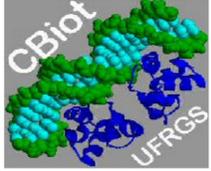


Clonagem do gene e caracterização de uma metaloprotease de glândula salivar do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*



Melina Garcia Guizzo^{1,2}, Luís Fernando Parizi², Arianne Fabres³, Carlos Logullo³, Aoi Masuda^{2,4} & Itabajara da Silva Vaz Júnior^{1,2}

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



Introdução

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasita hematófago que causa prejuízos na bovinocultura. Métodos alternativos de controle tornam-se uma necessidade ambiental e de saúde humana, visto que resíduos de químicos utilizados permanecem no ambiente e nos produtos de origem animal a serem consumidos. Alternativas de controle da infestação requerem o estudo do metabolismo do parasita através da caracterização de biomoléculas. Em outros carrapatos as metaloproteases caracterizam-se como um dos componentes salivares responsáveis por interferir nas respostas do hospedeiro contra o parasita, permitindo assim o repasto sanguíneo e consequente transmissão de patógenos. No *R. microplus* cinco seqüências nucleotídicas pertencentes a genes de proteínas de metaloproteases foram depositadas no Genbank sendo que duas delas (MP2 e MP4) foram identificadas em glândula salivar.

Objetivos

O presente trabalho tem como objetivos a clonagem do gene da MP4, a expressão da proteína recombinante em sistema procarioto e a análise da transcrição relativa do gene da MP4 em diferentes tecidos.

Materiais e Métodos

Clonagem da região codificante do gene da MP4: O RNA total foi extraído de larvas de *R. microplus* e um RT-PCR com primers específicos para a ORF da MP4 realizado. O amplicon de 1680 pb foi clonado nos vetores pGEM-T e pET5a (figura 1).

Expressão e solubilização da proteína recombinante: A MP4 recombinante foi obtida na linhagem de *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL sendo expressa em corpúsculo de inclusão. A expressão da rMP4 foi visualizada em um western-blot sondado com anticorpo anti-cauda de hisitidina revelando uma reação positiva de 55 kDa. A solubilização da rMP4 foi obtida em 8M de ureia (Figura 2).

Análise da transcrição relativa do gene da MP4: Os níveis de transcrição relativa da MP4 foram mensurados por qPCR utilizando-se primers para os genes da MP4 e 40S ribossomal. O software REST (Pfaffl *et al.*, 2002) foi utilizado para a análise dos dados. A transcrição relativa foi avaliada em larvas de diferentes dias após a eclosão dos ovos (Figura 3) e em glândula salivar de partenógenas e teleógenas (Figura 4).

Resultados

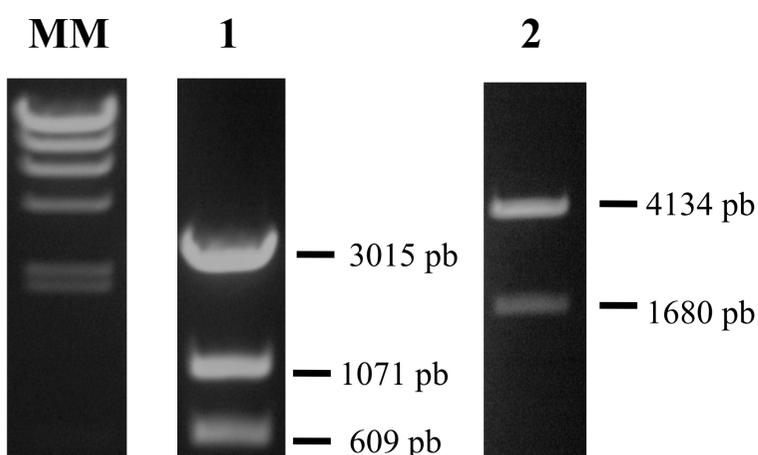


Figura 1: Plasmídeos hidrolisados submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%. MM – Marcador de massa molecular λ HIND III; 1, pGEM-T-MP4 hidrolisado com *EcoR* I; 2, pET5a-MP4 hidrolisado com *BamH* I e *Nhe* I.

