

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DA rVTDC DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: UMA
PEPTIDASE ANTIMICROBIANA**

Daiane Patrícia Oldiges

Porto Alegre, outubro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DA rVTDCE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: UMA
PEPTIDASE ANTIMICROBIANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da UFRGS como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Daiane Patrícia Oldiges

Orientador: Dr. Carlos Termignoni

Coorientador: Itabajara da Silva Vaz

Porto Alegre, outubro de 2012

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Instituição:

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal e no Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.

Fontes Financiadoras:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Brasil.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brasil.

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Entomologia Molecular (INCT-EM), Brasil.

"O acaso só favorece a mente preparada"

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Celso e Cleone, pelo incentivo, orientação e exemplo de vida;

Ao meu irmão, Thiago, pela alegria que me transmite;

Ao Bruno, por seu apoio, paciência, carinho e compreensão... Dividir a vida contigo é o meu maior presente;

Ao professor Carlos Termignoni, por acreditar na minha capacidade;

Ao professor Itabajara Vaz, pelos incansáveis e valiosos ensinamentos;

Aos professores Aoi Masuda, Alexandre Macedo e Adriana Seixas pelas discussões enriquecedoras;

Aos colegas do laboratório 205 e 217 Melina, Paula, Mariana, Aline, Ana Carolina, Luis Fernando, Lucas, Tadeu, Giana, Abid, Juliana, Karine, Dani Trentin, Lucas, Janine e Sharon;

À Franciele Kipper e Isabela Bandeira pela amizade e companheirismo;

À minha família emprestada: Maria Aparecida, Thiago e Maria Helena;

À Anita Marcella por todos os ronrons;

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e científico;

Muito obrigada!

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	5
LISTA DE ABREVIATURA.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	14
1.2 Vitelogênese.....	16
1.3 Enzimas envolvidas na vitelogênese do <i>R. microplus</i>	18
1.3.1 BYC	19
1.3.2 THAP	20
1.3.3 RmLCE / BmCl1	21
1.4 A Proteína VTDCE.....	22
1.4.1 Função biológica.....	22
1.4.2 Características da VTDCE.....	23
1.5 Resposta imune em carrapatos.....	25
1.6 Vacinas para o controle do carrapato.....	27
2 OBJETIVOS.....	30
3 METODOLOGIA E RESULTADOS.....	30
4 DISCUSSÃO	44
5 CONCLUSÃO	49
6 REFERÊNCIAS	51
7 APÊNDICE	58

LISTA DE ABREVIATURAS

BmCL1	<i>Boophilus microplus</i> cathepsin L-like
BYC	Boophilus Yolk Pró-Catepsin
DNA	ácido desoxirribonucléico
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
E-64	N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine4-guanidinobutylamide
HeLp	Hemelipoproteína
IgM	imunoglobulina M
N-cbz-Phe-Arg-MCA	Z-L-Phenylalanyl-L-Arginine-7-Amido-4-Methylcoumarin Hydrochloride
ORF	fase de leitura aberta
RNA	ácido ribonucleico
RmLCE	<i>Rhipicephalus microplus</i> larvae Cysteine-endopeptidase
rVTDCE	Vitellin Degrading Cysteine-Endopeptidase recombinante
THAP	Tick Heme Binding Aspartic Proteinase
Trx	Tioredoxina
VG	Vitelogenina

VT

Vitelina

VTDCE

Vitellin Degrading Cysteine-Endopeptidase

RESUMO

O carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, é um artrópode hematófago, responsável por importantes perdas na pecuária. Durante o desenvolvimento do embrionário do carrapato a cisteíno endopeptidase degradadora de vitelina (VTDCE) participa do processo de hidrólise de vitelina (Vt), a principal fonte de energia e aminoácidos durante esse período. Devido à sua importância na fisiologia do parasita, a VTDCE é um alvo potencial para o desenvolvimento de vacinas anti-carrapatos. Estudos anteriores demonstraram que a VTDCE nativa, purificada de ovos confere proteção contra *R. microplus*, desencadeada pela resposta imune dos bovinos após a administração deste antígeno. Entretanto, o extenso e dispendioso processo de purificação desta proteína, acrescido do baixo rendimento e fonte escassa de material (ovos de carrapato) inviabiliza a utilização da proteína nativa para fins comerciais. Tais dificuldades podem ser ultrapassadas por meio do uso de uma proteína recombinante. O presente trabalho tem por objetivo a expressão, purificação e caracterização da VTDCE recombinante (rVTDC). Parte da sequência de aminoácidos da VTDCE nativa foi obtida por sequenciamento de edman e pela análise por espectrometria de massas de peptídeos obtidos pelo tratamento da proteína com tripsina e. As sequências obtidas assim obtidas foram utilizadas para buscar a sequência da ORF da VTDCE em um banco de cDNA. Por meio de PCR, a ORF da enzima foi clonada em vetor de clonagem e posteriormente de expressão. A rVTDC expressa em *Escherichia coli* foi purificada por cromatografia de afinidade e utilizada para determinar algumas de suas propriedades, como atividade enzimática e antimicrobiana. A atividade enzimática foi avaliada através de ensaios fluorimétricos, onde a rVTDC

mostrou características similares à VTDCE nativa. Ensaio antimicrobianos foram realizados para avaliar a possível atividade sugerida após análise da sequência da ORF da VTDCE. A análise molecular mostrou que a sequência da VTDCE apresenta semelhança com peptídeos antimicrobianos, fato comprovado através de ensaios antimicrobianos. Efetivamente, a VTDCE apresentou atividade antimicrobiana tanto na sua forma nativa como na forma desnaturada desprovida de atividade peptidásica, demonstrando que ambas as atividades são independentes. Foram feitos também ensaios imunológicos, onde anticorpos policlonais anti-rVTDCE foram produzidos em coelhos e bovinos. Por Western blot foi observado que os anticorpos policlonais produzidos contra VTDCE recombinante reconheceram a VTDCE nativa, e o inverso também, indicando que a forma recombinante pode ser utilizada para experimentos de vacinação.

ABSTRACT

The cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a hematophagous arthropod, responsible for significant losses in livestock. During the tick embryo the vitellin-degrading cysteine endopeptidase (VTDCE) participates in the vitellin (Vt) hydrolysis, the main energy source and amino acids during this period. Due to the importance of this enzyme in parasite physiology the VTDCE is a potential target for development of anti-tick vaccine. In previous studies, the immunization with native VTDCE, purified from tick egg, conferred protection against *R. microplus*. However, the extensive and expensive purification process, plus the low achievement precludes the use of the native protein for commercial purposes. This difficulty can be overcome by the expression of a recombinant protein in heterologous organism. This work aims the expression, purification and characterization of recombinant VTDCE (rVTDCE). Part of the native VTDCE amino acid sequence was determined by Edman sequencing. Native protein was also trypsinized and peptides sequenced by mass spectrometry. The sequences obtained from mass spectrometry and Edman sequencing were used to search the ORF sequence of VTDCE in a tick cDNA library. Through PCR enzyme ORF was cloned into a cloning vector and further into an expression vector. The rVTDCE expressed in *Escherichia coli* was purified by affinity chromatography and used to determine some of its properties such as antimicrobial and enzyme activity. The enzymatic activity was measured using fluorimetric assays, where rVTDCE had similar characteristics to VTDCE. Antimicrobial assays were performed to evaluate the possible activity suggested after sequence analysis. Molecular analysis showed that the sequence of VTDCE shows similarity with antimicrobial peptides, which was proven through antimicrobial assays.

Effectively, the VTDCE presented antimicrobial activity even when the protein didn't present enzymatic activity, demonstrating that both activities are independent. Immunological assays were also performed. Polyclonal anti-rVTDCE serum were produced in rabbits and cattle. Western blot showed that the polyclonal antibodies raised against recombinant VTDCE recognized the native form, indicating that the recombinant form may be used for vaccination experiments.

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos formam um grupo de artrópodes hematófagos obrigatórios, não permanentes, que se alimentam em uma grande diversidade de hospedeiros (mamíferos, aves, répteis e anfíbios, entre outros) (ANDERSON et al., 2008), encontrados em todos os continentes (ANDERSON 2002). Carrapatos pertencem à classe Arachnida, ordem acari, que é dividida em 3 famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (BARKER et al., 2004).

Entre as principais características morfológicas destacam-se: presença de 4 pares de patas (quando ninfas ou adultos), ausência de antenas e asas, presença de hipostomo (órgão recurvado contendo as peças bucais e também com a função de ancorar o carrapato ao hospedeiro) e de um órgão sensorial no primeiro par de patas, o órgão de Haller (GOODMAN et al., 2005).

Os carrapatos são vetores da maior variedade de patógenos a animais domésticos do que qualquer outro grupo de artrópodes, sendo que em relação a humanos os carrapatos perdem esta posição apenas para os mosquitos (SONENSHINE 1991). As doenças transmitidas por carrapatos aos animais domésticos são uma restrição importante para a produção animal (SONENSHINE 1991; JONGEJAN et al., 2004), de forma que são necessários estudos para o desenvolvimento de técnicas de controle mais eficientes.

No Brasil a espécie economicamente mais significativa é o carrapato-do-boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, responsável por grandes perdas econômicas na pecuária bovina (AMARAL et al., 2011). O prejuízo gerado decorre da redução na produção de leite e carne (devido à expolição sanguínea e consequente redução de peso dos animais parasitados) (JONSSON 2006); danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato; e transmissão de doenças, como a tristeza parasitária

bovina (causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela bactéria do gênero *Anaplasma*) (JONSSON et al., 2001; JONGEJAN et al., 2004; ANDREOTTI 2010; SUAREZ et al., 2011). Além disso, não é possível desvincular os gastos indiretos gerados pela tentativa de controle destes parasitos, que envolvem os gastos com acaricidas, mão de obra, equipamento e estrutura necessários para a aplicação deste tipo de produto (JONSSON 2006). Devido à sua importância, a biologia e fisiologia dos carrapatos necessita ser melhor descrita para subsidiar estudos relativos ao desenvolvimento de novos métodos para seu controle.

1.1 O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

R. microplus tem o bovino como principal hospedeiro, mas também parasita búfalos, cervídeos, e em frequência ainda menor pode ser encontrado em equinos, caprinos, ovinos, asininos, suínos e cães (OIE 2007). Pertencente à família Ixodidea (BARKER et al., 2004), o *R. Microplus* é originário do sudeste da Ásia (JONGEJAN et al., 2004) e está distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do globo (situadas entre os paralelos 32° N e 35° S), que incluem importantes regiões produtoras de carne bovina e leite, como por exemplo a América Latina (ESTRADA-PENA et al., 2006).

A maior parte dos ixodídeos, chamados de carrapatos duros, apresenta um ciclo de vida que necessita a passagem por três diferentes hospedeiros, ou seja, cada estágio (larva, ninfa e adulto) se alimenta em um hospedeiro, faz a muda e na próxima fase se alimenta em outro hospedeiro, que pode ser da mesma ou de outra espécie (OIE 2007). O *R. microplus*, por sua vez, é monóxeno (o ciclo se passa em um único hospedeiro) (BARKER et al., 2004) e tem o ciclo dividido em dois grandes períodos: um de vida livre e outro de

vida parasitária (Figura 1). A fase de vida parasitária tem duração de aproximadamente 21 dias, período em que ocorre a muda da larva para ninfa e então para adulto, onde ocorre o dimorfismo sexual, alimentação, cópula e desprendimento da fêmea totalmente ingurgitada pronta para a oviposição (GONZALES, 1974). Fêmeas adultas recebem diferentes nomes de acordo com a ingesta de sangue realizada, recebendo a denominação de partenógena ou teleógena. Partenógena refere-se à fêmea parcialmente ingurgitada, que não terminou o repasto sanguíneo, e teleógena refere-se à fêmea totalmente ingurgitada. A fase de vida livre inicia-se quando a teleógena cai ao solo e em 3 dias inicia a postura que dura em torno de 17 dias (GONZALES, 1974; BENITEZ et al, 2012). Cerca de 7 dias após o término da postura (em condições ideais, com temperatura de 28 °C e umidade de 70%) (GONZALES, 1995) as larvas eclodem e migram para o ápice de vegetações rasteiras em busca de um hospedeiro. Ao encontrar o animal a ser parasitado a fase de vida livre se encerra e inicia-se a fase de vida parasitária.

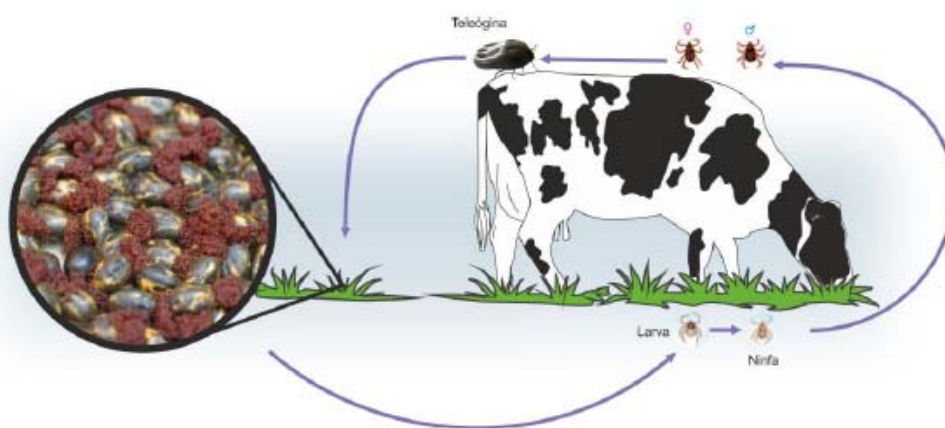


Figura 1. Ciclo de vida do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A foto em destaque representa teleógenas após a queda, durante a oviposição. Retirado de DA SILVA VAZ et al., 2012.

A infestação dos rebanhos por este carrapato acarreta grandes perdas econômicas à pecuária, representando um dos maiores fatores na queda de produtividade neste tipo de produção (JONSSON, 2006). Convencionalmente o controle deste parasito é realizado através da utilização de acaricidas químicos, substâncias com potencial de deixar resíduos na carne e no leite, trazendo riscos aos indivíduos que venham a ingeri-los, bem como o risco de contaminação do solo e de águas (GEORGE et al., 2004). Além destes prejuízos, o uso contínuo de acaricidas leva à seleção de populações de carrapatos resistentes (DUCORNEZ et al., 2005). Assim, cada vez mais se intensifica a busca de novas formas de controle, como o controle biológico, através de agentes microbianos, em especial os fungos (FERNANDES et al., 2012) e o controle imunológico, por meio de vacinas (DE LA FUENTE et al., 2007; MARITZ-OLIVIER et al., 2012; PARIZI et al., 2012). Nesta busca, o conhecimento da fisiologia deste parasito e o conhecimento de moléculas chaves para seu desenvolvimento é bastante importante para o desenvolvimento de novas alternativas de controle.

1.2 Vitelogênese

Como apresentado anteriormente, o *R. microplus* passa por uma fase de vida livre, na qual a nutrição ocorre pela utilização de proteínas de reserva, e não pelo repasto sanguíneo no hospedeiro (CHINZEI et al., 1985; ESTRELA et al., 2007; ESTRELA et al., 2010). Durante a oogênese, proteínas, lipídios, carboidratos e outros componentes são estocados, de forma que os ovos maduros contêm todas as fontes necessárias para o desenvolvimento do embrião (SAPPINGTON et al., 1998; BRIEGEL et al., 2003). Os carrapatos, assim como as outras espécies ovíparas, provêm ao embrião uma proteína de

reserva denominada Vitelina (VT), que será utilizada tanto durante a fase embrionária quanto durante a fase larval, enquanto não houver acesso a uma fonte de nutrientes externa (ESTRELA et al., 2007; ESTRELA et al., 2010; LAINO et al., 2011). A vitelogenina (VG), é o precursor da VT (GUDDERRA et al., 2002), é sintetizada fora do ovário (no intestino e corpo gorduroso), secretada na hemolinfa e captada pelos ovários (KHALIL et al., 2011). A VG circulante na hemolinfa é captada pelos oócitos e processada em VT (RAIKHEL & DHADIALLA, 1992).

Assim como em insetos, as VT de carrapatos representam de 80 a 90% da proteína total presente nos grânulos de vitelo (ROSELL et al., 1991). Entretanto, as VT de carrapatos apresentam uma característica bastante peculiar: a presença heme em sua estrutura. Essa molécula de heme é proveniente da digestão do sangue do hospedeiro e é ela que dá à VT sua cor marrom escura, que pode ser visualizada nos ovos (ROSELL et al., 1991) (Figura 1). A capacidade de ligação ao heme, presente na VT de carrapatos, é de suma importância para este parasito, uma vez que estes são incapazes de sintetizar o próprio heme, se utilizando então daquele obtido através da dieta hematofágica (BRAZ et al., 1999) .

Apesar do heme ser uma molécula essencial para a vida de organismos aeróbios, sua presença na forma livre catalisa uma série de reações prejudiciais ao organismo, como dano ao DNA via espécies reativas de oxigênio e oxidação de proteínas (KUMAR et al., 2005). Como um terço da VT dos ovos é consumida durante a embriogênese (LOGULLO et al., 2002) o *R. microplus* se utiliza de uma artimanha biológica: o heme liberado pela hidrólise de VT se liga às VT que ainda não tenham sido utilizadas (LOGULLO et al., 2002). Além da própria vitelina, a função de reciclagem e transporte do heme no carrapato *R. microplus* é realizada pela hemelipoproteína (HeLp) (MAYA-MONTEIRO et al., 2000).

Apesar de sua alta concentração na hemolinfa a HeLp não foi localizada em ovos (MAYA-MONTEIRO et al., 2000).

Após a oviposição e até o momento da eclosão, em *R. microplus*, ocorrem dois picos de degradação de vitelina: o primeiro ocorre nos primeiros dias e o segundo no décimo quinto dia. Além disso, no momento da eclosão cerca de 40% da vitelina presente nos ovos foi utilizada pelo embrião (LOGULLO et al., 2002). Isso mostra o grau de controle da hidrólise de VT pelas enzimas. O controle da degradação de Vt é realizado por dois fatores: pH e latência enzimática (SEIXAS et al., 2010), onde a alteração de pH seria capaz de ativar as enzimas de interesse no momento adequado. Durante o desenvolvimento do embrião, mais especificamente após a fertilização (ABREU et al., 2004), ocorre uma acidificação regulada dos grânulos de vitelo, essa acidificação leva à ativação de proteases armazenadas no ovo e conseqüente consumo de VT (FAGOTTO 1991; SEIXAS et al., 2008; SEIXAS et al., 2012). Supõem-se também que adicionalmente à ativação por pH, parte do controle é feito por inibidores presentes no ovo (SEIXAS et al., 2010).

1.3 Enzimas envolvidas na vitelogênese do *R. microplus*

Até o momento foram descritas quatro enzimas com atividade de degradar VT: VTDC (Vitellin Degrading Cysteine-Endopeptidase) (SEIXAS et al., 2003); BYC (Boophilus Yolk Pró-Catepsin) (LOGULLO et al., 1998); THAP (Tick Heme Binding Aspartic Proteinase) (SORGINE et al., 2000); RmLCE (*Rhipicephalus microplus* larvae Cysteine-endopeptidase) (ESTRELA et al., 2007). As três primeiras estão envolvidas na degradação da VT no ovo e a outra em larva.

1.3.1 BYC

A proteína BYC é a mais abundante dentre as enzimas presentes em ovos de *R. microplus* (ABREU et al., 2004), representando cerca de 6% do conteúdo protéico dos ovos (NASCIMENTO-SILVA et al., 2008). A BYC é uma aspártico endopeptidase, sintetizada no intestino e no corpo gorduroso do carrapato, secretada na hemolinfa e endocitada pelos oocitos (LOGULLO et al., 1998). Sua ativação ocorre em meio ácido (pH 3,5) por auto-proteólise, onde a pró-enzima de 54 kDa passa à forma madura de 47 kDa (LOGULLO et al., 1998). Sua ativação em meio ácido é compatível com o fato de que proteases ácidas participam do processo de degradação de Vt após ativação por variação no pH (FAGOTTO 1990; FAGOTTO 1995; CECCHETTINI et al., 2002).

As aspártico endopeptidases apresentam em seu bolsão catalítico dois resíduos de ácido aspartico (Asp), que são os aminoácidos responsáveis pela ligação de moléculas de água e hidrolise da ligação peptídica (DAVIES, 1990). A estrutura da enzima BYC é considerada atípica em função da ausência do segundo resíduo de Asp (NASCIMENTO-SILVA et al., 2008). A ausência deste resíduo levaria à necessidade da formação de um dímero, e a interação entre essas duas moléculas possibilitaria a atividade catalítica (NASCIMENTO-SILVA et al., 2008), situação já descrita em outra aspártico endopeptidase (LAPATO et al., 1989). Entretanto, outra hipótese deve ser levantada pois a BYC atua como monômero (NASCIMENTO-SILVA et al., 2008).

