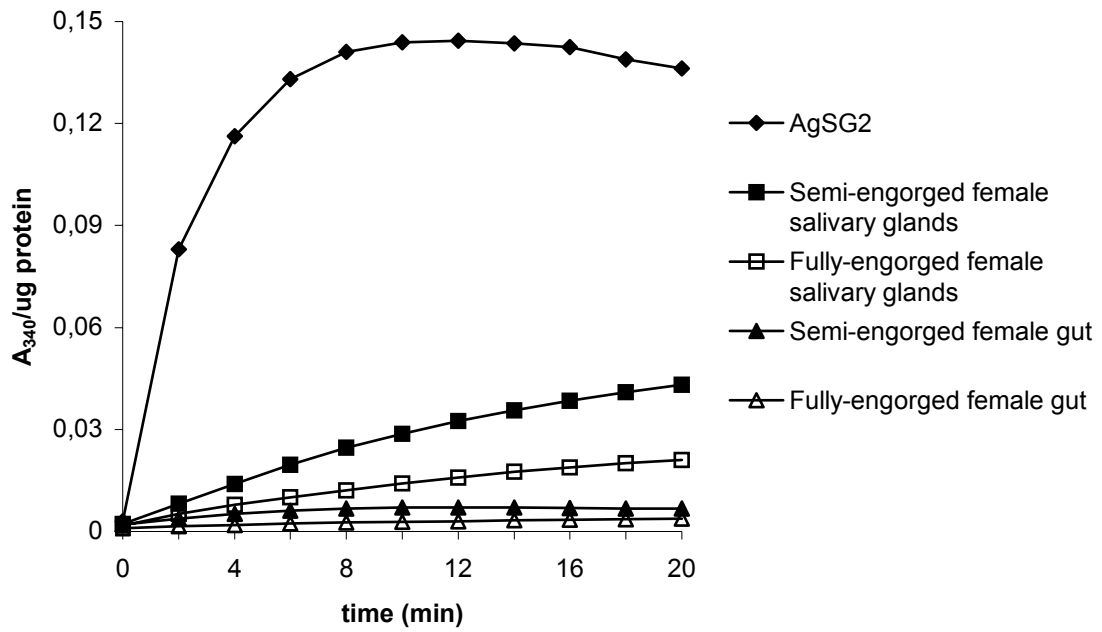
541 Figure 4



542 Figure 5



543 Figure 6



544
545