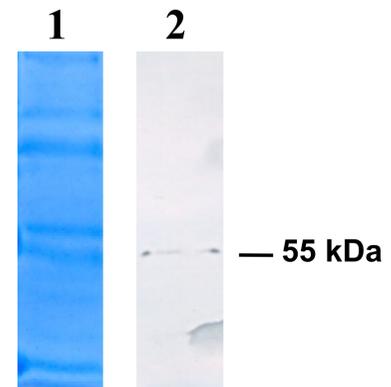


Figura 2: Solubilização da rMP4 obtida em sistema procarioto. 1, Perfil de expressão proteica na linhagem de *E. Coli* BL21(DE3)RIL em SDS-PAGE 10% corado com Comassie blue. 2, Western-blot da solubilização da rMP4 em 8M de ureia.

Transcrição relativa do gene da MP4 em larvas

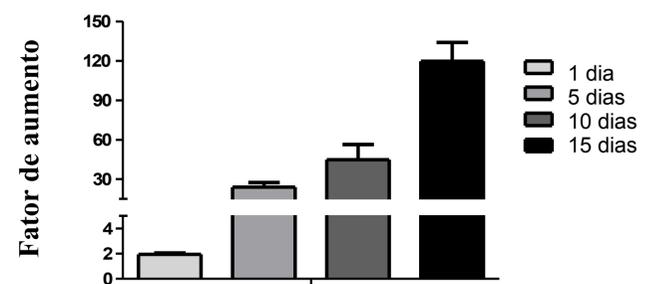


Figura 3: Transcrição relativa do gene da MP4 em larvas de diferentes dias após a eclosão.

Transcrição relativa do gene da MP4 em glândula salivar

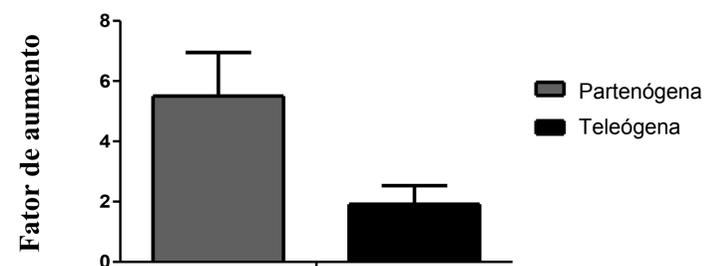


Figura 4: Transcrição relativa do gene da MP4 em glândula salivar de partenógenas e teleógenas.

Discussão e Perspectivas

A ORF da MP4 foi clonada e a proteína recombinante expressa como corpúsculo de inclusão em sistema procarioto. A proteína foi solubilizada e será purificada em coluna de afinidade por níquel.

Uma metaloprotease recombinante de *Haemaphysalis longicornis* homóloga a MP4 foi utilizada em um experimento de imunização mostrando uma proteção do hospedeiro contra a infestação pelo parasita (Imamura *et al.*, 2009), sugerindo que a MP4 é um antígeno imunoprotetor em potencial.

Primers para a realização de silenciamento gênico *in vivo* pela técnica de RNA de interferência foram projetados. Esse experimento possibilitará uma melhor elucidação da função da MP4 no metabolismo do parasita.

Referências bibliográficas:

IMAMURA, S., Da SILVA VAZ I. Jr., KONNAI, S., YAMADA, S., NAKAJIMA, C., ONUMA, M., OHASHI, K. Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from *Haemaphysalis longicornis*. *Experimental and applied acarology*. 2009. 48(4):345-58.

PFÄFFL, W.M., HORGAN, W. G., DEMPLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 2002. (30):1-10.

TRINDADE LEAL, A., REIS JOAQUIM DE FREITAS, D., DA SILVA VAZ, I.JR. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2003. (31):01-11.