Com relação à sua atividade proteolítica, quando testados os substratos protéicos caseína, albumina sérica bovina, hemoglobina e vitelina observou-se que a BYC é

altamente específica para degradação de vitelina, sendo que sequer reconhece os dois primeiros substratos (ABREU et al., 2004). Outra característica importante desta enzima é que níveis significativos de atividade enzimática só são detectados após longos períodos de incubação com uma razão molar de enzima/substrato próxima a 1:1, indicando uma baixa atividade catalítica (NASCIMENTO-SILVA et al., 2008). A ausência do segundo resíduo de ácido aspártico, descrita anteriormente, pode ser a responsável pela baixa atividade catalítica da enzima (NASCIMENTO-SILVA et al., 2008). O fato de haver uma enzima com alta afinidade, mas baixa atividade catalítica pode ser uma estratégia desenvolvida por *R. microplus* para evitar o consumo da proteína de reserva de forma muito rápida (NASCIMENTO-SILVA et al., 2008).

Recentemente foi demonstrada a presença da BYC em larvas de *R. microplus*, onde além da função na digestão de VT sugere-se que esta enzima tenha uma atuação também na hidrólise de hemoglobina (ESTRELA et al., 2010).

1.3.2 THAP

A THAP também é uma aspártico endopeptidase presente em ovos de *R. microplus* (SORGINE et al., 2000). Esta enzima é capaz de ligar heme, e a própria concentração do heme é utilizada como um mecanismo de regulação da hidrólise de seu substrato, a VT (SORGINE et al., 2000). O mecanismo de regulação ocorre de forma que elevadas concentrações de heme livre inibem a atividade proteolítica da enzima (SORGINE et al., 2000), protegendo assim a célula da citotoxicidade do heme livre. Outra característica desta

enzima é o fato de os sítios de ligação a heme e hidrólise serem distintos (SORGINE et al., 2000).

Pohl et al. (2008) mostrou que a THAP é transcrita em diversos tecidos: corpo gorduroso de partenóginas e teleóginas, intestino e ovário de teleógina. Entretanto, essa enzima é acumulada apenas em ovário de teleóginas, sugerindo que após traduzida ela é secretada na hemolinfa e então endocitada pelos oócitos.

1.3.3 RmLCE / BmCL1

VT é a principal proteína digerida para nutrição deste artrópode durante o período que antecede o repasto sanguíneo da larva (ESTRELA et al., 2010). Uma das enzimas responsáveis hidrólise de VT nesta fase é a cisteína endopeptidase larval de *Rhipicephalus microplus* (*Rhipicephalus microplus* larval cysteine endopeptidase - RmLCE) (ESTRELA et al., 2007). Essa cisteína endopeptidase presente em larvas apresenta um perfil de atividade que demonstra que ela é uma proteína distinta da VTDCE (ESTRELA et al., 2007), uma cisteína endopeptidase envolvida na degradação de VT durante a fase embrionária (SEIXAS et al., 2003). A RmLCE foi purificada a partir de extrato de larvas, e provavelmente seja sintetizada durante este estágio, participando na degradação de VT iniciada pelas proteases maternas (ESTRELA et al., 2007). Em 2000, Renard e colegas clonaram, a partir de uma biblioteca de cDNA de larvas de *R. microplus*, uma catepsina tipo L que foi denominada cathepsin-L-like cysteine endopeptidase (BmCL1). Após tripsinização e sequenciamento por espectrometria de massas da RmLCE foi demonstrado que BmCL1 e RmLCE são uma mesma enzima.

Estrela et al. (2010) demonstrou a existência de uma associação entre BYC e RmLCE e sugeriu a existência de uma cascata enzimática para a digestão de proteínas, durante a fase larval. Essa hipótese é apoiada pela elevação na capacidade de hidrólise da hemoglobina por parte da RmLCE quando esta enzima é previamente incubada com BYC

1.4 A proteína VTDCE

1.4.1 Função biológica

A VTDCE é o tema central do presente estudo, trata-se de uma enzima envolvida na degradação de vitelina durante a embriogênese do carrapato. Em condições experimentais, utilizando VT como substrato, a VTDCE mostrou ser a enzima mais eficiente na hidrólise deste substrato quando comparada com THAP e BYC (SEIXAS et al., 2008).

A VTDCE tem origem materna, com provável síntese extraovariana e transporte pela hemolinfa antes da internalização nos oócitos (SEIXAS et al., 2010). Ela está presente em tecidos maternos como ovário e intestino (SEIXAS et al., 2010). No intestino está localizada na lâmina basal e em células basofílicas, que apresentam função secretória. Nos ovários, localiza-se na membrana das células do pedicelo, estrutura responsável por fixar os oócitos ao ovário e que apresenta importante papel na transferência de proteínas da hemolinfa para os oócitos em desenvolvimento (SEIXAS et al., 2010). Desta forma, supõe-se que a VTDCE, assim como BYC, THAP e VT, seja produzida no intestino e transportada via hemolinfa até o ovário. Entretanto, os dados obtidos até o momento não

permitem excluir a possibilidade de a VTDCE também ser produzida no ovário (SEIXAS et al., 2010).

Durante toda a embriogênese a VTDCE é observada com dois perfis: um de baixa massa molecular, correspondendo à proteína livre, e um de alta massa molecular, correspondente à VTDCE associada às diversas subunidades de VT ou mesmo produtos da degradação parcial da VT (SEIXAS et al., 2003). Experimentos com marcação isotópica com iodo confirmam a associação VTDCE/VT (SEIXAS et al., 2010). E mais do que isso, mostram que essa associação ocorre mesmo em presença de leupeptina (inibidor de cisteíno endopeptidases), sugerindo que essa ligação ocorra por meio de um outro sítio que não o sítio catalítico. Apesar de estar ligada ao seu substrato, a VTDCE só passa a degradá-lo no momento adequado, já que é controlada pelo pH do meio e pela presença de inibidores (SEIXAS et al., 2010).

A VTDCE é uma enzima essencial para o desenvolvimento do carrapato, e existe um grande interesse em seu estudo, devido ao fato de se tratar de um possível alvo para a elaboração de vacinas contra o parasito (SEIXAS et al., 2008). Experimentos de vacinação com a VTDCE nativa demonstraram que esta proteína é imunogênica e confere proteção parcial aos bovinos quando estes são desafiados com larvas de *R. microplus* (SEIXAS et al., 2008).

1.4.2 Características da VTDCE

A obtenção desta enzima é realizada através de purificação de extrato de ovos de *R. microplus* de até 10 dias (SEIXAS et al., 2003). O protocolo compreende três tipos de

cromatografia e um processo de autólise em pH ácido, importante para dissociar a enzima da VT associada. Após uma etapa inicial de fracionamento de extrato de ovos por cromatografia de troca iônica é feita uma etapa de autólise. Durante a autólise, a VTDCCE é ativada pelo pH ácido e então hidrolisa a VT, os produtos de hidrólise parcial precipitam enquanto a VTDCCE permanece solúvel. Após essa acidificação, a VTDCCE não pode mais ser submetida a pH neutro, pois perde sua atividade. Desta forma as cromatografias posteriores de exclusão molecular (gel-filtração) e troca iônica são realizadas em pH ácido (pH 4 e 5 respectivamente) (SEIXAS et al., 2003). A enzima assim obtida tem atividade sobre substratos protéicos como vitelina, hemoglobina, albumina e gelatina (SEIXAS et al., 2003). Dentre todas as enzimas de ovo caracterizadas como degradadoras de VT em *R. microplus* (BYC e THAP) a VTDCCE mostrou-se a mais ativa (SEIXAS et al., 2008).

Com relação à sua classificação, a VTDCCE pertence ao grupo das hidrolases (enzimas que catalisam a hidrólise de uma ligação química – EC 3.-), mais especificamente uma peptidase (catalisa a hidrólise de ligações peptídicas – EC 3.4.-). Por ser responsável pela hidrólise de ligações que não se encontram nas extremidades amino ou carbóxi terminal dos substratos, a VTDCCE é considerada uma endopeptidase. A inibição total por E-64 (L-transepoxy succinyl-leucylamido-[4-guanidino]butane) e leupeptina a classifica como cisteíno endopeptidase (Enzima que apresenta uma cisteína no sítio catalítico – 3.4.22.-) (MATSUMOTO et al., 1999). As características desta enzima são sua preferência por resíduos hidrofóbicos em P₁ e P₂, a alta atividade sobre o substrato N-Cbz-Phe-Arg-MCA, inibição por E-64 e pH ótimo de 4,0 (SEIXAS et al., 2003). De acordo com o seu perfil de inibição e preferência de substratos a VTDCCE apresenta características similares à enzimas tipo catepsina L. Catepsinas L estão envolvidas em diversas funções biológicas como remodelamento tecidual, sistema imune, modulação e função celular (DICKINSON

2002). A caracterização da VTDCE foi realizada com base em resultados bioquímicos experimentais, antes de se conhecer a sequência de aminoácidos da enzima. A determinação e análise de sua sequência de aminoácidos são assunto do presente trabalho.

1.5 Resposta imune em carrapatos

O sistema imune de invertebrados, carrapatos incluídos, tem como grande característica a ausência de um sistema imune adaptativo, capaz de produzir anticorpos e induzir memória imunológica. A resposta imune inata dos artrópodes inclui reações celulares e humorais, como fagocitose, encapsulamento, melanização, coagulação (JIRAVANICHPAISAL et al., 2006) e síntese de peptídeos antimicrobianos (ZASLOFF 2002; BULET et al., 2005; RAVI et al., 2011), bem como a própria barreira física formada pela quitina do artrópode (VILMOS et al., 1998). Em carrapatos foi comprovada a existência de respostas celulares como a fagocitose (PEREIRA et al., 2001), nodulação (CERAUL et al., 2002) e encapsulamento (EGGENBERGER et al., 1990). A síntese de peptídeos antimicrobianos já foi descrita em diversas espécies (GUDDERRA et al., 2002; FOGACA et al., 2004; KOPACEK et al., 2010), entretanto os carrapatos aparentemente não apresentam um sistema de profenoloxidase (responsável pelo processo de melanização) e o processo de coagulação nestes artrópodes ainda não foi experimentalmente comprovada (KOPACEK et al., 2010). A ausência destes dois processos descritos no sistema de defesa de outros artrópodes sugere que peptídeos antimicrobianos possuam um papel ainda mais importante do que em outros artrópodes.

Peptídeos antimicrobianos são convencionalmente definidos como substâncias antimicrobianas polipeptídicas (codificadas por genes e sintetizadas por ribossomos) com menos de 100 resíduos de aminoácidos e que possuam atividade de matar microrganismos ou inibir seu crescimento ou ainda perturbar biofilmes por eles produzidos (GANZ 2003). Ao contrário da resposta imune adaptativa de vertebrados, na resposta inata em artrópodes há produção de um repertório fixo de peptídeos antimicrobianos que não são montados para um antígeno específico, como os anticorpos gerados por vertebrados (JIRAVANICHPAISAL et al., 2006; SCHMIDT et al., 2010). Apesar disso sugerir que a proteção desenvolvida por peptídeos seja menos eficiente do que a gerada por anticorpos (em função da reduzida gama de opções), peptídeos antimicrobianos podem agir sinergicamente e assim amplificar sua capacidade de proteção (BULET et al., 2005).

Em insetos, a grande maioria dos peptídeos antimicrobianos é sintetizada pelo corpo gorduroso e secretada na hemolinfa (GANZ 2003) onde exercem sua função de proteção. Esses peptídeos podem também ser armazenados em pequenos grânulos no interior dos hemócitos (células circulantes na hemolinfa) (LAVINE et al., 2002). Em carrapatos vários peptídeos antimicrobianos foram descritos (KOPACEK et al., 2010). Em *R. microplus* especificamente são conhecidos seis peptídeos antimicrobianos, incluindo a VTDCE (OLDIGES et al., 2012) descrita neste artigo: microplusina (FOGACA et al., 2004); defensina (FOGACA et al., 2004); ixodidina (FOGACA et al., 2006); e dois fragmentos de hemoglobina Hb 33–61 (FOGACA et al., 1999) Hb 98-114 (BELMONTE et al., 2012).

Peptídeos antimicrobianos possuem amplo espectro de atividade, e no caso da maioria deles, atuarem sobre membranas de microrganismos a capacidade de desenvolver resistência é bastante reduzida (MARSHALL et al., 2003; LI 2011). Em função destas duas

características peptídeos antimicrobianos são candidatos promissores para o desenvolvimento de novos agentes para o controle de microrganismos (LI 2011).

1.6 Vacinas para o controle do carrapato

Durante o repasto sanguíneo os carrapatos modulam a imunidade do hospedeiro (CARVALHO et al., 2010). A resposta imune montada pelo hospedeiro é formada por um repertório bastante grande, como células apresentadoras de antígenos, citocinas, linfócitos B e T, imunoglobulinas, granulócitos entre outros (WIKEL, 1996; BROSSARD et al., 2004). Essa resposta imunológica permite ao hospedeiro desenvolver certo grau de resistência imunológica ao carrapato no decorrer de vários processos de infestação (CRUZ et al., 2008). Essa resistência adquirida é responsável por uma redução na quantidade de parasitas fixados, e no peso das fêmeas que completam o processo de alimentação, pelo aumento de tempo necessário para alimentação do carrapato, bem como morte de muitos deles (WIKEL, 1996). Vários estudos foram feitos com o intuito de induzir essa resistência através de imunizações. Tentativas de desenvolvimento de uma vacina foram feitas tanto através da imunização com extratos de tecidos ou fases do carrapato (WILLADSEN, 2004) quanto com antígenos purificados (PARIZI et al., 2009). Os antígenos utilizados para imunização podem ser divididos em dois grandes grupos: antígenos expostos ou antígenos ocultos. O primeiro grupo se trata das moléculas que entram em contato com o sistema imune do hospedeiro, ou seja, estão expostos ao hospedeiro (NUTTALL et al., 2006), como por exemplo, proteínas secretadas na saliva durante a alimentação. O segundo grupo trata daquelas moléculas que estão ocultas ao sistema imune do hospedeiro (NUTTALL et al., 2006), mas que podem ser atingidas pelos componentes do sangue ingerido, como por

exemplo, proteínas da membrana de células do tubo digestório e também de moléculas envolvidas com o processo de desenvolvimento embrionário, como a VTDCE.

O conceito de antígeno oculto foi introduzido por Willadsen et al. (1988). Esse tipo de antígeno não apresenta a característica de naturalmente induzir uma resposta imune durante o parasitismo, como ocorre com um antígeno exposto. Entretanto, a ingestão de anticorpos produzidos após um procedimento de vacinação, pode levar a uma interação dos anticorpos e antígenos e conseqüentemente a uma interferência nas funções do antígeno de interesse. O exemplo clássico da eficiência da utilização de antígenos ocultos é o antígeno Bm86, utilizado nas duas vacinas lançadas no mercado contra o carrapato *R. microplus* GAVAC e TickGARD (DE LA FUENTE et al., 2007).

O uso vacinas anti-carrapatos foi iniciado em dois países no início dos anos 90: Cuba (GAVAC®) e Austrália (Tick-GARD®) (DE LA FUENTE et al., 2007). Ambas as vacinas utilizam como antígeno variantes da proteína recombinante Bm86, uma glicoproteína imunogênica presente nas células do tubo digestivo do carrapato, aparentemente envolvida na endocitose (RODRIGUEZ et al., 1995). Mesmo quando ocorre a utilização das vacinas é importante ressaltar que a aplicação dos acaricidas ainda é necessária: ambas as vacinas comerciais apenas reduzem a quantidade e periodicidade da utilização de acaricidas, ou seja, não eliminam a necessidade de sua aplicação concomitantemente (DE LA FUENTE et al., 2007). Além disso, por ser um antígeno oculto há a necessidade aplicação periódica da vacina uma vez que infestações sucessivas por carrapato não estimulam o sistema imune contra o antígeno presente na vacina.

As duas vacinas comerciais citadas anteriormente não são eficientes no Brasil, devido a diferenças na proteína Bm86 das populações de carrapato brasileiras, em relação às presentes na Austrália e em Cuba (GARCIA-GARCIA et al., 1999). Para a produção de

uma vacina economicamente viável e que seja eficiente no nosso país, é necessário identificar novas moléculas de importância fisiológica e com potencial imunoprotetor (DE LA FUENTE et al., 2006; SONENSHINE et al., 2006).

Por ser a busca por antígenos com potencial protetor um grande limitante para o desenvolvimento de novas vacinas, o estudo mais detalhado da fisiologia e da bioquímica da embriogênese se torna uma estratégia interessante. Duas das proteínas descritas na degradação de VT já foram testadas em ensaios pilotos como antígenos em uma vacina anti *R. microplus*: BYC e VTDCE. Imunização com as formas nativa e recombinante da BYC e forma nativa da VTDCE foram capazes de induzir uma resposta humoral, bem como proteção contra *R. microplus* (DA SILVA VAZ, JR. et al., 1998; LEAL et al., 2006; SEIXAS et al., 2008). Experimentos *in vitro* demonstraram que anticorpos anti-VTDCE são capazes de reduzir a atividade enzimática da VTDCE de forma dose-dependente (SEIXAS et al., 2008), como trabalhos anteriores demonstraram que parte dos anticorpos ingeridos durante o repasto sanguíneo são encontrados na hemolinfa (DA SILVA VAZ et al., 1996) a proteção induzida por esses antígenos pode uma consequência da interação dos anticorpos e as enzimas (SEIXAS et al., 2012).

Em ambas as vacinas comerciais citadas, o antígeno Bm86 não é obtido a partir da purificação do tecido (intestino), mas sim a partir da produção de sua forma recombinante em organismo heterólogo (DE LA FUENTE et al., 2007). A utilização de proteínas recombinantes na formulação de vacinas apresenta muitas vantagens, uma vez que não se torna necessária a presença do agente alvo da vacina, o que poderia ser um passo limitante na produção de grandes volumes de material (COX, 2012). No que concerne à VTDCE nativa, a obtenção deste material puro em grande quantidade também se mostra um passo limitante, tanto em função da dificuldade de obtenção de grandes quantidades de ovos de

carrapato quanto em função do extenso processo de purificação. Desta forma a produção da proteína na forma recombinante, expressa em *Escherichia coli*, é alternativa para impelir novos estudos sobre a molécula, além de possibilitar a sua utilização em experimentos de vacinação em uma grande quantidade de animais.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos a obtenção da vtde na forma recombinante, e elucidar as propriedades enzimática, imunológica e antimicrobiana da proteína recombinante obtida.

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

A metodologia utilizada e resultados obtidos estão descritos no artigo “A *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity” publicado em 2012 no periódico *International Journal for Parasitology*.

OLDIGES, D. P.; PARIZI, L. F.; ZIMMER, K. R.; LORENZINI, D. M.; SEIXAS, A.; MASUDA, A.; DA SILVA, V. I., JR. & TERMIGNONI, C. A *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity. *Int J Parasitol*, 42 (7): 635-645, 2012.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal for Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpara

A *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity

Daiane P. Oldiges^a, Luís F. Parizi^a, Karine R. Zimmer^a, Daniel M. Lorenzini^a, Adriana Seixas^{a,d}, Aoi Masuda^a, Itabajara da Silva Vaz Jr.^{a,c,*}, Carlos Termignoni^{a,b}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Porto Alegre 90035-000, RS, Brazil

^c Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre 91540-000, RS, Brazil

^d Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, R. Sarmento Leite, 245, Porto Alegre 90050-170, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 January 2012

Received in revised form 8 April 2012

Accepted 9 April 2012

Available online 11 May 2012

Keywords:

Tick

Antimicrobial peptide

Cysteine endopeptidase

ABSTRACT

The cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, is a haematophagous arthropod responsible for considerable losses in the livestock industry. Immunological control with vaccines is a promising alternative to replace chemical acaricides. Due to their importance in parasite physiology, cysteine endopeptidases are potential targets. In a previous study, native Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase (VTDC) was successfully tested as a vaccine antigen for bovines against *R. microplus*. In this work, nucleotide and amino acid VTDC sequences were obtained from cDNA databanks, based on data from Edman sequencing and mass spectrometry. Subsequently, cloning and expression, purification, immunological and biochemical characterisation of the recombinant protein were performed to determine the biological importance of VTDC. By Western blot, polyclonal antibodies produced against recombinant VTDC recognised native VTDC. Interestingly, molecular analysis showed that the VTDC sequence has similarity to antimicrobial peptides. Indeed, experimental results revealed that VTDC has an antimicrobial activity which is independent of endopeptidase activity. We believe that this is the first known study to show that an arthropod enzyme has antimicrobial activity.

© 2012 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In oviparous species, cysteine and aspartic endopeptidases have been consistently associated with the yolk degradation process (Yamamoto and Takahashi, 1993; Cho et al., 1999; Bergamo et al., 2010). The formation of yolk within the ovary requires the uptake of yolk precursor proteins from the hemolymph. Among these proteins, the most prevalent is vitellogenin, which is produced in the fat body (Hagedoom and Kunkel, 1979; Fagotto, 1990, 1991; Canal et al., 1995; Seixas et al., 2010b). In the egg, vitellins (VTs) are proteins of large molecular mass composed of various subunits (Canal et al., 1995), and those are used in embryo protein synthesis. In *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, three enzymes involved in VT degradation were described: (i) *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin (BYC, an aspartic endopeptidase) (Logullo et al., 1998), (ii) Tick Haeme-binding Aspartic Protease (THAP) (Sorgine et al., 2000; Pohl et al., 2008), both aspartic peptidases, and (iii) Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase (VTDC), a

cathepsin-L like enzyme (Seixas et al., 2003). Similarly to BYC and THAP, VTDC appears to be produced in the gut, transported through hemolymph, taken up by growing oocytes and stored into yolk granules where it is subsequently activated by acidification (Seixas et al., 2010a). In *R. microplus* eggs, VTDC was shown to be the most active of these three enzymes in VT degradation, since it has the highest VT-hydrolysing activity (Seixas et al., 2008). This reinforces the hypothesis that VTDC plays a pivotal role in yolk protein digestion.

In parasites, besides a digestive function, cysteine endopeptidases are involved in other physiological processes such as host invasion (Na et al., 2006), immune-evasion (Sajid and McKerrow, 2002), and moulting and metamorphosis (Lustigman et al., 1996). Also, insect endopeptidases have been implicated in the immune response against pathogens (Pedra et al., 2003; Tua and Lai, 2006).

Despite lacking an adaptive immune response, arthropods, including ticks, have developed distinct defence mechanisms against attack by pathogens (Taylor, 2006). Antimicrobial peptides are important components in the innate immune system of these invertebrates. Indeed, several molecules with antimicrobial activity have been characterised in different tick species. A defensin present in the hemolymph of *Dermacentor variabilis* is active against *Borrelia burgdorferi*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and

* Corresponding author at: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33086078; fax: +55 51 33087309.

E-mail addresses: itacbt@gmail.com, itabajara.vaz@ufrgs.br (I. da Silva Vaz Jr.).

Staphylococcus aureus (Johns et al., 1998, 2001). *Ornithodoros moubata* has a lysozyme (Kopacek et al., 1999), a peptide (Van der Goes van Naters-Yasui et al., 2000) and a haemoglobin fragment (Nakajima et al., 2003) with antimicrobial activity. Arrieta et al. (2006) showed that the egg wax of *Amblyomma hebraeum* contains an antimicrobial substance that is active against Gram-positive bacteria. Kuhn et al. (1996) detected a lectin that recognises foreign substances and pathogens in various tissues of *Ixodes ricinus*. The *R. microplus* female has a steroidal molecule with antifungal and antibacterial action (boophilin) (Potterat et al., 1997). It is the first sterol sulphate described in an acarine (Potterat et al., 1997). Also, a bovine hemoglobin fragment which inhibits growth of Gram-positive bacteria and fungi was found in female *R. microplus* hemolymph and gut (Fogaça et al., 1999). Additionally, an antimicrobial peptide (microplusin) is present in *R. microplus* eggs (Fogaça et al., 2004), and a defensin is present in hemocytes (Fogaça et al., 2004).

Appropriate and effective tick control strategies are increasingly important in a scenario where these arthropods represent major economic and public health problems (Jongejan and Uilenberg, 2004; Parizi et al., 2009; Patarroyo et al., 2009). Nowadays, tick control is based almost exclusively on chemical acaricides (Mulenga et al., 2000). However, the massive and indiscriminate use of these products has led to the selection of parasite populations resistant to the main drug groups available. Moreover, multi-acaricide resistance is increasingly observed (Martins and Furlong, 2001; Castro-Janer et al., 2010; Pohl et al., 2011). This situation impels efforts towards the search for potentially immune-protective antigens that may be effectively used in vaccine development. Several native and recombinant purified proteins have been tested as antigens for a tick vaccine (Sonenshine et al., 2006; Parizi et al., 2009; Almazán et al., 2012). Nevertheless, until now all vaccine candidates have shown variable efficacy in controlling this parasite (Willadsen, 2006; Merino et al., 2011). Therefore, the development of an effective vaccine inducing a satisfactory protection against tick infestations is still a challenge (de la Fuente et al., 1998; Frisch, 1999; Almazán et al., 2005; Seixas et al., in press).

The potential of VTDC as a useful antigen for a tick vaccine was assumed based on the hypothesis that impairing the *R. microplus* reproduction process is a suitable strategy for tick control, taking into account the importance of cysteine endopeptidases in embryo nourishment. In fact, cattle inoculated with purified native VTDC develop an immune response that induces partial protection against *R. microplus* infestation (Seixas et al., 2008). The fastidious purification method and the poor yield of native VTDC obtained from tick eggs make large scale production of native protein unfeasible. Expression of a recombinant protein in a suitable organism overcomes this drawback.

In this study we describe the cloning, expression, enzymatic and immunological properties of a recombinant VTDC (rVTDC) produced in *E. coli*. Moreover, antimicrobial activity is described for VTDC, which is not a function of its peptidase activity. To date only one protease with antimicrobial activity has been described (Bangalore et al., 1990).

2. Material and methods

2.1. Ticks

Rhipicephalus microplus females and eggs (Porto Alegre strain) were maintained in an incubator at 28 °C and 85% relative humidity, and their parasitic life was completed on calves, housed in arthropod-insulated individual pens on slatted floors. Partially engorged female ticks (approximately 50 mg) were manually removed from cattle 20/21 days after the beginning of infestation

and fully engorged female ticks were obtained after detachment from the host. New Zealand White rabbits and Hereford steers were housed at the Faculdade de Veterinária of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. The experiments were approved and conducted following the guidelines of the Ethics Committee on Animal Experimentation of the same university.

2.2. Protein sequencing

VTDC was purified as previously described (Seixas et al., 2003). Briefly, 10-day-old egg homogenate was applied in a Hitrap Q HP (GE Healthcare, Sweden) column equilibrated with 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, and eluted with a 0–0.8 M NaCl gradient in the same buffer. Fractions containing VTDC, identified by enzymatic activity, were concentrated in a Centricon-10 filter and applied in a 1.0 cm × 30 cm Superdex 75 HR (GE Healthcare) column equilibrated with 10 mM acetate buffer, pH 4.0, using a Fast-Purification-Liquid Chromatography system (FPLC, Pharmacia, Sweden). The pool of active fractions was then applied in a Mono QHR 5/5 column, equilibrated with acetate buffer (10 mM, pH 4.0). The enzyme was eluted with a 0–0.8 M NaCl gradient in the same buffer.

For amino (N)-terminal sequence determination, a pure VTDC (100 µg) preparation was resolved by 14% SDS-PAGE. After electrophoresis, VTDC was transferred from the gel to a polyvinylidene difluoride membrane. After washing with pure water for 5 min, the membrane was stained with Coomassie Blue G250 and after 5 min the polypeptide bands were destained with 50% methanol and 10% acetic acid. The protein band was excised, washed with pure water for 5 min and subjected to N-terminal protein sequencing by automatic Edman degradation using a liquid phase sequencer (Protein Sequencer PPSQ-23A, Shimadzu, Japan).

Alternatively, VTDC internal peptides generated by in-solution trypsin digestion were identified by mass spectrometry. Purified VTDC (50 µg) was suspended in 400 mM NH₄HCO₃ containing 8 M urea and 50 mM DTT. After incubation at 50 °C for 15 min, the cysteine residues were alkylated through the addition of 100 mM iodoacetamide and incubated for 15 min at room temperature in the dark, and the volume was adjusted to a final urea concentration of 1 M. Sequencing-grade trypsin (Promega, USA) was added to the mixture at a ratio (enzyme to protein) of 1:50 and incubated overnight at 37 °C. The resulting VTDC peptides were purified in home-made reverse-phase columns using Poros R2 50 resin (Applied Biosystems, USA) as described by Jurado et al. (2007).

For MS/MS analyses, peptides were resuspended in 0.05% formic acid and separated in a C18 capillary column (15 cm × 75 µm, Symmetric C18, Waters, USA) at a flow rate of 200 nl min⁻¹, with a linear gradient from 5% to 40% mobile phase B within 66 min. Mobile phase A was 0.05% formic acid in 5% acetonitrile (ACN), and mobile phase B was 0.05% formic acid in 80% ACN. Eluted peptides were analysed online with an ESI-Q-TOF mass spectrometer (Q-TOF Micro, Micromass, Waters), equipped with a nanoflow ion source. The instrument settings were 3 kV for the spray voltage, 100 V for the cone voltage, 100 °C for the source temperature and cone gas at 30 L h⁻¹. Spectra were collected in the positive-ion mode.

The fragmentation spectra were analysed using the MASCOT 2.1 search engine (Perkins et al., 1999) against the sequence database The Institute for Genome Research (TIGR) *B. microplus* Gene Index (Guerrero et al., 2005).

2.3. Nucleotide sequence and phylogenetic analysis

VTDC cDNA was cloned from *R. microplus* (Porto Alegre strain) with primers based on the sequence present in *Boophilus microplus*

Gene Index (BmiGI) (Wang et al., 2007). Other organism nucleotide sequences were obtained by a BLAST search in GenBank. For analyses, the following sequences were used: *Ornithodoros coriaceus* EU574828.1, EU574829.1, EU574830.1, EU574878.1; *Ornithodoros parkeri* EF633907.1; *Argas monolakensis* DQ886782.1; *Boophilus microplus* AY233212.1, JQ080269; *A. hebraeum* AY437139.1; *Ixodes scapularis* XM002410111.1, XM002410419.1, XM002400045.1, XM002401038.1, XM002433832.1, XM002401039.1, XM002401040.1.

Alignment of the sequences was performed using the MUSCLE algorithm (Edgar, 2004) with the default settings in MEGA software version 5 (Tamura et al., 2011) and results were edited using the GeneDoc program (Nicholas et al., 1997). Phylogenies were constructed using the Neighbour-Joining method conducted in MEGA5 (Tamura et al., 2011). Bootstrap support values were estimated using 1,000 bootstrap replicates.

2.4. Reverse transcription (RT)-PCR of the VTDC gene

Total RNA was extracted from ovary, salivary glands, fat body and gut of fully and partially engorged females. Larvae, eggs and males were also used. Before dissection, ticks were washed with 70% ethanol. Using a scalpel blade, the dorsal surface was removed and ovaries, gut, salivary glands and fat body were dissected in 20 mM PBS, pH 7.2. Larvae, eggs and males were macerated. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesised from 5 µg of total RNA submitted to reverse transcription (RT) with superscript II (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. PCR amplification with Elongase (Invitrogen) was performed using 500 ng of the RT reactions and the following primers: (forward: 5'-ATGAAAGCACTGCTATTTACCTTCT-3' and reverse: 5'-AAGCGATTGTTATTGAATGTTACAC-3') to generate a 565 bp fragment comprising the full VTDC sequence including the pro-peptide and post stop codon regions. Actin gene amplification was used as a constitutive gene control, using the following primers: 5'-TGTGACGACGAGGTTGCCG-3' (forward) and 5'-GAAGCACTTGCGGTGGACAATG-3' (reverse) (da Silva Vaz et al., 2005).

For VTDC amplification, the PCR conditions were: an initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles performed at 94 °C for 30 s, 57 °C for 30 s and 68 °C for 1 min, and a final extension step at 68 °C for 5 min. For actin amplification, PCR conditions were: 94 °C for 5 min, 35 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 68 °C for 90 s and a final extension step at 68 °C for 7 min (da Silva Vaz et al., 2005). PCR products were analysed by electrophoresis on 0.8% agarose gel.

2.5. Cloning of the VTDC gene

Sequence encoding the mature VTDC protein from ovaries of fully engorged females was amplified using the primers 5'-CATGGTAGATGATCCAGATATCTGCGCT-3' (forward) and 5'-CTCGAGCGGCCACGTCGTC-3' (reverse). The PCR product was separated by electrophoresis on 0.8% agarose gel and the 285-bp fragment was excised and purified using the GeneClean II Kit (Qbiogene, USA).

The amplicon was cloned in a pGEM-T vector (Promega, USA), transformed into *E. coli* Top 10 strain (Promega) and plated on Luria-Bertani (LB) agar plates containing ampicillin (100 µg/mL). The nucleotide sequence was confirmed by PCR, hydrolysis with restriction enzymes and sequencing. For the cloning of the DNA sequence encoding the mature VTDC protein in the expression vector, the plasmid pGEM-VTDC was digested with *EcoRI* and *XhoI* restriction enzymes and the insert was ligated into plasmid pET-32a downstream of the gene of the fusion protein thioredoxin (Trx) and the histidine tag (His). The plasmid pET32a-rVTDC was transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3) Star. Transformed

cells were plated and cultivated in LB agar containing 100 µg/mL ampicillin. The plasmid was purified and the cloned product was confirmed by sequencing.

2.6. Expression of rVTDC in *E. coli* cells

A single colony of *E. coli* strain BL21 (DE3) Star transformed with the plasmid pET32a-rVTDC was inoculated in 20 mL of Super Optimal Broth (SOB medium) (Hanahan, 1983) in a 500 mL Erlenmeyer flask (Sambrook et al., 1989) with 100 µg/mL of ampicillin and incubated overnight at 37 °C with agitation at 180 rpm. Five millilitres of inoculum were placed in an Erlenmeyer flask containing 500 mL of SOB medium. The culture was grown at 37 °C with shaking at 180 rpm until an O.D.₆₀₀ of 0.6 was reached. Recombinant protein expression was induced with isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Fermentas, USA) at a final concentration of 1 mM and the culture was incubated at 37 °C for 2 h at 180 rpm. After centrifugation (10,000g; 5 min) the cell pellet was resuspended in binding buffer (20 mM sodium phosphate buffer, 500 mM NaCl, pH 7.4) with 50 mM imidazole. Cell disruption was achieved by sonication (Vibra Cell; Sonics & Materials Inc., USA) on ice in five short pulses of 30 s at 1 min intervals. Samples were centrifuged at 10,000g for 20 min to separate soluble and insoluble fractions which were stored at -20 °C until purification. The recombinant protein expressed in inclusion bodies (insoluble fraction), was solubilised as described in Section 2.7.

2.7. Purification of rVTDC

2.7.1. Soluble fraction purification

The sample, as were all solutions used for purification, was filtered through a 0.45 µm filter before being applied in an immobilised Ni²⁺ affinity chromatography column HisTrap FF (GE Healthcare). Binding buffer with 50 mM imidazole was used to equilibrate the column. The recombinant protein was eluted in a stepwise manner as 1 ml fractions using phosphate buffer containing 100 and 500 mM imidazole.

For removal of the fusion protein (a 6-His-Trx tag) from rVTDC-Trx, thrombin was added to the protein samples and cleavage was allowed to proceed for 2 h at room temperature. After thrombin cleavage, the 6-His-Trx tag portion was removed by a second Ni²⁺ affinity chromatography. The unbound fraction containing the untagged rVTDC was dialysed in PBS and concentrated in Amicon Ultra-4 10 kDa (Millipore, USA). Alternatively, after thrombin cleavage the products of hydrolysis were not separated by chromatography, so that the rVTDC preparation contained a mixture of untagged rVTDC and 6-His-Trx. Protein samples were analysed by 12% SDS-PAGE using Coomassie Blue G-250 for staining and BSA as standard for protein quantification. rVTDC was quantified by gel scanning and analysed by software Image J (Abramoff et al., 2004).

2.7.2. Inclusion bodies solubilisation

Solubilisation of inclusion bodies was evaluated using two different denaturant agents: 8 M urea and 6 M guanidine hydrochloride. The insoluble fraction was resuspended with washing buffer 1 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% triton X-114, 1 M urea), and centrifuged at 8,000g for 10 min at 4 °C. Supernatant was removed and this step repeated. Washing buffer 2 (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM NaCl, 1% triton X-114, 2 M urea) was used to resuspend the pellet, and after centrifugation the supernatant was removed. The pellet was resuspended in PBS to remove any residue of washing buffer before the solubilisation process. The pellet was then resuspended in denaturing buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.4, 500 mM NaCl, 8 M urea or 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, 1 mM

β -mercaptoethanol, 6 M guanidine hydrochloride). After 1 h with constant agitation at room temperature, the supernatant was collected and the solubilisation yields were analysed by 12% SDS-PAGE.

2.8. Preparation of anti-rVTDCe serum

Anti-rVTDCe serum was obtained by rabbit immunisation with slices of polyacrylamide gels containing rVTDCe after separation by electrophoresis. The slice was macerated and mixed with oil adjuvant (Montanide 888 and Marcol 52) in a total volume of 1 mL. The rabbit was inoculated s.c. three times at 15 day intervals.

Cattle were immunised with 200 μ g of rVTDCe emulsified in the same oil adjuvant as used for rabbit immunisation. To obtain the polyclonal serum, four inoculations were carried out at 21 day intervals. The specific rabbit and bovine immune responses to rVTDCe were analysed by Western blot.

Blood was collected from immunised and control animals, the blood clot removed and sera cleared of red cells by centrifugation (5,000g/10 min). Serum was stored at -20°C .

2.9. Western blot analysis

Protein samples were subjected to 14% SDS-PAGE under reducing conditions. Gels were stained with Coomassie brilliant blue G-250 or transferred to a nitrocellulose membrane for Western blot analysis. Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk-PBS and incubated with VTDCe or rVTDCe anti-sera diluted 1:100. Anti-IgG alkaline phosphatase conjugates were used as secondary antibody. Development was performed in a dark chamber with nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma, USA) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP, Sigma).

2.10. Enzyme activity assay

Samples were incubated in 50 mM sodium citrate/sodium phosphate buffer, pH 3.5, 20 mM DTT and 28 μ M of fluorogenic substrate N-Cbz-Phe-Arg-MCA in a final volume of 100 μ L. After incubation, end point fluorescence was monitored on a Spectramax Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, USA) using 370–460 nm as the wavelength pair for excitation and emission. To release rVTDCe from the 109 amino acid fusion protein, hydrolysis of the recombinant protein was performed with thrombin. The fraction obtained after purification was incubated with 0.05 U of thrombin (Sigma) for 2 h at 37°C .

In order to characterise rVTDCe sensitivity to peptidase inhibitors, the recombinant protein was incubated with the assay buffer in the presence or absence of each inhibitor for 10 min at 37°C before addition of the fluorogenic substrate. Inhibitors tested were E-64 (0.01 mM), leupeptin (0.01 mM), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (0.1 mM) and pepstatin A (0.001 mM). Tagged VTDCe (rVTDCe+Trx), with untagged rVTDCe in the presence of the 6-His-Trx tag (rVTDCe/Trx) and a purified bacterial extract containing a pET32a vector were used as controls.

2.11. Antimicrobial activity assay

Staphylococcus epidermidis ATCC 35984 and *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 (Rahme et al., 1995) were grown in LB broth at 37°C on a rotary shaker (150 rpm) (Incubator Shaker Series Excella E25, New Brunswick Scientific, USA). Overnight cultures were adjusted to an O.D. at 600 nm equivalent to 10^8 colony forming units (CFU)/mL and treated with either 5.5 μ mol of tagged rVTDCe, untagged rVTDCe in the presence of the 6-His-Trx tag or untagged rVTDCe and purified Trx. Thrombin, rifampicin or equivalent volumes of PBS were used as controls in

standard sterile 96 well polystyrene flat bottom microtiter plates (Costar 3599, Corning, USA) Bacterial growth was evaluated as the difference between initial ($t=0$) and final ($t=24$ h) absorbance at 600 nm (Musk et al., 2005). PBS was considered as a positive control of bacterial growth and rifampicin (16 μ g/mL, Sigma Aldrich) and gentamicin sulphate (16 μ g/mL, Sigma Aldrich) were utilised as controls for inhibition of the bacterial growth of *S. epidermidis* and *P. aeruginosa*, respectively. The statistical analysis was performed using a Student's *t*-test, with $P < 0.05$ considered significant.

3. Results

3.1. Native VTDCe amino acid sequence

The native VTDCe N-terminal sequence determined by Edman degradation is VDDPDICAFDDVKLGILMRCVREKAW (Fig. 1). Additionally, LC-MS/MS fragmentation spectra analysis of the native VTDCe resulted in the identification of three internal tryptic peptides: EKAWMLR, YMKPKPR and REFWEIAK (Fig. 1).

3.2. VTDCe sequence and phylogenetic analysis

The N-terminal amino acid and three internal peptide sequences of the native protein were used for searching in GenBank and the BmiGI. Using these queries, a complete cDNA sequence assigned as a conserved hypothetical protein was found (BmiGI TC21162). The exact correspondence of its deduced amino acid sequence with the N-terminal and internal peptides of VTDCe native protein showed that TC21162 actually corresponds to the VTDCe gene (Fig. 1).

VTDCe cDNA (GenBank Accession No. JQ080269) comprises an open reading frame encoding 113 amino acids, of which the first is the N-terminal methionine, in the preprotein. A molecular mass of 12,907 Da and pI of 5.64 were calculated. A deduced pro-peptide of 21 amino acids was identified using the ProP 1.0 Server (Duckert et al., 2004). The mature enzyme has 92 amino acids with a molecular mass of 10,656 Da (Fig. 1). The amino acid sequence of the native enzyme determined by Edman degradation and that deduced from the cloned cDNA sequence obtained from BmiGI were observed to match perfectly.

Despite the fact that peptidase activity of native and recombinant VTDCe is inhibited by E-64, very low sequence similarity with cysteine peptidase was observed. In fact, BLAST searches using the complete VTDCe sequence in GenBank and BmiGI databases showed that the deduced VTDCe primary sequence was similar to other tick protein sequences which were annotated as conserved hypothetical proteins or similar to microplusin (AY233212.1), a tick antimicrobial protein (Fogaça et al., 2004).

Besides the low amino acid identity observed when comparing VTDCe with other tick protein sequences (Fig. 2) and cysteine endopeptidases, a remarkable similarity in the amino acid physicochemical characteristics was clearly observed. Moreover, regularly spaced cysteine residues can be found in VTDCe and microplusin-like proteins, and this arrangement is also conserved in *Entamoeba histolytica* cysteine endopeptidase sequences (Supplementary Fig. S1). A phylogenetic analysis of proteins with similarity to VTDCe was constructed based on amino acid sequences (Fig. 3). The phylogenetic tree revealed two protein clades: one clade, including VTDCe and hypothetical proteins from *I. scapularis*, and another formed by microplusin, hebraein and other similar proteins. Surprisingly, in spite of the unequivocal VTDCe characterisation as a cysteine endopeptidase, very low similarity was found with cysteine endopeptidase sequences.

	10	20	30	40	
1	gtg aac ggc tca caa aaa cgc acc	ATG AAA GCA CTG CTA TTT ACC			45
1			<u>Met Lys Ala Leu Leu Phe Thr</u>		07
46	TTT CTT GCA ATC TGC TCG TAC GGA TTT GTT TCG GTG TCG GCT GTA				90
08	<u>Phe Leu Ala Ile Cys Ser Tyr Gly Phe Val Ser Val Ser Ala Val</u>				22
91	GAT GAT CCA GAT ATC TGC GCT TTC GAC GAT GTC AAG CTT GGA ATC				135
23	<u>Asp Asp Pro Asp Ile Cys Ala Phe Asp Asp Val Lys Leu Gly Ile</u>				37
136	TTG ATG AGA TGC GTG AGG GAG AAG GCC TGG CTC ATG CTT CGC AAC				180
38	<u>Leu Met Arg</u> Cys Val Arg <u>Glu Lys Ala Trp Leu Met Leu Arg</u> Asn				52
181	GGG CTT GAC CAC CTG CTC CAC GTC TAC CAG TGC CAG AGT GAC ACA				225
53	Gly Leu Asp His Leu Leu His Val Tyr Gln Cys Gln Ser Asp Thr				67
226	TGT GTT TTC AAC AAG ATA TGC GAC GAA GGA GAC GTT ACA ACT GCT				270
68	Cys Val Phe Asn Lys Ile Cys Asp Glu Gly Asp Val Thr Thr Ala				82
271	TTG AAT AAA TAC ATG AAG CCC AAG CCT CGC AGA GAG TTC TGG GAA				315
83	Leu Asn Lys <u>Tyr Met Lys Pro Lys Pro Arg Arg</u> Glu Phe Trp Glu				97
316	ATA GCA AAG AAG TGC GAG AAA GAA CTG CCT CCC GAC GAC GTG GCC				360
98	<u>Ile Ala Lys</u> Lys Cys Glu Lys Glu Leu Pro Pro Asp Asp Val Ala				112
361	GCT TGA cca tgc ttc cct aca att gca ctc cgt cgc ctg caa tca				405
113	Ala End				113
406	gtt gcc tag aat tgc tgt act ctt ctt gtg ccc gtg ctc ttt gtg				450
451	aga aac att gga gac ttc tgt tca cat ata acg caa tag cat tga				495
496	atg ttg tgc tga tgc tca aaa ctt gac aaa ata taa tca cgt gat				540
541	ttg tca aag tag tat gcc aaa ttg tgt aac att caa taa aca atc				585
586	gct				588

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Rhipicephalus microplus* Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase (VTDCE) cDNA. Propeptide is double underlined; N-terminal amino acid sequence determined by Edman degradation is shaded in black. The amino acid sequences of three internal peptides determined by mass spectrometry are shaded in light grey.

3.3. VTDCE transcription analysis

To determine the expression profile of the VTDCE gene, total RNA samples from two tick development stages and different tissues were subjected to RT-PCR using primers designed for VTDCE and the constitutive actin gene. VTDCE mRNA transcripts were not detected in eggs, larvae or adult males (data not shown). Expression was detected in salivary glands, gut, ovary and fat body of partially (20/21 days after infestation) and fully engorged female ticks (obtained after detachment from the host) (Fig. 4).

3.4. VTDCE gene cloning and rVTDCE expression

VTDCE cDNA was successfully cloned, and rVTDCE expression was achieved by bacterial growth in SOB medium at 37 °C, under constant agitation (160 rpm) for 2 h after induction with 1 mM IPTG. More than 80% of the rVTDCE was detected in the insoluble fraction as inclusion bodies. The pET32a vector adds a 109 amino acid Trx-protein tag and a 6-aa His-Tag to the recombinant protein, so the molecular mass of rVTDCE-Trx was 29.1 kDa.

3.5. rVTDCE purification

Soluble rVTDCE was efficiently purified by Ni²⁺-affinity chromatography. rVTDCE was eluted with 100 and 500 mM imidazole, pH 7.4. As 500 mM imidazole eluted fractions showed the highest VTDCE amount with an absence of contaminating proteins, they were pooled and used as a pure VTDCE preparation. Regarding protein recovery from inclusion bodies, solubilisation with guanidine

hydrochloride was more efficient, producing a purer rVTDCE compared with the urea-solubilised preparation (Fig. 5).

3.6. rVTDCE enzymatic activity

rVTDCE was able to hydrolyse gelatin and N-cbz-Phe-Arg-MCA, the same natural and synthetic substrates used to evaluate the activity of the native enzyme (Seixas et al., 2003). Cleavage of the fusion protein6-His-Trx tag resulted in a 30% increase in activity (Fig. 6). SDS-PAGE analysis of rVTDCE treated with thrombin showed two fragments at approximately 20 and 14 kDa (Fig. 6; insert). Specific cysteine endopeptidase inhibitors, E-64 and leupeptin, totally inhibited the recombinant enzyme (Fig. 6). A control using similarly purified extracts of *E. coli* containing a pET32a plasmid without insert did not show any enzymatic activity.

3.7. Antimicrobial activity

Staphylococcus epidermidis and *P. aeruginosa* grown in the presence and absence of VTDCE were evaluated over a period of 24 h. VTDCE significantly inhibited ($P < 0.05$) *S. epidermidis* growth at 5.5 μmol (Fig. 7). The rVTDCE without fusion protein was shown to have greater antimicrobial activity (81% of inhibition) than rVTDCE fused to Trx (45% inhibition) (Fig. 7). Interestingly, the presence of a 6-His-Trx tag in the assay interfered with rVTDCE antimicrobial activity (Fig. 7; rVTDCE/Trx). In contrast, VTDCE did not inhibit *P. aeruginosa* growth (data not shown). The rVTDCE antimicrobial activity remained constant, even in the absence of enzymatic activity induced by freezing and thawing, showing that both are independent properties.

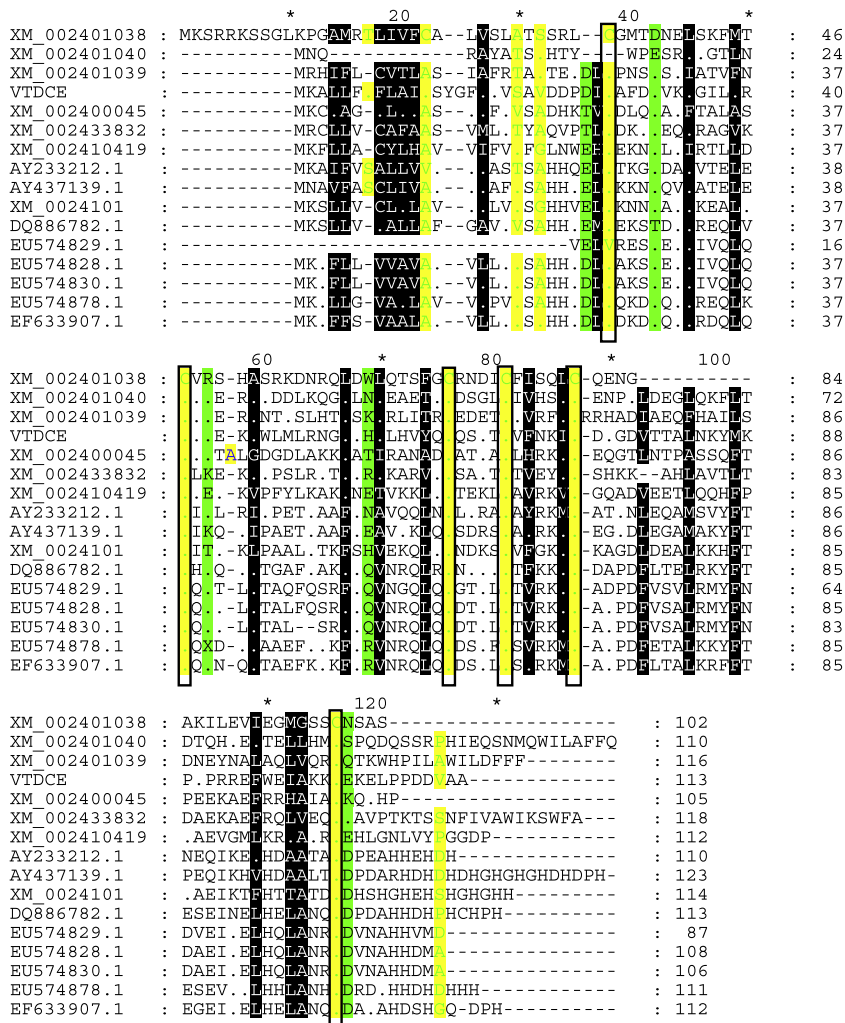


Fig. 2. Amino acid sequence comparison and alignment of *Rhipicephalus microplus* Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase (VTDC; JQ080269) and various tick antimicrobial peptides. Proteins were colour-coded according to different physicochemical properties using the software GeneDoc (Nicholas et al., 1997). Alignment shading is based on the physicochemical properties group analysis, wherein each column in the alignment is assigned to one of the twelve predefined groups of physicochemical properties. These twelve groups represent three overlapping hierarchies of size, the electrical charge for the polar amino acids, and the aromaticity for non-polar amino acids: proline (P): blue on a red background; glycine (G): green on a red background; tiny amino acids (AGS): blue on a yellow background; small amino acids (VCAGDNSTP): green on a yellow background; positive amino acids (HKR): red on a blue background; negative amino acids (ED): green on a blue background; charged amino acids (HKRED): white on a blue background; amphoteric amino acids (HREQDN): red on a green background; polar amino acids (YWHKREQDNST): black on a green background; aliphatic amino acids (ILVA): red on a grey background; aromatic amino acids (FYWH): blue on a grey background and hydrophobic amino acids (ILVCAGMFYWH): white on a black background. The cysteine residues are boxed. Accession numbers: *Ornithodoros coriaceus* EU574828.1, EU574829.1, EU574830.1, EU574878.1; *Ornithodoros parkeri* EF633907.1; *Argas monolakensis* DQ886782.1; *Boophilus microplus* AY233212.1; *Amblyomma hebraeum* AY437139.1; *Ixodes scapularis* XM002410111.1, XM002410419.1, XM002400045.1, XM002401038.1, XM002433832.1, XM002401039.1, XM002401040.1.

3.8. rVTDC immunogenicity

rVTDC was shown to be immunogenic in both rabbit and bovine models. The specificity of the anti-rVTDC antibodies was assessed by Western blot analyses using purified VTDC from *R. microplus* eggs with sera from bovines and rabbits immunised with rVTDC. Native VTDC was recognised by sera of the animals immunised with rVTDC (Fig. 8), showing that antibodies induced by rVTDC immunisation recognise native *R. microplus* protein. Western blot analyses showed that antibodies against rVTDC were not detected in non-vaccinated infested bovines (data not shown).

4. Discussion

Cysteine cathepsins are members of the C1 family of papain-like enzymes, the largest and best characterised family of cysteine

peptidases which includes, among others, papain and related plant enzymes, parasite and helminth peptidases, insect homologs of papain, trematode cysteine peptidases, viral peptidases and lysosomal cysteine cathepsins (Turk et al., 2012). Due to the critical role of cysteine peptidases during the initial life cycle or to the pathogenicity of parasites, those are considered as potential targets for drugs and vaccines in parasite control strategies (Sajid and McKerrow, 2002; Loukas et al., 2004).

As highlighted previously, together with BYC and THAP, VTDC plays a role in *R. microplus* embryo nutrition during development (Logullo et al., 1998; Sorgine et al., 2000; Seixas et al., 2003). As well as VTDC, BmCL1 (Renard et al., 2000) is a cathepsin L-like enzyme, identified in *R. microplus* (Renard et al., 2000; Estrela et al., 2010). However, VTDC and BmCL1 are distinct enzymes, differing in their optimum pH and substrate specificity (Renard et al., 2000; Seixas et al., 2003). Also, BmCL1 differs from VTDC; although showing in vitro activity on VT, it is not involved in embryogenesis

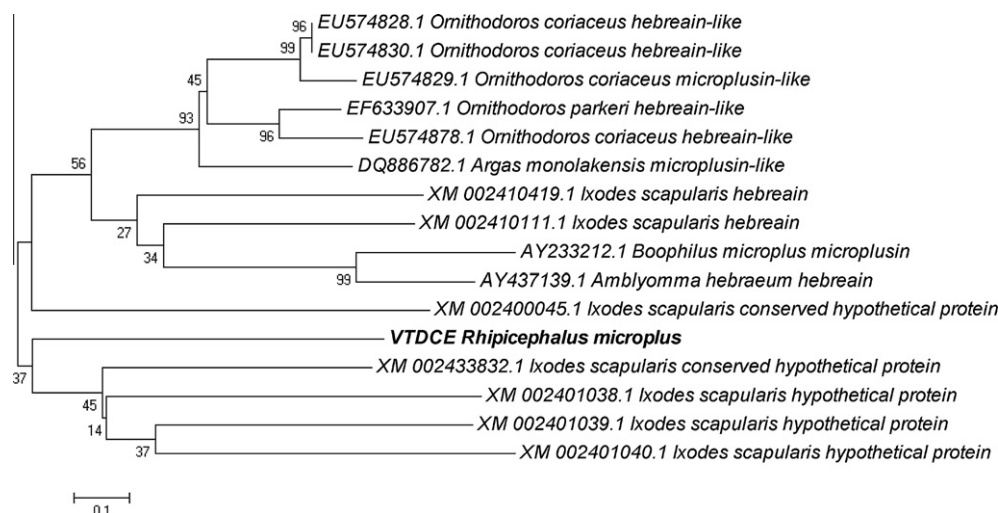


Fig. 3. Phylogenetic analyses based on *Rhipicephalus microplus* Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase (VTDCe; JQ080269) and tick antimicrobial peptides. The amino acid sequences from these organisms were obtained from GenBank. Accession numbers: *Ornithodoros coriaceus* EU574828.1, EU574829.1, EU574830.1, EU574878.1; *Ornithodoros parkeri* EF633907.1; *Argas monolakensis* DQ886782.1; *Boophilus microplus* AY233212.1; *Amblyomma hebraeum* AY437139.1; *Ixodes scapularis* XM002410111.1, XM002410419.1, XM002400045.1, XM002401038.1, XM002433832.1, XM002401039.1, XM002401040.1.

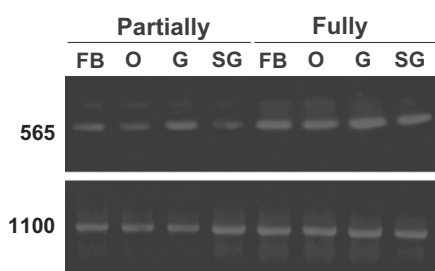


Fig. 4. Transcription profile of *Rhipicephalus microplus* Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase (VTDCe) mRNA and actin from different tissues/stages determined by reverse transcription-PCR. Total RNA was extracted from fat body (FB), ovary (O), gut (G) and salivary glands (SG) of partially (20/21 days after infestation) and fully engorged females (after detachment from the host). VTDCe and actin amplicons are 565 and 1,100 bp in size, respectively.

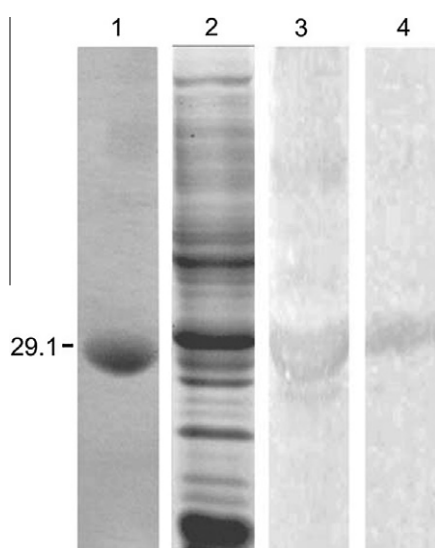


Fig. 5. Solubilisation of inclusion bodies of recombinant *Rhipicephalus microplus* Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase (rVTDCe). Twelve percent SDS-PAGE of fractions solubilised with 6 M guanidine (Lane 1) or 8 M urea (Lane 2) are shown. A Western blot shows fractions solubilised with 6 M guanidine (Lane 3) with 8 M urea (Lane 4) and probed with rabbit serum against VTDCe.

and seems to play a role in hemoglobin hydrolysis during blood meal digestion (Renard et al., 2002; Cruz et al., 2010). VTDCe is active against VT and other proteins such as hemoglobin, albumin and gelatin. It hydrolyses some synthetic substrates, particularly those with hydrophobic amino acids at P₁ and P₂ (Seixas et al., 2003). VTDCe is present in the *R. microplus* gut and ovary. In the gut, VTDCe is present in the basal lamina and basophilic cells. In ovaries, it is found in the membranes of ovarian pedicel cell vesicles. There is evidence showing that VTDCe, as well as VT and other VT hydrolysing enzymes, is produced in the gut and then transported through the hemolymph to be taken up by growing oocytes (Seixas et al., 2010a,b, in press).

Using partial amino acid sequences from Edman sequencing and data from mass spectrometry, we successfully identified the full amino acid sequence of VTDCe in GenBank and BmiGI databases (Fig. 1). Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of VTDCe and other endopeptidases showed a low similarity. However, the distribution pattern of amino acid physicochemical properties in VTDCe is similar to that of other cysteine endopeptidases and some *I. scapularis* hypothetical proteins. Surprisingly, the VTDCe amino acid sequence is similar to some tick antimicrobial peptides (Supplementary Fig. S1).

To confirm that the cysteine endopeptidase activity observed was from VTDCe and not due to a diminutive contamination of a very active enzyme present in the native VTDCe preparation, we produced a recombinant protein to prevent the recombinant enzyme from being contaminated by any tick egg protein. When compared with native VTDCe (Seixas et al., 2003, 2010b), the rVTDCe showed similar VT- and synthetic substrate-hydrolysing activity, and inhibitor sensitivity. In this sense, the enzymatic profile of rVTDCe shows that, despite its unusual amino acid sequence, this protein exerts endopeptidase activity. Considering the distribution pattern of the cysteines along the molecule, VTDCe has similarities with *E. histolytica* cysteine endopeptidases. These *E. histolytica* enzymes are more closely related to each other than to any other cysteine endopeptidase sequence, and they are unique when compared with cathepsins of higher eukaryotes (Bruchhaus et al., 2003).

Antimicrobial peptides form a primitive immune defense mechanism in eukaryotic organisms (Reddy et al., 2004). Interestingly, the VTDCe amino acid sequence has similarity with microplusin,

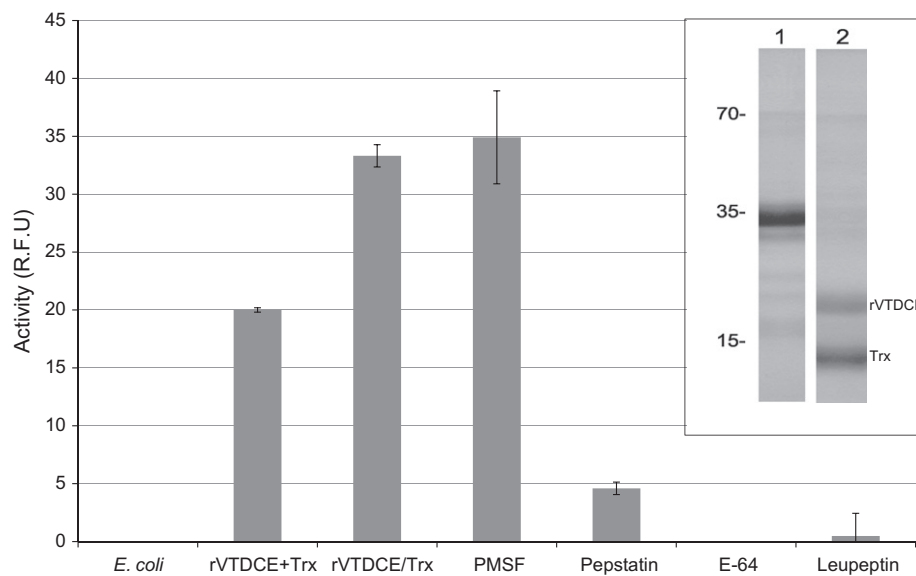


Fig. 6. Enzymatic cysteine endopeptidase activity of recombinant *Rhipicephalus microplus* Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase (rVTDCE). An assay with the recombinant enzyme was performed with untagged rVTDCE. The protein was incubated for 10 min in pH 4 citrate phosphate buffer with DTT, in the presence or absence of inhibitors at 37 °C before addition of the fluorogenic substrate. Inhibitors tested were E-64 (0.01 mM), leupeptin (0.01 mM), phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) (0.001 mM) and Pepstatin A (0.1 mM). Purified *Escherichia coli* extract, tagged VTDCe (rVTDCe + thioredoxin (Trx)), untagged rVTDCe in presence of the histidine-Trx (6-His-Trx) tag (rVTDCe/Trx) were used as controls. Insert shows a SDS–PAGE analysis of rVTDCe untreated (tagged rVTDCe) (Lane 1) or treated with thrombin show two fragments at 20 kDa (6-His-Trx) and 14 kDa (untagged rVTDCe) (Lane 2).

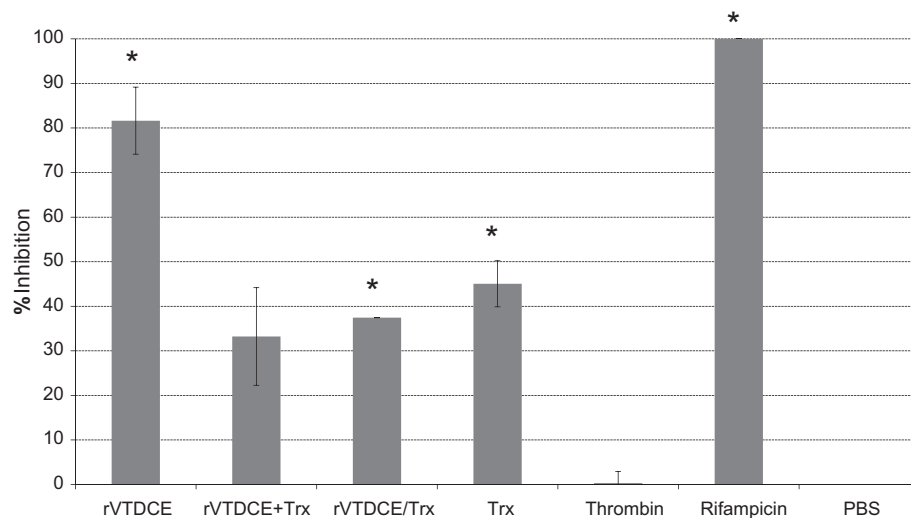


Fig. 7. Effect of the recombinant *Rhipicephalus microplus* Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase (rVTDCE) on *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 growth. Tagged VTDCe (5.5 μM) (rVTDCe + thioredoxin (Trx)), untagged rVTDCe in presence of the histidine-Trx (6-His-Trx) tag (5.5 μM) (rVTDCe/Trx), purified Trx (5.5 μM), thrombin, rifampicin and PBS were used as controls. The mean values of triplicate independent experiments and S.D.s are shown. * represents significant difference compared with untreated sample (control for bacterial growth) (Student's *t* test, *P* < 0.05).

an antimicrobial peptide characterised in *R. microplus* (Fogaça et al., 2004), and with other microplusin-like peptides (Fig. 2).

Arthropod antimicrobial peptides properties have been the subject of several studies (Nakajima et al., 2001; Kuhn-Nentwig, 2003; Esteves et al., 2009). Most antimicrobial peptides described to date are small and specialised peptides (Ganz, 2003). Indeed, in ticks and other arthropods, several peptides have antimicrobial activity against bacteria and fungi (Nakajima et al., 2003; Zhang et al., 2011). However, an increasing number of antimicrobial peptides are derived from proteins whose functions are not directly associated with antimicrobial defense (Zasloff, 2002; Fernandes et al., 2003). For example, a silkworm has a protein that is 50–60% similar to the c-type insect lysozymes without catalytic activity, but

with a bacteriostatic effect against *E. coli* and *Micrococcus luteus* (Gandhe et al., 2007). Also, *R. microplus* releases a peptide with antimicrobial activity from bovine hemoglobin (Fogaça et al., 1999).

VTDCe amino acid sequence similarity with antimicrobial proteins is a striking feature. Although VTDCe does not present a high amino acid identity to antimicrobial tick proteins, it has a high degree of conservation in the chemical properties among amino acid residues (Fig. 2). This impels the hypothesis that it has antimicrobial activity. Indeed, rVTDCe showed antimicrobial activity against *S. epidermidis* (Fig. 7). Antimicrobial peptides from other tick species have already been reported in the literature. An antimicrobial protein, named hebraein, was purified from the hemolymph of fed

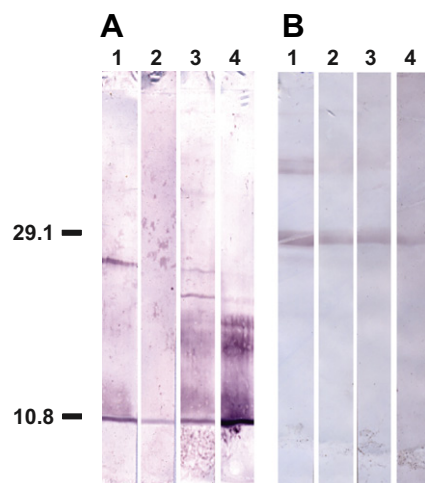


Fig. 8. Antigenicity analysis of *Rhipicephalus microplus* Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase (VTDCE) and recombinant VTDCE (rVTDCE). Western blot of native (A) and recombinant (B) proteins probed with (Lane 1) rabbit serum raised against VTDCE, (Lane 2) rabbit serum raised against rVTDCE, (Lane 3) bovine serum raised against VTDCE and (Lane 4) bovine serum raised against rVTDCE. Sizes in kDa are indicated.

female *A. hebraeum* (Lai et al., 2004). In the study, native hebraein and its recombinant form displayed antimicrobial activities against the Gram positive bacterium *S. aureus*, the Gram negative bacterium *E. coli*, and the fungus *Candida glabrato* (Lai et al., 2004). Yu and colleagues (2006) showed that ixosin, a peptide isolated from the salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*, exhibited inhibitory activity against *E. coli*, *S. aureus* and *Candida albicans*. A tick salivary gland antimicrobial peptide, named Rhamp (*Rhipicephalus haemaphysaloides* antimicrobial peptide), has antimicrobial activity based on peptidase inhibitory activity (Zhang et al., 2011). Recombinant Rhamp inhibits the growth of Gram negative bacteria, including *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* and *E. coli* (Zhang et al., 2011). Microplusin, an antimicrobial peptide isolated from *R. microplus*, showed inhibitory activity against Gram positive bacteria (such as *M. luteus*, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* and *S. epidermidis*), filamentous fungi (*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Fusarium* sp.), and yeasts (*Cryptococcus neoformans* and *Saccharomyces cerevisiae*) (Fogaça et al., 2004; Silva et al., 2009).

Moreover, antimicrobial activity is also displayed by denatured VTDCE (without endopeptidase activity). This demonstrates that the antimicrobial activity does not rely on the enzymatic activity, suggesting that the two types of activity are independent, and that the protein dual activity is involved in two distinct functions: (i) as an enzyme involved in VT hydrolysis during embryogenesis, and (ii) as a participant in defense mechanisms against pathogens. Although several antimicrobial peptides have been described to date, there is only a single report on an antimicrobial peptide which also has enzyme activity: a cathepsin G from human neutrophils (Bangalore et al., 1990). Clearly, Bangalore et al. (1990) demonstrated that this antimicrobial activity does not depend on peptidase activity, since treatment with an irreversible serine protease inhibitor or digestion with clostripain did not abolish antimicrobial activity. Some research groups had already arrived at the conclusion that changes in peptide structure do not abolish antimicrobial activity. Two human defensins, human defensin 5 (de Leeuw et al., 2007) and β defensin (Schroeder et al., 2011), have been shown to maintain antimicrobial activity despite modifications in peptide structure. Also, a frog palustrin-2 family peptide has antimicrobial activity independently of disulphide bond formation or reduction (Iwakoshi-Ukena et al., 2011). These data agree with the observation that denaturation of rVTDCE, induced

by freezing and thawing, inhibits enzymatic but not antimicrobial activity.

After expression, rVTDCE was obtained in both soluble and insoluble forms. The soluble form was used as starting material for further characterisation of enzymatic and antimicrobial activities. As the native enzyme, the rVTDCE showed activity on N-CBZ-Phe-Arg-MCA, a synthetic peptide substrate, and gelatin, a protein substrate (data not shown). The inhibitory profile observed (Fig. 6) is in accordance with an enzyme belonging to the cysteine endopeptidase sub-sub-class (EC. 3.4.22.). Even after the fusion protein removal, the specific activity of the soluble rVTDCE is lower than that of the native enzyme, suggesting that the recombinant enzyme might not be correctly folded. This could be a consequence of the DNA construct used, since it corresponds only to the mature enzyme without the pro-peptide and has an additional non-VTDCE sequence (Trx and a His polymer). This is consistent with the fact that some enzymes expressed without their pro-region sequence have lower activity than enzymes expressed with their pro-region (Ogino et al., 1999). Indeed, it is known that the presence of the cysteine endopeptidase pro-region sequence can act as an intramolecular chaperone to assist a proper folding (Sajid and McKerrow, 2002). Also, the 6-His-Trx tag interference in rVTDCE activity could be due to an association between these two proteins (Fig. 7; rVTDCE/Trx). Cura et al. (2008) observed that the permanence of the tag protein in the same solution changes recombinant protein properties.

The expression profile, immunolocalisation (Seixas et al., 2010a) and enzymatic activity (Seixas et al., 2003, 2010a) suggested that VTDCE participates in reproduction and embryo development (Seixas et al., 2003, 2010a). Western blot and enzymatic activity experiments (Seixas et al., 2010a) showed VTDCE is present in ovaries of females recently detached; ovaries of females 3 days after detachment; during embryonic development: 1, 3, 7, 12 and, 20 day-old eggs; young (5 day-old) larvae; and old unfed (20 day-old) larvae. This tissue and developmental stage distribution is consistent with a role in reproduction and embryo development (Seixas et al., 2010a). Accordingly, immunisation with native VTDCE induces a protective immune response which impairs tick reproduction (Seixas et al., 2003, 2008). Concerning immunogenicity, similar to the native form, rVTDCE was able to induce an immune response in rabbits and cattle. Since VTDCE is not present in the saliva (Seixas et al., 2010a) and VTDCE antibodies were not produced by cattle after tick infestation (data not shown), VTDCE may be classified as a concealed antigen (Willadsen et al., 1993). Since the native protein is recognised by polyclonal antibodies produced against rVTDCE (Fig. 8), it is plausible to suppose that rVTDCE can also be useful as an antigen in an anti-tick vaccine.

In conclusion, this report describes the characterisation of a protein from *R. microplus* that is atypical in its structural and functional characteristics. In this sense, this protein seems to be highly important to tick physiology, since it has two independent activities (antimicrobial and enzymatic), and putatively has a dual role: acting in embryo nutrition and defense against pathogens.

Acknowledgement

This work was supported by grants from CNPq – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, FINEP, CAPES, CNPq, FAPERGS and FAPERJ, Brazil.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.04.013>.

References

- Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image Processing with Image. J. Biophoton. Int. 11, 36–42.
- Almazán, C., Blas-Machado, U., Kocan, K.M., Yoshioka, J.H., Blouin, E.F., Mangold, A.J., de la Fuente, J., 2005. Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. *Vaccine* 23, 4403–4416.
- Almazán, C., Moreno-Cantú, O., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., Canales, M., Villar, M., de la Fuente, J., 2012. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine* 30, 265–272.
- Arrieta, M.C., Leskiw, B.K., Kaufman, W.R., 2006. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattletick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 39, 297–313.
- Bangalore, N., Travis, J., Onunka, V.C., Pohl, J., Shafer, W.M., 1990. Identification of the primary antimicrobial domains in human neutrophil cathepsin G. *J. Biol. Chem.* 265, 13584–13588.
- Bergamo, A.E., Seixas, A., de Oliveira, N.T., Pinto, A.F., Termignoni, C., 2010. Vitellin and hemoglobin-digesting enzymes in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae and females. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 157, 326–335.
- Bruchhaus, I., Loftus, B.J., Hall, N., Tannich, E., 2003. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot. Cell* 2, 501–509.
- Canal, C.W., Maia, H.M., Da Silva Vaz Jr., I., Chies, J.M., Farias, N.A., Masuda, A., Gonzales, J.C., Ozaki, L.S., Dewes, H., 1995. Changing patterns of vitelin-related peptides during development of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.* 19, 325–336.
- Castro-Janer, E., Martins, J.R., Mendes, M.C., Namindome, A., Klafke, G.M., Schumaker, T.T., 2010. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. *Vet. Parasitol.* 173, 300–306.
- Cho, W.L., Tsao, S.M., Hays, A.R., Walter, R., Chen, J.S., Snigirevskaya, E.S., Raikhel, A.S., 1999. Mosquito Cathepsin B-like Protease Involved in Embryonic Degradation of Vitellin Is Produced as a Latent Extraovarian Precursor. *J. Biol. Chem.* 274, 13311–13321.
- Curá, V., Gangloff, M., Eiler, S., Moras, D., Ruff, M., 2008. Cleaved thioredoxin fusion protein enables the crystallization of poorly soluble ER α in complex with synthetic ligands. *Acta Crystallogr. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64, 54–57.
- Cruz, C.E., Fogaça, A.C., Nakayasu, E.S., Angeli, C.B., Belmonte, R., Almeida, I.C., Miranda, A., Miranda, M.T., Tanaka, A.S., Braz, G.R., Craik, C.S., Schneider, E., Caffrey, C.R., Daffre, S., 2010. Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. *Parasit. Vectors* 3, 63.
- da Silva Vaz Jr., I., Imamura, S., Nakajima, C., de Cardoso, F.C., Ferreira, C.A., Renard, G., Masuda, A., Ohashi, K., Onuma, M., 2005. Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding for *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus appendiculatus* actins. *Vet. Parasitol.* 127, 147–155.
- de la Fuente, J., Rodriguez, M., Redondo, M., Montero, C., Garcia-Garcia, J.C., Mendez, L., Serrano, E., Valdes, M., Enriquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boue, O., Machado, H., Leonart, R., de Armas, C.A., Rey, S., Rodriguez, J.L., Artilles, M., Garcia, L., 1998. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine* 16, 366–373.
- de Leeuw, E., Burks, S.R., Li, X., Kao, J.P., Lu, W., 2007. Structure-dependent functional properties of human defensin 5. *FEBS Lett.* 581, 515–520.
- Duckert, P., Brunak, S., Blom, N., 2004. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 107–112.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Esteves, E., Fogaça, A.C., Maldonado, R., Silva, F.D., Manso, P.P., Pelajo-Machado, M., Valle, D., Daffre, S., 2009. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 913–919.
- Estrela, A.B., Seixas, A., Teixeira, V.O., Pinto, A.F., Termignoni, C., 2010. Vitellin- and hemoglobin-digesting enzymes in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae and females. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 157, 326–335.
- Fagotto, F., 1990. Yolk degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid activable proenzyme. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 14, 237–252.
- Fagotto, F., 1991. Yolk degradation in tick eggs: III. Developmentally regulated acidification of the yolk spheres. *Develop. Growth Diff.* 35, 57–66.
- Fernandes, J.M., Saint, N., Kemp, G.D., Smith, V.J., 2003. Oncorhynchin III: a potent antimicrobial peptide derived from the non-histone chromosomal protein H6 of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem. J.* 373, 621–628.
- Fogaça, A.C., da Silva Jr, P.I., Miranda, M.T., Bianchi, A.G., Miranda, A., Ribolla, P.E., Daffre, S., 1999. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 274, 25330–25334.
- Fogaça, A.C., Lorenzini, D.M., Kaku, L.M., Esteves, E., Bulet, P., Daffre, S., 2004. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 191–200.
- Frisch, J.E., 1999. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *Int. J. Parasitol.* 29, 57–71.
- Gandhe, A.S., Janardhan, G., Nagaraju, J., 2007. Immune upregulation of novel antibacterial proteins from silkworms (Lepidoptera) that resemble lysozymes but lack muramidase activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 655–666.
- Ganz, T., 2003. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr. Comp. Biol.* 43, 300–304.
- Guerrero, F.D., Miller, R.J., Rousseau, M.E., Sunkara, S., Quackenbush, J., Lee, Y., Nene, V., 2005. BmiGI: a database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 585–595.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.
- Hagedoom, H.H., Kunkel, J.G., 1979. Vitellogenin and vitellin in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 24, 475–505.
- Iwakoshi-Ukena, Elwakoshi-Ukena, E., Okada, G., Okimoto, A., Fujii, T., Sumida, M., Ukena, K., 2011. Identification and structure–activity relationship of an antimicrobial peptide of the palustrin-2 family isolated from the skin of the endangered frog *Odorrana ishikawae*. *Peptides* 32, 2052–2057.
- Johns, R., Sonenshine, D.E., Hynes, W.L., 1998. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick haemolymph. *J. Med. Entomol.* 35, 458–464.
- Johns, R., Sonenshine, D.E., Hynes, W.L., 2001. Identification of a defensin from the hemolymph of the american dog tick *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 857–865.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129, S3–S14.
- Jurado, J.D., Rael, E.D., Lieb, C.S., Nakayasu, E., Hayes, W.K., Bush, S.P., Ross, J.A., 2007. Complement inactivating proteins and intraspecific venom variation in *Crotalus oreganus helleri*. *Toxicon* 49, 339–350.
- Kopacek, P., Vogt, R., Jindrak, L., Weise, C., Safarik, I., 1999. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 989–997.
- Kuhn, K.H., Uhlir, J., Grubhoffer, L., 1996. Ultrastructural localization of a sialic acid-specific hemolymphlectin in the hemocytes and other tissues of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata). *Parasitol. Res.* 82, 215–221.
- Kuhn-Nentwig, L., 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 2651–2668.
- Lai, R., Takeuchi, H., Lomas, L.O., Jonczyk, J., Rigden, D.J., Rees, H.H., Turner, P.C., 2004. A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. *FASEB J.* 18, 1447–1449.
- Logullo, C., da Silva Vaz Jr., I., Sorgine, M.H., Paiva-Silva, G.O., Faria, F.S., Zingali, R.B., De Lima, M.F., Abreu, L., Oliveira, E.F., Alves, E.W., Masuda, H., Gonzales, J.C., Masuda, A., Oliveira, P.L., 1998. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology* 116, 525–532.
- Loukas, A., Bethony, J.M., Williamson, A.L., Goud, G.N., Mendez, S., Zhan, B., Hawdon, J.M., Bottazzi, M.E., Brindley, P.J., Hotez, P.J., 2004. Vaccination of Dogs with Recombinant Cysteine Protease from the Intestine of Canine Hookworms Diminishes the Fecundity and Growth of Worms. *J. Infect. Dis.* 189, 1952–1961.
- Lustigman, S., McKeerrow, J.H., Shah, K., Lui, J., Huima, T., Hough, M., Brotman, B., 1996. Cloning of a cysteine protease required for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. *J. Biol. Chem.* 271, 30181–30189.
- Martins, J.R., Furlong, J., 2001. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet. Rec.* 149, 64.
- Merino, O., Almazán, C., Canales, M., Villar, M., Moreno-Cid, J.A., Estrada-Peña, A., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2011. Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks fed on cattle. *Vaccine* 29, 2248–2254.
- Mulenga, A., Sugimoto, C., Onuma, M., 2000. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infect.* 2, 1353–1361.
- Musk, D.J., Banko, D.A., Hergenrother, P.J., 2005. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Biol.* 12, 789–796.
- Na, B.K., Kim, S.H., Lee, E.G., Kim, T.S., Bae, Y.A., Kang, I., Yu, J.R., Sohn, W.M., Cho, S.Y., Kong, Y., 2006. Critical roles for excretory–secretory cysteine proteases during tissue invasion of *Paragonimus westermani* newly excysted metacercariae. *Cell Microbiol.* 8, 1034–1046.
- Nakajima, Y., van der Goes van Naters-Yasui, A., Taylor, D., Yamakawa, M., 2001. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 747–751.
- Nakajima, Y., Ogihara, K., Taylor, D., Yamakawa, M.J., 2003. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Med. Entomol.* 40, 78–81.
- Nicholas, K.B., Nicholas Jr, H.B., Deerfield, D.W., 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBnet News* 4, 1–4.
- Ogino, T., Kaji, T., Kawabata, M., Satoh, K., Tomoo, K., Ishida, T., Yamazaki, H., Ishidoh, K., Kominami, E.J., 1999. Function of the propeptide region in recombinant expression of active procathepsin L in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 126, 78–83.
- Patarroyo, J.H., Vargas, M.I., González, C.Z., Guzmán, F., Martins-Filho, O.A., Afonso, L.C., Valente, F.L., Peconick, A.P., Marciano, A.P., Patarroyo, A.M., Sossai, S., 2009. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462 against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 66, 330–339.
- Parizi, L.F., Pohl, P.C., Masuda, A., da Silva Vaz Jr., I., 2009. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18, 1–7.

- Pedra, J.H., Brandt, A., Li, H.M., Westerman, R., Romero-Severson, J., Pollack, R.J., Murdock, L.L., Pittendrigh, B.R., 2003. Transcriptome identification of putative genes involved in protein catabolism and innate immune response in human body louse (Pediculicidae: *Pediculus humanus*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1135–1143.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S., 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567.
- Pohl, P.C., Sorgine, M.H., Leal, A.T., Logullo, C., Oliveira, P.L., Da Silva Vaz Jr., I., Masuda, A., 2008. An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 151, 392–399.
- Pohl, P.C., Klafke, G.M., Carvalho, D.D., Martins, J.R., Daffre, S., da Silva Vaz Jr., I., Masuda, A., 2011. ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Int. J. Parasitol.* 41, 1323–1333.
- Potterat, O., Hostettmann, K., Holtzel, A., Jung, G., Diehl, P.A., Petrini, O., 1997. Boophilin, an antimicrobial sterol amide from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Helvetica Chimica Acta* 80, 2066–2072.
- Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., Ausubel, F.M., 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268, 1899–1902.
- Reddy, K.V., Yedery, R.D., Aranha, C., 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 536–547.
- Renard, G., Garcia, J.F., Cardoso, F.C., Richtera, M.F., Sakanarid, J.A., Ozaki, L.S., Termignoni, C., Masuda, A., 2000. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 1017–1026.
- Renard, G., Lara, F.A., de Cardoso, F.C., Miguens, F.C., Dansa-Petretski, M., Termignoni, C., Masuda, A., 2002. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect. Mol. Biol.* 11, 325–328.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Sajid, M., McKerrow, J.H., 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 1–21.
- Seixas, A., Dos Santos, P.C., Velloso, F.F., da Silva Vaz Jr., I., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C., 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology* 126, 155–163.
- Seixas, A., Leal, A., Nascimento-Silva, M., Masuda, A., Termignoni, C., da Silva Vaz Jr., I., 2008. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDC). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124, 332–340.
- Seixas, A., Estrela, A.B., Ceolato, J.C., Pontes, E.G., Lara, F., Gondim, K.C., Termignoni, C., 2010a. Localization and function of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology* 137, 1819–1831.
- Seixas, A., Oldiges, D.P., da Silva Vaz Jr., I., Termignoni, C., 2010b. Endocrinology and control of tick vitellogenesis. *Acta Sci. Vet.* 38, 95–111.
- Seixas, A., Oliveira, P., Termignoni, C., Logullo, C., Masuda, A., da Silva Vaz, I., in press. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.05.011>.
- Schroeder, B.O., Wu, Z., Nuding, S., Groscurth, S., Marciniowski, M., Beisner, J., Buchner, J., Schaller, M., Stange, E.F., Wehkamp, J., 2011. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1. *Nature* 469, 419–423.
- Silva, F.D., Rezende, C.A., Rossi, D.C., Esteves, E., Dyszy, F.H., Schreier, S., Gueiros-Filho, F., Campos, C.B., Pires, J.R., Daffre, S., 2009. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J. Biol. Chem.* 284, 34735–34746.
- Sonenshine, D.E., Kocan, K.M., de La Fuente, J., 2006. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends Parasitol.* 22, 550–551.
- Sorgine, M.H., Logullo, C., Zingali, R.B., Paiva-Silva, G.O., Juliano, L., Oliveira, P.L., 2000. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 275, 28659–28665.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Taylor, D., 2006. Innate immunity in ticks: a review. *J. Acarol. Soc. Jpn.* 15, 109–127.
- Tua, W.C., Lai, S.C., 2006. Induction of cysteine proteinase in the encapsulation of *Hymenolepis diminuta* eggs in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 73–78.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., Turk, D., 2012. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 68–88.
- Van der Goes van Naters-Yasui, A., Taylor, D., Shono, T., Yamakawa, M., 2000. Purification and partial amino acid sequence of antibacterial peptides from the haemolymph of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). In: Kazinfrova, M., Labuda, M., Nuttall, P.A. (Eds.), *Proceedings of the Third International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens: into the 21st Century*. Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia, pp. 189–194.
- Wang, M., Guerrero, F.D., Peretea, G., Nene, V.M., 2007. Global comparative analysis of ESTs from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Genomics* 8, 368.
- Willadsen, P., Eisemann, C.H., Tellam, R.L., 1993. “Concealed” antigens: expanding the range of immunological targets. *Parasitol. Today* 9, 132–135.
- Willadsen, P., 2006. Vaccination against ectoparasites. *Parasitology* 133, S9–S25.
- Yamamoto, Y., Takahashi, S.Y., 1993. Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. B* 106, 35–45.
- Yu, D., Sheng, Z., Xu, X., Li, J., Yang, H., Liu, Z., Rees, H.H., Lai, R., 2006. A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Peptides* 27, 31–35.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–396.
- Zhang, H., Zhang, W., Wang, X., Zhou, Y., Wang, N., Zhou, J., 2011. Identification of a cysteine-rich antimicrobial peptide from salivary glands of the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Peptides* 32, 441–446.

4 DISCUSSÃO

O estudo da proteína VTDCCE tem pelo menos nove anos de existência, iniciando com a caracterização feita por Seixas et al. em 2003. A VTDCCE obtida a partir de ovos de 10 dias de *R. microplus* possibilitou alguns estudos que contribuíram para a compreensão da fisiologia deste carrapato. A necessidade de dados complementares aos estudos de caracterização desta enzima, que necessitam de grande quantidade de material, impeliram a busca pela obtenção de sua forma recombinante.

O trabalho descrito no corpo desta dissertação inicia-se com a determinação da sequência de aminoácidos de peptídeos pertencentes à VTDCCE, a partir de uma preparação da enzima nativa obtida segundo protocolo estabelecido anteriormente (SEIXAS et al., 2003). Com estas sequências de aminoácidos e os dados de sequência de cDNA disponíveis em bancos de dados foi obtida a sequência nucleotídica de sua ORF completa (Figura 1). Surpreendentemente, os resultados das análises revelaram que a VTDCCE, embora possua atividade característica de cisteíno endopeptidases, tem maior similaridade com peptídeos antimicrobianos (Figura 2) do que com outras enzimas, mesmo cisteíno endopeptidases. Essa característica sugere que a VTDCCE pode ter uma função adicional à sua função já caracterizada na digestão da VT durante a embriogênese (SEIXAS et al., 2003). A análise filogenética feita mostra que a VTDCCE se enquadra em um clado distinto daquele no qual estão os peptídeos antimicrobianos do tipo microplusina e hebraina (Figura 3). A VTDCCE se encaixa em um clado onde estão diversas proteínas hipotéticas, sugerindo que organismos de outras espécies apresentem moléculas como a VTDCCE, mas que estas ainda não foram descritas.

O conhecimento do sistema imune dos carrapatos ainda apresenta grandes espaços a serem preenchidos, mas de maneira geral é um sistema imune inato, no qual peptídeos antimicrobianos cumprem papel importante. A característica indicada pela análise da sequência de aminoácidos da VTDCE, isto é, ação antimicrobiana, foi confirmada usando como modelo uma bactéria Gram positiva e uma Gram negativa, respectivamente: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Pseudomonas aeruginosa* cepa PA14. A rVTDCE foi ativa apenas contra a bactéria Gram positiva *S. epidermidis*, sendo que em uma concentração de 5,5 μmol verificou-se 81% de inibição (Figura 7). A atividade antimicrobiana encontrada pode ser ter crucial para a defesa do organismo, mas não diminui o fato de que sua atividade peptidásica é importante para a digestão de Vt (SEIXAS et al., 2003).

A análise da sequência de aminoácidos incomum para uma atividade enzimática sugere que esta proteína apresenta estrutura secundária semelhante a peptídeos antimicrobianos. Entretanto, mesmo assim a VTDCE possui atividade enzimática. Os resultados obtidos excluem decisivamente a possibilidade de que a sequência de aminoácidos obtida decorresse de contaminantes no material sequenciado. O primeiro resultado que descarta a hipótese de contaminação é o fato de que soro de animais imunizados com a forma recombinante é capaz de reconhecer a proteína forma nativa e vice-versa (Figura 8). O segundo dado que descarta a possibilidade de contaminação é o fato de a proteína recombinante possuí atividade enzimática sobre o substrato N-cbz-Phe-Arg-MCA (Figura 6), o mesmo substrato utilizado na caracterização da VTDCE nativa.

No que concerne à caracterização bioquímica da VTDCE recombinante, ela apresenta atividade catalítica sobre o substrato fluorogênico N-cbz-Phe-Arg-MCA, bem como é inibida por E-64 e leupeptina (Figura 6), dados similares aos obtidos por Seixas (et

al., 2003) com a enzima nativa e que a caracterizam como cisteíno endopeptidase . A dificuldade em expressar proteínas eucarióticas, que tenham atividade enzimática, em organismos procariotos é conhecida e é explicada pelo fato de muitas das modificações pós-traducionais necessárias para atividade biológica de enzimas eucarióticas não são realizadas por procariotos (BORISJUK et al., 1999). Além da expressão em organismo procariótico poder afetar a estrutura tridimensional, e conseqüentemente a atividade enzimática. Ademais, no caso da VTDCE recombinante obtida neste trabalho pode haver uma segunda dificuldade para o enovelamento correto da VTDCE recombinante: a presença de uma proteína de fusão grande. A construção utilizada no trabalho faz uso do vetor de expressão pET 43a, resultando na proteína recombinante fusionada à tioredoxina (TRX) e à uma cauda de histidinas. Efetivamente, após a remoção da TRX por hidrólise utilizando trombina (Figura 6 - inserto), as atividades enzimática e antimicrobiana aumentam (Figura 6 e 7). Isso sugere que diferentes construções plasmídeo-inserto, ou expressão em outros vetores podem levar à produção de uma rVTDCE com maior atividade enzimática e/ou antimicrobiana.

O sistema MEROPS agrupa as peptidases em um sistema composto por clãs, famílias e espécies (RAWLINGS et al., 1999; BARRET et al., 2001). Na base deste sistema estão as “unidades peptidásicas”, ou seja, a sequência correspondente ao domínio de peptidase. As proteínas com a caracterização mais completas são consideradas holotipos. Sequências correspondentes à mesma proteína em diferentes organismos são consideradas como uma única espécie proteica. Se peptidases apresentam similaridade nas sequências de suas unidades peptidásicas, mas diferem quanto à especificidade de substrato, ou atuam sobre o mesmo substrato de formas diferentes, ou mesmo interagem de forma distinta com inibidores elas são caracterizadas em novas espécies. Famílias são

formadas por proteínas homólogas, detectadas através da similaridade na sequência de aminoácidos. Uma sequência é imputada como característica de uma família caso o alinhamento com outros membros da família gerar um alinhamento com um valor esperado de menos de 0,001. Em um clã são agrupadas sequências consideradas como derivadas de um mesmo ancestral, mesmo sem uma similaridade significativa na sua sequência (RAWLINGS et al., 2012). A comparação da sequência da VTDCE com as sequências da família C1, na qual foi inicialmente inserida em função da caracterização bioquímica, indica que ela não pertence a essa família. A sequência da VTDCE também não contém uma unidade peptidásica que se encaixe nas famílias peptidásicas existentes. Portanto, ela é a primeira integrante de uma nova família.

Algumas enzimas, como a lisozima, possuem atividade antimicrobiana decorrente da atividade enzimática, uma vez que a atividade enzimática é capaz de causar danos à bactéria. Entretanto, a VTDCE não se enquadra neste tipo de caso. A VTDCE mantém sua atividade antimicrobiana mesmo quando perde sua atividade enzimática, demonstrando claramente que as atividades catalítica e antimicrobiana são independentes. Esse é segundo caso conhecido de uma proteína com dupla atividade independente (peptidásica e antimicrobiana), sendo o primeiro uma Cathepsina G de neutrófilos humanos (BANGALORE et al., 1990). Embora esta propriedade comum as sequências de aminoácidos dessas duas proteínas não apresentam semelhança que permita incluí-las em um mesmo clado.

A expressão heteróloga da rVTDCE produziu a maior parte da proteína recombinante em corpúsculos de inclusão. Corpúsculos de inclusão são agregados protéicos que tendem a se formar quando há uma alta expressão de proteínas no citoplasma da bactéria, o que gera um ambiente desfavorável para o correto enovelamento das

proteínas traduzidas (VILLAVARDE et al., 2003; GARCIA-FRUITOS et al., 2012). Tal agregação pode ocorrer de forma passiva, em função de interações altamente hidrofóbicas entre regiões que ficaram expostas em função de um enovelamento incorreto (VILLAVARDE et al., 2003). A expressão em corpos de inclusão apresenta uma grande dificuldade que é a necessidade de um processo de solubilização desses corpúsculos além de um complexo processo de enovelamento caso seja desejada a proteína biologicamente ativa (MUKHOPADHYAY, 1997). Entretanto essa situação também apresenta algumas vantagens: permite a expressão de proteínas que pudessem ser facilmente degradadas no citoplasma da bactéria, bem como de proteínas tóxicas (MUKHOPADHYAY, 1997). Além disso, em função de sua agregação eles podem ser isolados das proteínas celulares após lavagem, mais baratas e mais simples do que processos cromatográficos, o que torna a utilização deste tipo de agregado protéico adequada quando o objetivo é produzir grande quantidade de proteína, desde que seja possível solubilizar a proteína posteriormente ou quando mesmo a proteína desnaturada seja adequada para utilização a que se destina (GARCIA-FRUITOS et al., 2012). Tendo em vista o potencial da VTDC para uso como antígeno vacinal, onde a proteína insolúvel mantém a capacidade imunogênica, o fato de esta ser obtida em uma forma bastante limpa (figura 5), a expressão em corpos de inclusão é adequada.

Os dados obtidos mostram que a proteína recombinante pode ser utilizada como antígeno vacinal, uma vez que ela é capaz de ativar a resposta imune adaptativa do hospedeiro imunizado, induzir a produção de anticorpos e estes anticorpos são capazes de reconhecer a proteína nativa (Figura 8), sendo possível usar a proteína recombinante em uma vacina. Com relação às atividades enzimática e antimicrobiana da proteína recombinante é importante ressaltar a remoção da proteína de fusão leva a aumento em

ambas as atividades (Figuras 6 e 7). A necessidade de um passo adicional de hidrólise e posterior purificação reduz ainda mais o rendimento de produto final. Para obter a estrutura tridimensional e uma caracterização mais refinada dessa molécula e da atividade antimicrobiana, principalmente no que se refere à atividade sobre outras espécies de bactérias, é necessário obter maior quantidade da proteína. Para isso, a troca do vetor de expressão parece conveniente. Além da alteração de vetor, uma construção sem a presença de proteína de fusão e contendo a sequência do pro-peptídeo pode ser vantajosa para obter uma proteína com uma conformação mais próxima da enzima nativa e, portanto com uma melhor atividade catalítica.

A elucidação em detalhes da estrutura desta proteína poderá esclarecer como o sítio ativo da enzima é formado e como esta molécula com sequência tão distinta de outras cisteíno endopeptidases ainda assim apresenta atividade peptidásica.

5 CONCLUSÃO

As conclusões obtidas no presente trabalho foram:

- O ovo de carrapato *R. microplus* possui uma cisteíno endopeptidase que apresenta duas atividades independentes: antimicrobiana e peptidásica. Este é o segundo caso até agora descrito de uma peptidase com atividade antimicrobiana independente da atividade enzimática.

- Este trabalho demonstrou que a proteína de fusão adicionada à construção da molécula recombinante é capaz de alterar a atividade enzimática e antimicrobiana da VTDCE recombinante

-Foi confirmado que a VTDCE caracteriza-se como um antígeno oculto.

De forma geral, a importância desta molécula para o carrapato, bem como a possibilidade de sua utilização como antígeno vacinal e a característica incomum de apresentar dupla atividade mostram a VTDCE como um importante alvo de estudo.

6 REFERÊNCIAS

- ABREU, L. A.; VALLE, D.; MANSO, P. P.; FACANHA, A. R.; PELAJO-MACHADO, M.; MASUDA, H.; MASUDA, A.; VAZ, I., JR.; LENZI, H.; OLIVEIRA, P. L. & LOGULLO, C. Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. *Insect Biochem Mol Biol*, 34 (5): 443-449, 2004.
- AMARAL, M. A.; ROCHA, C. M.; FACCINI, J. L.; FURLONG, J.; MONTEIRO, C. M. & PRATA, M. C. Strategic control of cattle ticks: milk producers' perceptions. *Rev Bras Parasitol Vet*, 20 (2): 148-154, 2011.
- ANDERSON, J. F. The natural history of ticks. *Med Clin North Am*, 86: 205-218, 2002.
- ANDERSON, J. F. & MAGNARELLI, L. A. Biology of ticks. *Infect Dis Clin North Am*, 22 (2): 195-215, v, 2008.
- ANDREOTTI, R. Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*, 2010.
- BANGALORE, N.; TRAVIS, J.; ONUNKA, V. C.; POHL, J. & SHAFER, W. M. Identification of the primary antimicrobial domains in human neutrophil cathepsin G. *J Biol Chem*. 265(23):13584–13588, 1990.
- BARKER, S. C. & MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, 129 Suppl: S15-S36, 2004.
- BARRETT, A.J., RAWLINGS, N.D. & O'BRIEN, E. A. The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol* 134, 95-102, 2001.
- BELMONTE, R.; CRUZ, C. E.; PIRES, J. R. & DAFFRE, S. Purification and characterization of Hb 98-114: A novel hemoglobin-derived antimicrobial peptide from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Peptides*, 37 (1): 120-127, 2012.
- BENITEZ, D.; CETRÁ, B. & CHRISTENSEN, M.F. *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* ticks can complete their life cycle on the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Buffalo Science*, 1: 193-197, 2012.
- BORISJUK, N. V.; BORISJUK, L. G.; LOGENDRA, S.; PETERSEN, F.; GLEBA, Y. & RASKIN, I. Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nat Biotechnol*, 17 (5): 466-469, 1999.
- BRAZ, G. R.; COELHO, H. S.; MASUDA, H. & OLIVEIRA, P. L. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Curr Biol*, 9 (13): 703-706, 1999.
- BRIEGEL, H.; GUT, T. & LEA, A. O. Sequential deposition of yolk components during oogenesis in an insect, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Insect Physiol*, 49 (3): 249-260, 2003.
- BROSSARD, M. & WIKEL, S. K. Tick immunobiology. *Parasitology*, 129 Suppl: S161-S176, 2004.

- BULET, P. & STOCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett*, 12 (1): 3-11, 2005.
- CARVALHO, W. A.; FRANZIN, A. M.; ABATEPAULO, A. R.; DE OLIVEIRA, C. J.; MORE, D. D.; DA SILVA, J. S.; FERREIRA, B. R. & DE MIRANDA SANTOS, I. K. Modulation of cutaneous inflammation induced by ticks in contrasting phenotypes of infestation in bovines. *Vet Parasitol*, 167 (2-4): 260-273, 2010.
- CECCHETTINI, A.; SCARCELLI, V.; LOCCI, M. T.; MASETTI, M. & GIORGI, F. Vitellin polypeptide pathways in late insect yolk sacs. *Arthropod Struct Dev*, 30 (3): 243-250, 2002.
- CERAUL, S. M.; SONENSHINE, D. E. & HYNES, W. L. Resistance of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *J Med Entomol*, 39 (2): 376-383, 2002.
- CHINZEI, Y. & YANO, I. Vitellin is the nutrient reserve during starvation in the nymphal stage of a tick. *Experientia*, 41: 948-950, 1985.
- COX, M. M. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*, 30: 1759-66, 2012.
- CRUZ, A. P.; SILVA, S. S.; MATTOS, R. T.; DA SILVA, V. I., JR.; MASUDA, A. & FERREIRA, C. A. Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines. *Vet Parasitol*, 158 (1-2): 152-158, 2008.
- DA SILVA VAZ, J., I; MARTINEZ, R. H.; OLIVEIRA, A.; HECK, A.; LOGULLO, C.; GONZALES, J. C.; DEWES, H. & MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet Parasitol*, 62 (1-2): 155-160, 1996.
- DA SILVA, V. I., JR.; LOGULLO, C.; SORGINE, M.; VELLOSO, F. F.; ROSA DE LIMA, M. F.; GONZALES, J. C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P. L. & MASUDA, A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet Immunol Immunopathol*, 66 (3-4): 331-341, 1998.
- DA SILVA VAZ, I.; SEIXAS, A. & MASUDA, A. Pesquisa para uma Vacina contra o Carrapato em Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular*, Capítulo 17, 2012.
- DAVIES, D. R. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 19: 189-215, 1990.
- DE LA FUENTE, J.; ALMAZAN, C.; CANALES, M.; PEREZ DE LA LASTRA JM; KOCAN, K. M. & WILLADSEN, P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res Rev*, 8 (1): 23-28, 2007.
- DE LA FUENTE, J. & KOCAN, K. M. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol*, 28 (7): 275-283, 2006.
- DICKINSON, D. P. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13 (3): 238-275, 2002.

- DUCORNEZ, S.; BARRE, N.; MILLER, R. J. & GARINE-WICHATITSKY, M. Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test. *Vet Parasitol*, 130 (3-4): 285-292, 2005.
- EGGENBERGER, L. R.; LAMOREAUX, W. J. & COONS, L. B. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. *Exp Appl Acarol*, 9 (3-4): 279-287, 1990.
- ESTRADA-PENA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R. & WALKER, A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp Appl Acarol*, 38 (2-3): 219-235, 2006.
- ESTRELA, A.; SEIXAS, A. & TERMIGNONI, C. A cysteine endopeptidase from tick (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*) larvae with vitellin digestion activity. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 148 (4): 410-416, 2007.
- ESTRELA, A. B.; SEIXAS, A.; TEIXEIRA, V. O.; PINTO, A. F. & TERMIGNONI, C. Vitellin- and hemoglobin-digesting enzymes in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* larvae and females. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 157 (4): 326-335, 2010.
- FAGOTTO, F. Yolk degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. *Arch Insect Biochem Physiol*, 14 (4): 237-252, 1990.
- FAGOTTO, F. Yolk Degradation in Tick Eggs: III. Developmentally Regulated Acidification of the Yolk Spheres. *Development, Growth & Differentiation*, 33: 57-66, 1991.
- FAGOTTO, F. Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. *J Cell Sci*, 108 (Pt 12): 3645-3647, 1995.
- FERNANDES, E. K.; BITTENCOURT, V. R. & ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Exp Parasitol*, 130 (3): 300-305, 2012.
- FOGACA, A. C.; ALMEIDA, I. C.; EBERLIN, M. N.; TANAKA, A. S.; BULET, P. & DAFFRE, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides*, 27 (4): 667-674, 2006.
- FOGACA, A. C.; DA SILVA, P. I. J.; MIRANDA, M. T.; BIANCHI, A. G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P. E. & DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem*, 274 (36): 25330-25334, 1999.
- FOGACA, A. C.; LORENZINI, D. M.; KAKU, L. M.; ESTEVES, E.; BULET, P. & DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev Comp Immunol*, 28 (3): 191-200, 2004.
- GANZ, T. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr Comp Biol*, 43 (2): 300-304, 2003.
- GARCIA-FRUITOS, E.; VAZQUEZ, E.; DIEZ-GIL, C.; CORCHERO, J. L.; SERAS-FRANZOSO, J.; RATERA, I.; VECIANA, J. & VILLAVARDE, A. Bacterial inclusion bodies: making gold from waste. *Trends Biotechnol*, 30 (2): 65-70, 2012.

- GARCIA-GARCIA, J. C.; GONZALEZ, I. L.; GONZALEZ, D. M.; VALDES, M.; MENDEZ, L.; LAMBERTI, J.; D'AGOSTINO, B.; CITRONI, D.; FRAGOSO, H.; ORTIZ, M.; RODRIGUEZ, M. & DE LA FUENTE, J. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol*, 23 (11): 883-895, 1999.
- GEORGE, J. E.; POUND, J. M. & DAVEY, R. B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129 Suppl: S353-S366, 2004.
- GONZALES, J.C. *O controle do carrapato dos bovinos*. Sulina, 1974.
- GONZALES, J.C. *O controle do carrapato do boi*. 2ed. Edição do Autor, 1995.
- GOODMAN, J. L.; DICKINSON, D. P. & SONENSHINE, D. E. Tick borne diseases of humans . 2005.
- GUDDERRA, N. P.; SONENSHINE, D. E.; APPERSON, C. S. & ROE, R. M. Hemolymph proteins in ticks. *J Insect Physiol*, 48 (3): 269-278, 2002.
- HAGEDORN, H. H. & KUNKEL J.G. Vitellogenin and Vitellin in Insects. *Annual Review of Entomology*, 24: 475-505, 1979.
- JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L. & SODERHALL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211 (4): 213-236, 2006.
- JONGEJAN, F. & UILENBERG, G. The global importance of ticks. *Parasitology*, 129 Suppl: S3-14, 2004.
- JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol*, 137 (1-2): 1-10, 2006.
- JONSSON, N. N.; DAVIS, R. & DE, W. M. An estimate of the economic effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on Queensland dairy farms. *Aust Vet J*, 79 (12): 826-831, 2001.
- KHALIL, S. M.; DONOHUE, K. V.; THOMPSON, D. M.; JEFFERS, L. A.; ANANTHAPADMANABAN, U.; SONENSHINE, D. E.; MITCHELL, R. D. & ROE, R. M. Full-length sequence, regulation and developmental studies of a second vitellogenin gene from the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *J Insect Physiol*, 57 (3): 400-408, 2011.
- KOPACEK, P.; HAJDUSEK, O.; BURESOVA, V. & DAFFRE, S. Tick innate immunity. *Adv Exp Med Biol*, 708: 137-162, 2010.
- KUMAR, S. & BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett*, 157 (3): 175-188, 2005.
- LAINO, A.; CUNNINGHAM, M. L.; HERAS, H. & GARCIA, F. Isolation and characterization of two vitellins from eggs of the spider *Polybetes pythagoricus* (Araneae: Sparassidae). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 158 (2): 142-148, 2011.

- LAPATTO R.; BLUNDELL, T.; HEMMINGS, A.; OVERINGTON, J.; WILDERSPIN, A.; WOOD, S.; MERSON, J. R.; WHITTLE, P. J.; DANLEY, D. E. & GEOGHEGAN, K. F. X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes. *Nature*, 342: 299–302, 1989.
- LAVINE, M. D. & STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol*, 32 (10): 1295-1309, 2002.
- LEAL, A. T.; SEIXAS, A.; POHL, P. C.; FERREIRA, C. A.; LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P. L.; FARIAS, S. E.; TERMIGNONI, C.; DA SILVA, V. I., JR. & MASUDA, A. Vaccination of bovines with recombinant Boophilus Yolk pro-Cathepsin. *Vet Immunol Immunopathol*, 114 (3-4): 341-345, 2006.
- LI, Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli: a review. *Protein Expr Purif*, 80 (2): 260-267, 2011.
- LOGULLO, C.; MORAES, J.; DANSA-PETRETSKI, M.; VAZ, I. S.; MASUDA, A.; SORGINE, M. H.; BRAZ, G. R.; MASUDA, H. & OLIVEIRA, P. L. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, Boophilus microplus. *Insect Biochem Mol Biol*, 32 (12): 1805-1811, 2002.
- LOGULLO, C.; VAZ, I. S.; SORGINE, M. H.; PAIVA-SILVA, G. O.; FARIA, F. S.; ZINGALI, R. B.; 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*, 116 (Pt 6): 525-532, 1998.
- MARITZ-OLIVIER, C.; VAN, Z. W. & STUTZER, C. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, Rhipicephalus microplus. *Ticks Tick Borne Dis*, 3 (3): 179-187, 2012.
- MARSHALL, S. & ARENAS, G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6: 271-284, 2003.
- MAYA-MONTEIRO, C. M.; DAFFRE, S.; LOGULLO, C.; LARA, F. A.; ALVES, E. W.; CAPURRO, M. L.; ZINGALI, R.; ALMEIDA, I. C. & OLIVEIRA, P. L. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, Boophilus microplus. *J Biol Chem*, 275 (47): 36584-36589, 2000.
- MUKHOPADHYAY, A. Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 56: 61-109, 1997.
- NASCIMENTO-SILVA, M. C.; LEAL, A. T.; DAFFRE, S.; JULIANO, L.; DA SILVA, V. I., JR.; PAIVA-SILVA, G. O.; OLIVEIRA, P. L. & SORGINE, M. H. BYC, an atypical aspartic endopeptidase from Rhipicephalus (Boophilus) microplus eggs. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 149 (4): 599-607, 2008.
- NUTTALL, P. A.; TRIMNELL, A. R.; KAZIMIROVA, M. & LABUDA, M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol*, 28 (4): 155-163, 2006.
- OIE. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. World Organisation for Animal Health. 2007.

- OLDIGES, D. P.; PARIZI, L. F.; ZIMMER, K. R.; LORENZINI, D. M.; SEIXAS, A.; MASUDA, A.; DA SILVA, V. I., JR. & TERMIGNONI, C. A Rhipicephalus (Boophilus) microplus cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity. *Int J Parasitol*, 42 (7): 635-645, 2012.
- PARIZI, L. F.; GITHAKA, N. W.; LOGULLO, C.; KONNAI, S.; MASUDA, A.; OHASHI, K. & DA SILVA, V. I., JR. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. *Vet J*, 2012.
- PARIZI, L. F.; POHL, P. C.; MASUDA, A. & DA SILVA, V. I., JR. New approaches toward anti-Rhipicephalus (Boophilus) microplus tick vaccine. *Rev Bras Parasitol Vet*, Jaboticabal, 18: 1-7, 2009.
- PEREIRA, L. S.; OLIVEIRA, P. L.; BARJA-FIDALGO, C. & DAFFRE, S. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick Boophilus microplus. *Exp Parasitol*, 99 (2): 66-72, 2001.
- RAIKHEL, A. S. & DHADIALLA, T. S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 217-251, 1992.
- RAVI, C.; JEYASHREE, A. & RENUKA DEVI, K. Antimicrobial Peptides from Insects: An Overview. *Research in Biotechnology*, 2: 1-7, 2011.
- RAWLINGS, N.D. & BARRETT, A.J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 27, 325-331, 1999.
- RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. & BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 40 (D1): D343–D350, 2012.
- RENARD, G.; GARCIA, J. F.; CARDOSO, F. C.; RICHTER, M. F.; SAKANARI, J. A.; OZAKI, L. S.; TERMIGNONI, C. & MASUDA, A. Cloning and functional expression of a Boophilus microplus cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochem Mol Biol*, 30 (11): 1017-1026, 2000.
- RODRIGUEZ, M.; MASSARD, C. L.; DA FONSECA, A. H.; RAMOS, N. F.; MACHADO, H.; LABARTA, V. & DE LA FUENTE, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of Boophilus microplus in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. *Vaccine*, 13 (18): 1804-1808, 1995.
- ROSELL, R. & COONS, L. B. Determination of vitellogenin titer in the hemolymph of Dermacentor variabilis (Acarina: Ixodidae) using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *J Med Entomol*, 28 (1): 41-44, 1991.
- SAJID, M. & MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol*, 120 (1): 1-21, 2002.
- SAPPINGTON, T. W. & RAIKHEL, A. S. Ligand-binding domains in vitellogenin receptors and other LDL-receptor family members share a common ancestral ordering of cysteine-rich repeats. *J Mol Evol*, 46: 476-487, 1998.
- SCHMIDT, O.; SODERHALL, K.; THEOPOLD, U. & FAYE, I. Role of adhesion in arthropod immune recognition. *Annu Rev Entomol*, 55: 485-504, 2010.

- SEIXAS, A.; DOS SANTOS, P. C.; VELLOSO, F. F.; DA SILVA, V. I., JR.; MASUDA, A.; HORN, F. & TERMIGNONI, C. A Boophilus microplus vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*, 126 (Pt 2): 155-163, 2003.
- SEIXAS, A.; ESTRELA, A. B.; CEOLATO, J. C.; PONTES, E. G.; LARA, F.; GONDIM, K. C. & TERMIGNONI, C. Localization and function of Rhipicephalus (Boophilus) microplus vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*, 137 (12): 1819-1831, 2010.
- SEIXAS, A.; LEAL, A. T.; NASCIMENTO-SILVA, M. C.; MASUDA, A.; TERMIGNONI, C. & DA SILVA, V. I., JR. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). *Vet Immunol Immunopathol*, 124 (3-4): 332-340, 2008.
- SEIXAS, A.; OLIVEIRA, P.; TERMIGNONI, C.; LOGULLO, C.; MASUDA, A. & DA SILVA, V. I., JR. Rhipicephalus (Boophilus) microplus embryo proteins as target for tick vaccine. *Vet Immunol Immunopathol*, 148 (1-2): 149-156, 2012.
- SONENSHINE, D. E. *Biology of Ticks*. Oxford University Press, 1991.
- SONENSHINE, D. E.; KOCAN, K. M. & DE LA FUENTE, J. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends Parasitol*, 22 (12): 550-551, 2006.
- SORGINE, M. H.; LOGULLO, C.; ZINGALI, R. B.; PAIVA-SILVA, G. O.; JULIANO, L. & OLIVEIRA, P. L. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick Boophilus microplus. *J Biol Chem*, 275 (37): 28659-28665, 2000.
- SUAREZ, C. E. & NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet Parasitol*, 180 (1-2): 109-125, 2011.
- VILLAVERDE, A. & CARRIO, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett*, 25 (17): 1385-1395, 2003.
- VILMOS, P. & KURUCZ, E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol Lett*, 62 (2): 59-66, 1998.
- WIKEL, S. K. Host immunity to ticks. *Annu Rev Entomol*, 41: 1-22, 1996.
- WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. *Parasitology*, 129 Suppl: S367-S387, 2004.
- WILLADSEN, P. & KEMP, D. H. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. *Parasitol Today*, 4 (7): 196-198, 1988.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415 (6870): 389-395, 2002.

7 APÊNDICE

7.1 Material suplementar à metodologia e resultados

Material suplementar referente ao artigo “A *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity”

A figura mostra o alinhamento da VTDC de *Rhipicephalus microplus* (JQ080269) com peptídeos antimicrobianos de carrapatos e cisteína endopeptidases de *Entamoeba histolytica*. As marcações coloridas estão codificadas em função das propriedades físico-químicas dos aminoácidos, utilizando o software GeneDoc. Accession numbers: *Ornithodoros coriaceus* EU574828.1, EU574829.1, EU574830.1, EU574878.1; *Ornithodoros parkeri* EF633907.1; *Argas monolakensis* DQ886782.1; *Boophilus microplus* AY233212.1; *Amblyomma hebraeum* AY437139.1; *Ixodes scapularis* XM002410111.1, XM002410419.1, XM002400045.1, XM002401038.1, XM002433832.1, XM002401039.1, XM002401040.1; *Entamoeba histolytica* AAO03571.1, AAO03569.1, AAO03570.1, CAC34069.1, AAO03567.1, CAA60673.1, AAO03565.1, Q01957.1, Q01958.1, AAO03566.1, CAA62835.1, CAA62833.1.

```

*                20                *                40
XM 002401040 : ----- : -
XM 002400045 : ----- : -
VTDCE : ----- : -
XM 002401038 : -----MKS : 3
XM 002401039 : ----- : -
XM 002433832 : ----- : -
XM 002410419 : ----- : -
AY233212.1 : ----- : -
AY437139.1 : ----- : -
XM 0024101 : ----- : -
DQ886782.1 : ----- : -
EU574829.1 : ----- : -
EU574828.1 : ----- : -
EU574830.1 : ----- : -
EU574878.1 : ----- : -
EF633907.1 : ----- : -
AAO03571.1 : ---MILFIIISVVLGIDTSSMRKLCQRKQYVSAFRLFKES : 37
AAO03569.1 : MSHLIIIVSLVICSFSLKVI PKLEYLKG NENKLEWEWKIK : 40
AAO03570.1 : MSILFIITFLIFSF SKQTNTNEIIKIKFETYWSKWKSD : 40
CAC34069.1 : -----DPVKLFEQFKQE : 12
AAO03567.1 : -----MYRNNLFFLIIVNFSFAINFQWKIK : 26
CAA60673.1 : -----MFALILFVSLACANEVAFKQWAAT : 24
AAO03565.1 : -----MIVLIYLLSIVNGIDFNTWVGK : 22
Q01957.1 : -----MFTFILMFYIGYGIDFNTWVAN : 22
Q01958.1 : -----MFAFICLLAIASAIDFNTWASK : 22
AAO03566.1 : -----MFAVILLGLCANAITFDQWQSK : 22
CAA62835.1 : -----MFTVLLL VVVAYATNFNTWVAN : 22
CAA62833.1 : -----MFNFLLL VVAASAIDFKSWAAK : 22

```

```

*                60                *                80
XM 002401040 : -----MNQ-----RAYATSSHTY----- : 13
XM 002400045 : -----KCAAGLVFAS---LV.LV.ADHKT----- : 23
VTDCE : -----KALLFTFLAICSYGFVSV.AVDDPD----- : 26
XM 002401038 : RRKSSGLKPGAMRTLIVFCA---LVSLA..SR----- : 32
XM 002401039 : -----RHIFLCVTLAS---I..R.A.TELD----- : 23
XM 002433832 : -----RCLLVCAFAAS---VMLL.YAQVPT----- : 23
XM 002410419 : -----KFL LACYLHAV---VI.VAFGLN.E----- : 23
AY233212.1 : -----KAIFVSALLVVA---LVAS..A.HQE----- : 24
AY437139.1 : -----AVFASCLIVAA---LVAF.A.HLE----- : 24
XM 0024101 : -----KSLLVCLVLAV---LVLV.A.G.HVE----- : 23
DQ886782.1 : -----KSLLV LALLAF---G.VLV.A.HLE----- : 23
EU574829.1 : -----VE----- : 2
EU574828.1 : -----KGFLLVAVAA---VLLLA.A.HLD----- : 23
EU574830.1 : -----KGFLLVAVAA---VLLLA.A.HLD----- : 23
EU574878.1 : -----KGLLGVAVLAV---VVPVA.A.HLD----- : 23
EF633907.1 : -----KGFVSVAALAA---VLLLA..HLD----- : 23
AAO03571.1 : FSKRYLSQSE.IRRMAIFSQRVQMIEKFNKRKTESDVKL : 77
AAO03569.1 : YGKTYNN-...IHRKLIEMKNLMEIKTLNQKREKVDAYF : 79
AAO03570.1 : NKKVYNSISE.LTRKAIFLSNLK.INQLN.QRIDTDDAVF : 80
CAC34069.1 : YKKEYVNL.E.LRRKAVFIK---NVKMMRE.NAKESSYTM : 49
AAO03567.1 : YNTKYSG-SEALRRRAIFLQNSKLIQMINKQNLS--FTVT : 63
CAA60673.1 : HNKVFANRAEYLRFVFLDNKKFVE.NANTELNV----- : 59
AAO03565.1 : YNKHFTA-.EMLRRRAIFNM---NGKIVGEFNKEGTFKLS : 58
Q01957.1 : NNKHFTA-.ESLRRRAIFNM---N.RIVAENNRKETFKLS : 58
Q01958.1 : NNKHFTA-.EKLRRAIFNM---N.KFVD.FNKIGSFKLS : 58
AAO03566.1 : YKFKYSP-.ERLRRKAIFIS---NFNYVKEFNKNHGFELS : 58
CAA62835.1 : NNKHFTI-.ESLRRRAIFNM---N.RFIAKFNKNNSFQLS : 58
CAA62833.1 : NNKHFTA-.EALRRRAIFNM---N.KFEAKFNKEHSFELT : 58

```

```

*           100           *           120
XM 002401040 : -----WPESRLSG--TLN----CVRE--RASDDLKQG- : 37
XM 002400045 : -----VCDLQDAEF.A--LAS----...TA-LGDG..AKK- : 51
VTDCE : -----ICA.DDV..GI--L.R-----...WLM..N.- : 53
XM 002401038 : -----LCGMTDNE..K--F.T-----...S--H..RKDNRQ- : 59
XM 002401039 : -----LCPNSD.E.AT--VF.-----...--..NTKSLHT- : 50
XM 002433832 : -----LCDKTDEQ.RA--G.K-----...--..PS..RT- : 50
XM 002410419 : -----HCEKNDLE.RT--L.-----..ES--.VPFY..AK- : 50
AY233212.1 : -----LCTKGDDA.VT--E.E-----...L--.I.PETNAA- : 51
AY437139.1 : -----LCKKNDQV.AT--E.E-----...--HIPAETNAA- : 51
XM 0024101 : -----LCKNNDAE.KE--A.T-----..TS--.LPAA.NTK- : 50
DQ886782.1 : -----MCEKSTDE.RE--Q.V----.H.--H..GAFNAK- : 50
EU574829.1 : -----LVRESDEE.IV--Q.Q----.Q.T--L..AQFQSR- : 29
EU574828.1 : -----LCAKSDEE.IV--Q.Q----.Q.S--L..ALFQSR- : 50
EU574830.1 : -----LCAKSDEE.IV--Q.Q----.Q.S--L..ALS.--- : 48
EU574878.1 : -----LCQKDDQE.RE--Q.K----.QXD--H.AAEFNRK- : 50
EF633907.1 : -----LCDKDDQE.RD--Q.Q----.Q.N--Q..AEF.RK- : 50
AAO03571.1 : DINNFDTLTNEEFVQMYIGG----KK.N--ENVK.ENIVN : 111
AAO03569.1 : DLNQWSDLSNQEFEDLML.K----KP.R--SNAKE.HDT : 112
AAO03570.1 : GINAFSDLKPEEFAR-----RFNK--INLKS..PKC : 109
CAC34069.1 : GINKFADMEGNE.LA--.SSKICNNR.MGA.RIQEKIKT : 87
AAO03567.1 : NEGPFVSVLTNEEYRM--LHH----R.DI--EKEIKQLKSH : 95
CAA60673.1 : ----FADMTHEEFIQTHLGM----TYEV--PE.TSNVKA- : 88
AAO03565.1 : LEGPFAAMTNEEYKN--I.K----SK.S--EEGKGKVKY- : 89
Q01957.1 : VDGPFAMTNEEYNS--L.K----LK.S--GEEKGEVRY- : 89
Q01958.1 : VDGPFAMTNEEYRT--L.K----SK.T--TEE.GQVKY- : 89
AAO03566.1 : VEGPHAALTSEEYQA--L.-----KQII--GNE.KGI.A- : 89
CAA62835.1 : VEGPFAAMT.AEYNS--M.K----PFVI--DKQHEEIVYD : 90
CAA62833.1 : VEGPFAAMTNQEYNN--L.K----THET--E.AA.SVYDN : 90

```

```

*           140           *           160
XM 002401040 : -----LLN----- : 40
XM 002400045 : -----.AT----- : 54
VTDCE : -----.DH----- : 56
XM 002401038 : -----.DW----- : 62
XM 002401039 : -----.SK----- : 53
XM 002433832 : -----.DR----- : 53
XM 002410419 : -----.NE----- : 53
AY233212.1 : -----FD.----- : 54
AY437139.1 : -----FDE----- : 54
XM 0024101 : -----FSH----- : 53
DQ886782.1 : -----.DQ----- : 53
EU574829.1 : -----FDQ----- : 32
EU574828.1 : -----.DQ----- : 53
EU574830.1 : -----.DQ----- : 51
EU574878.1 : -----FDR----- : 53
EF633907.1 : -----FDR----- : 53
AAO03571.1 : KNYIP---KKNYPPTMYSLCGKN.NYNSEADCKVDRCSL- : 147
AAO03569.1 : -----INITIPYPKGPVPINYSAC.QKTLFCKLNPGEID : 146
AAO03570.1 : TTHYKLPVPSGEVPTQYSAC---.Q.KLL--GQNSSNNID : 144
CAC34069.1 : KVNLTQTLKQAVPANYTLCTSEAEYNYC--G--TN---- : 119
AAO03567.1 : RMNLVKKMDNKEVLDS-----DWRSE--GKVTP---- : 122
CAA60673.1 : -----AVKAAPES-----DWRSE--IMNP---- : 105
AAO03565.1 : -----LNIAPET-----DWRKE--GKVTP---- : 108
Q01957.1 : -----LNIQAPKA-----DWRKK--GKVTP---- : 108
Q01958.1 : -----LNIQAPES-----DWRKE--GKVTP---- : 108
AAO03566.1 : -----VNLKSNQVPAS-----DWRAE--GKVTP---- : 112
CAA62835.1 : -----SRGDVPES-----DWRAK--GKVPA---- : 109
CAA62833.1 : TIIITATT-----KDWRAE--GKVTP---- : 108

```

```

*                180                *                200
XM 002401040 : -----LEAETGCDSDS-----GL----- : 51
XM 002400045 : -----R.NAD.A-----DA----- : 65
VTDCE : -----LHVYQ.Q-----DT----- : 67
XM 002401038 : -----TSF.RN-----D----- : 73
XM 002401039 : -----RLI.R.ED-----ET----- : 64
XM 002433832 : -----K.RV.SA-----DT----- : 64
XM 002410419 : -----TVKKL.TE-----K----- : 64
AY233212.1 : -----AVQ.LN.LN-----RA----- : 65
AY437139.1 : -----AVTKLQ.SD-----RS----- : 65
XM 0024101 : -----K.L.D-----KS----- : 64
DQ886782.1 : -----NR.LR.N-----D----- : 64
EU574829.1 : -----NG.LQ.G-----D----- : 43
EU574828.1 : -----NR.LQ..-----D----- : 64
EU574830.1 : -----NR.LQ..-----D----- : 62
EU574878.1 : -----NR.LQ..-----DF----- : 64
EF633907.1 : -----NR.LQ..-----D----- : 64
AAO03571.1 : -----GVD.KL.RCCYAAASIANFLQI--KH-HIANG---- : 175
AAO03569.1 : FCNGIEFD.QS.G.CYCVSNALALQL--KWANLTYLRDGGK : 184
AAO03570.1 : LCGGI.MD.GD.GNCAVSNAAHELQL--KYANLTLTQRGK : 182
CAC34069.1 : -----NID.NV.GGCAVGPQHLSTIYAY-LTKQADNNK : 153
AAO03567.1 : -----KN.RK.A.CYAFGSIATIE--S-----IMQETS : 150
CAA60673.1 : -----AKD.GQ.G.CWTFCTTAVLEG--R.-NKDLGKLYS : 137
AAO03565.1 : -----RD.AE.GGCAVFGSIAALEG--R.-LVEQGG--D : 138
Q01957.1 : -----RD.GN.G.CYTFGSIIAALEG--R.-LIEKGG--D : 138
Q01958.1 : -----RD.AQ.G.CYTFGSLIAALEG--R.-LIEKGG--D : 138
AAO03566.1 : -----RD.G.S.CYSFGAVAAIES--R.-LISGTTRYT : 144
CAA62835.1 : -----RD.AS.G.CYSFASVAAILEG--R.-LVAGSKKFT : 141
CAA62833.1 : -----RD.GN.G.CYSFSSSLAVLES--R.-LIAGS-KYN : 139

```

```

*                220                *                240
XM 002401040 : -----CIV---HSLC-ENPGLDEGLQ----- : 68
XM 002400045 : -----H---RK..-QGT..TPAS----- : 82
VTDCE : -----F---NK..-DEGD.TTA.N----- : 84
XM 002401038 : -----F---SQ..-EN----- : 84
XM 002401039 : -----F---RF..RHRAD.A.QFH----- : 82
XM 002433832 : -----T---EY..-SHKKAHLA.T----- : 81
XM 002410419 : -----A---RK..-GQAD.E.T..----- : 81
AY233212.1 : -----AY---RK..-ATNN.E.A.S----- : 82
AY437139.1 : -----A---RK..-GND.EGA.A----- : 82
XM 0024101 : -----F---GK..-KAGD...A.K----- : 81
DQ886782.1 : -----TF---KK..-DA.DFLTE.R----- : 81
EU574829.1 : -----T---RK..-A..DFVSV.R----- : 60
EU574828.1 : -----T---RK..-AE.DFVSA.R----- : 81
EU574830.1 : -----T---RK..-AE.DFVSA.R----- : 79
EU574878.1 : -----S---RK..-AE.DFETA.K----- : 81
EF633907.1 : -----S---RK..-AE.DFLTA.K----- : 81
AAO03571.1 : -ENVQYSIQQIVD.TGGK--T.G.-CSGMSYDA.NYN--- : 208
AAO03569.1 : PQYKMFSPQQLLE.E---GGYR.-AGGYA.SV.DFS--- : 217
AAO03570.1 : VEYEMFSPQQLMD.TE---NSYY..GGTS..P.MSS--- : 215
CAC34069.1 : PKRKMLSAQQLIDNTESWG--G.-GGGFAENV.NSV--- : 187
AAO03567.1 : IKELDLSEQQIVD.SQGEYSNNG.-TCGN.GNSFNIVRD- : 188
CAA60673.1 : -----FSEQLVDA-S--DNG.-GGHPSNS.KFIQEN : 168
AAO03565.1 : ANTLDLSEEMIQ.TR-EYGNNG.-GGGFGSNAYDYIIE- : 175
Q01957.1 : SETLDLSEEHMVQ.TR-EDGNNG.-NGGLGSNVYNYIME- : 175
Q01958.1 : ANTLDLSEEHMVQ.TR-DNNG.-NGGLGSNVYDYIIE- : 175
AAO03566.1 : AQLDLSEQQIVD.A.-L--AKG.-NGGT.QASYNVKS- : 179
CAA62835.1 : VDDLDLSEQLVDA.S.-SVGNKG.-NGGS.LLSFRYVKL- : 178
CAA62833.1 : QNNLDLSEQQIVD.SA-A--NNG.-NGGS.SATYLYVKN- : 174

```

```

*                260                *                280
XM 002401040 : KFLTDTQHEEITTELLHM--CSPQDQ----- : 91
XM 002400045 : SQF. PE. KA. FERRHAIA-- .KQHP----- : 105
VTDCE : . . .KPKPRR. FW. .AKK-- .EK. LP----- : 107
XM 002401038 : ---AKIL. V. EG. GSS-- .NSAS----- : 102
XM 002401039 : AI. . .N. YNA. A. . .QR-- .QTKWH----- : 105
XM 002433832 : -- . .A. KA. ER. . .EQ-- .NAVPT----- : 102
XM 002410419 : QHEPAA. VGM. KR. ASR-- .EHLGN----- : 104
AY233212.1 : V. F. .E. IK. .HDAATA-- .D. .AH----- : 105
AY437139.1 : . .F. PE. IKH. HDAALT-- .D. DAR----- : 105
XM 0024101 : .HF. AA. IKTEHTTATD-- .DHSHG----- : 104
DQ886782.1 : . .F. E. .IN. .H. .ANQ-- .D. DAH----- : 104
EU574829.1 : M. EN. V. I. . .H. .ANR-- .DVNAH----- : 83
EU574828.1 : M. EN. A. I. . .H. .ANR-- .DVNAH----- : 104
EU574830.1 : M. EN. A. I. . .H. .ANR-- .DVNAH----- : 102
EU574878.1 : . .F. E. .V. V. HH. ANH-- .DRDSH----- : 104
EF633907.1 : . .F. EG. I. . .H. .ANQ-- .DAAAH----- : 104
AAO03571.1 : .VEAT. DVYPERDAETS ED. QSYTRPSC YTV----- : 239
AAO03569.1 : H. . .TIDDYPYISGREP--SKRMACVKG----- : 243
AAO03570.1 : H. .VFEKDYPYISYSNT--LVNNSCIHD----- : 241
CAC34069.1 : DG. YYADDYPFIDGNTE-- .EDPTDCTR FKHCKKLNLCY : 225
AAO03567.1 : HG. LLERDYPY. GKANN-- .IDGK----- : 211
CAA60673.1 : NG. GLESDYPYKA. AGT-- .KKVKN----- : 191
AAO03565.1 : HG. . .ETEYPF. G. DSE-- .KTNIK----- : 198
Q01957.1 : NG. AKESDYPY. GSDST-- .RSDVK----- : 198
Q01958.1 : HG. AKESDYPY. GSDST-- .KTNVK----- : 198
AAO03566.1 : NG. MEEKDNPY. GKDGK-- . -LY. K----- : 201
CAA62835.1 : NG. MQEKDYPYVAAEET-- . -TY. K----- : 200
CAA62833.1 : .G. . .EASYPY. ATKGT-- .KAFTP----- : 197

```

```

*                300                *                320
XM 002401040 : ----- : -
XM 002400045 : ----- : -
VTDCE : ----- : -
XM 002401038 : ----- : -
XM 002401039 : ----- : -
XM 002433832 : ----- : -
XM 002410419 : ----- : -
AY233212.1 : ----- : -
AY437139.1 : ----- : -
XM 0024101 : ----- : -
DQ886782.1 : ----- : -
EU574829.1 : ----- : -
EU574828.1 : ----- : -
EU574830.1 : ----- : -
EU574878.1 : ----- : -
EF633907.1 : ----- : -
AAO03571.1 : KEFAQTLT TSYNEWYAPT YSE IKQ IIYDNKGAI SGIYV PLS : 279
AAO03569.1 : KRTPIKLSYTI FDSAEDINI IKP IIHHYGGFV SCVY----- : 279
AAO03570.1 : KPTPMMV SFSLFDSAQN FEV LKR IIYHYGSFI TSVK----- : 277
CAC34069.1 : PLKFATS NKFTHFANK NWEE IKE IIYTYHGFI SAMK----- : 261
AAO03567.1 : -KPVIKIKDYSFVFPQTEEN LKI AVYH- QPVA VSID----- : 245
CAA60673.1 : V---ATVTG SRRTDGS ETGL QT II AENGPVA VGM----- : 224
AAO03565.1 : P--YVTMKGYNRVARN NVKE LKS AISQ- GMVD VAM----- : 231
Q01957.1 : A--FAKIKSYNRVARN NVE LKA AISQ- GLVD VSID----- : 231
Q01958.1 : S--FAKITGYTKVPRN NEAE LKA ALSQ- GLVD VSID----- : 231
AAO03566.1 : TKIKVSI EGLRTADI- SDAAL TA AIAE- APVG VCID----- : 235
CAA62835.1 : KKVAVKITGQKLVRP GSE KAL MRAAE- GPVAAA ID----- : 235
CAA62833.1 : K---VQTTGLTHVTP- TEEAL TA AIAE- GPVA VCID----- : 228

```

```

*           340           *           360
XM 002401040 : -SSRPHEQSNMQWILAFFQ----- : 110
XM 002400045 : ----- : -
VTDCE : -PDDVAA----- : 113
XM 002401038 : ----- : -
XM 002401039 : -PILAW.LDFFF----- : 116
XM 002433832 : -K.SSNFIVAW.KSWF.----- : 118
XM 002410419 : -LVY.GGDP----- : 112
AY233212.1 : -HEHD.----- : 110
AY437139.1 : -HDHD.DHGHGHGHHDHDPH----- : 123
XM 0024101 : -HEHS.GHGH----- : 114
DQ886782.1 : -HDH..CHPH----- : 113
EU574829.1 : -HVMD----- : 87
EU574828.1 : -HDMA----- : 108
EU574830.1 : -HDMA----- : 106
EU574878.1 : -HDHD.HH----- : 111
EF633907.1 : -D.HGQDPH----- : 112
AAO03571.1 : QVASEVW.SYSSGI.NVSSYCSSNNCNIFINMVLVSFG : 319
AAO03569.1 : -PKY--WTAYRGG-.RGLKCEKG--VVTIEVVGIVSYG : 312
AAO03570.1 : -A.S-DWVYYHSG-.Y-SHSCTKN--VITNSVIEVISYG : 310
CAC34069.1 : -V.ESLYR-YSGG-.YKSQSCTGQ---ITDEVITVDSYG : 294
AAO03567.1 : -.QLSF.FYEGG-.YDEPNCK----WVDEIVTVSYG : 277
CAA60673.1 : -A...SF.LYKKGT.YSDTKCRSR---MMNSCVTAVSYG : 259
AAO03565.1 : -A.SVKF.LYKSG-AYTDKKCKS--FFALNSEVSAVSYG : 267
Q01957.1 : -A.SVQF.LYKSG-AYTDT.CKNN--YFALNSEVCAVSYG : 267
Q01958.1 : -A.SAKF.LYKSG-AYTDTKCKNN--YFALNSEVCAVSYG : 267
AAO03566.1 : -A.QISF.LYKSG-.YDEPKCKI----MNSCVAAVSYG : 268
CAA62835.1 : -A.GVKF.LYKSG-.YNSK.CSST---QLNSGVAVSYG : 269
CAA62833.1 : -A.G.ASF.LYKNG-.YDEPKCSKT----VNSGVAAVSYG : 261

```

```

*           380           *           400
XM 002401040 : ----- : -
XM 002400045 : ----- : -
VTDCE : ----- : -
XM 002401038 : ----- : -
XM 002401039 : ----- : -
XM 002433832 : ----- : -
XM 002410419 : ----- : -
AY233212.1 : ----- : -
AY437139.1 : ----- : -
XM 0024101 : ----- : -
DQ886782.1 : ----- : -
EU574829.1 : ----- : -
EU574828.1 : ----- : -
EU574830.1 : ----- : -
EU574878.1 : ----- : -
EF633907.1 : ----- : -
AAO03571.1 : FEAQGESVNSNFVVIRNSWSTEWSDKG----- : 346
AAO03569.1 : -IEDGI----EYVVVRNSWSKNWSLGG----- : 334
AAO03570.1 : -NQNGK----EYLIARNSWSKNWSIDG----- : 332
CAC34069.1 : -ECDGH----KFLWVRNSWSNDWSEVEGGFRIDWDTLCSI : 329
AAO03567.1 : TTEEHQ---DFWVVKNSYSNEWS----- : 297
CAA60673.1 : -SNSNG---KYWIIRNSWSTSWSDAG----- : 281
AAO03565.1 : -VVDGI---ECWIIRNSWSTWSENG----- : 289
Q01957.1 : -VVDGK---ECWIVRNSWSTGWSEKG----- : 289
Q01958.1 : -VVDGK---ECWIVRNSWSTGWSDKG----- : 289
AAO03566.1 : -SQDGQ---DYYIVKNSWSFWSMDG----- : 290
CAA62835.1 : -TQNGT---EYWIVRNSWSTIWSDQG----- : 291
CAA62833.1 : -SQDGQ---DYYIVKNSWSTSWSDKG----- : 283

```

```

*           420           *           440
XM 002401040 : ----- : -
XM 002400045 : ----- : -
VTDCE       : ----- : -
XM 002401038 : ----- : -
XM 002401039 : ----- : -
XM 002433832 : ----- : -
XM 002410419 : ----- : -
AY233212.1 : ----- : -
AY437139.1 : ----- : -
XM 0024101   : ----- : -
DQ886782.1  : ----- : -
EU574829.1  : ----- : -
EU574828.1  : ----- : -
EU574830.1  : ----- : -
EU574878.1  : ----- : -
EF633907.1  : ----- : -
AAO03571.1  : ----- TAKLS--ADSLCG : 357
AAO03569.1  : ----- YIKLG--ADSLCG : 345
AAO03570.1  : ----- FIKIS--AKSLCG : 343
CAC34069.1  : NCIDHYBDGSOLENNLYVEMELGDGDTADYNPDCACENK : 369
AAO03567.1  : ----- : -
CAA60673.1  : ----- YELLARDSNMCG : 294
AAO03565.1  : ----- YFNIAI-EGNTCG : 301
Q01957.1    : ----- YINMVI-EGNTCG : 301
Q01958.1    : ----- YINMVI-EGNTCG : 301
AAO03566.1  : ----- YILMSRNKNNQCG : 303
CAA62835.1  : ----- YVLMsrnKNNQCG : 304
CAA62833.1  : ----- YILMSRNKNNQCA : 296

```

```

*           460           *           480
XM 002401040 : ----- : -
XM 002400045 : ----- : -
VTDCE       : ----- : -
XM 002401038 : ----- : -
XM 002401039 : ----- : -
XM 002433832 : ----- : -
XM 002410419 : ----- : -
AY233212.1 : ----- : -
AY437139.1 : ----- : -
XM 0024101   : ----- : -
DQ886782.1  : ----- : -
EU574829.1  : ----- : -
EU574828.1  : ----- : -
EU574830.1  : ----- : -
EU574878.1  : ----- : -
EF633907.1  : ----- : -
AAO03571.1  : --- IGNC DGENV CSHPTLI TLETEVGPSTKQDYGCLQNK : 394
AAO03569.1  : --- IGGNDGDV FVSVVLHVD --- FSDVEYGPYGEFRNNT : 379
AAO03570.1  : --- IGGDDGMY FVSLVQHADCLLFFNLLF --- : 370
CAC34069.1  : QDFIG--CVVVSFTGDNDNKTTGIVITLFLVLLMTFFI --- : 404
AAO03567.1  : ----- : -
CAA60673.1  : --- IG--RDSNYFTGVKLI --- : 308
AAO03565.1  : --- IA--TDPLYFTGAQYL --- : 315
Q01957.1    : --- VA--TDPLYFTGVEYL --- : 315
Q01958.1    : --- VA--TDPLYFTGVQYL --- : 315
AAO03566.1  : --- IC--TGISFFVGVKEI --- : 317
CAA62835.1  : --- IA--SGAAYFVGVADA --- : 318
CAA62833.1  : --- IA--SVAYFTGAHDAN --- : 311

```

```

*           500           *           520
XM 002401040 : ----- : -
XM 002400045 : ----- : -
VTDCE       : ----- : -
XM 002401038 : ----- : -
XM 002401039 : ----- : -
XM 002433832 : ----- : -
XM 002410419 : ----- : -
AY233212.1  : ----- : -
AY437139.1  : ----- : -
XM 0024101   : ----- : -
DQ886782.1  : ----- : -
EU574829.1  : ----- : -
EU574828.1  : ----- : -
EU574830.1  : ----- : -
EU574878.1  : ----- : -
EF633907.1  : ----- : -
AAO03571.1  : CSPTNDGDGVNCLTKSLDPPNHSVGIVIIMLVTCMLVLF : 434
AAO03569.1  : DVFORLYNESAEANESSNIESNDSSNESQSLNSRQSEE : 419
AAO03570.1  : ----- : -
CAC34069.1  : ----- : -
AAO03567.1  : ----- : -
CAA60673.1  : ----- : -
AAO03565.1  : ----- : -
Q01957.1    : ----- : -
Q01958.1    : ----- : -
AAO03566.1  : ----- : -
CAA62835.1  : ----- : -
CAA62833.1  : ----- : -

```

```

*           540           *           560
XM 002401040 : ----- : -
XM 002400045 : ----- : -
VTDCE       : ----- : -
XM 002401038 : ----- : -
XM 002401039 : ----- : -
XM 002433832 : ----- : -
XM 002410419 : ----- : -
AY233212.1  : ----- : -
AY437139.1  : ----- : -
XM 0024101   : ----- : -
DQ886782.1  : ----- : -
EU574829.1  : ----- : -
EU574828.1  : ----- : -
EU574830.1  : ----- : -
EU574878.1  : ----- : -
EF633907.1  : ----- : -
AAO03571.1  : ----- : -
AAO03569.1  : SLVVEDSSSVENIRPNNENELRSITIVLYVLVGLISIT : 459
AAO03570.1  : -----LIVFIYIPS----- : 379
CAC34069.1  : ----- : -
AAO03567.1  : ----- : -
CAA60673.1  : ----- : -
AAO03565.1  : ----- : -
Q01957.1    : ----- : -
Q01958.1    : ----- : -
AAO03566.1  : ----- : -
CAA62835.1  : ----- : -
CAA62833.1  : ----- : -

```


*

XM 002401040	:	-----	:	-
XM 002400045	:	-----	:	-
VTDCE	:	-----	:	-
XM 002401038	:	-----	:	-
XM 002401039	:	-----	:	-
XM 002433832	:	-----	:	-
XM 002410419	:	-----	:	-
AY233212.1	:	-----	:	-
AY437139.1	:	-----	:	-
XM 0024101	:	-----	:	-
DQ886782.1	:	-----	:	-
EU574829.1	:	-----	:	-
EU574828.1	:	-----	:	-
EU574830.1	:	-----	:	-
EU574878.1	:	-----	:	-
EF633907.1	:	-----	:	-
AAO03571.1	:	-----	:	-
AAO03569.1	:	MVVAVIILRSIIFN	:	474
AAO03570.1	:	-----	:	-
CAC34069.1	:	-----	:	-
AAO03567.1	:	-----	:	-
CAA60673.1	:	-----	:	-
AAO03565.1	:	-----	:	-
Q01957.1	:	-----	:	-
Q01958.1	:	-----	:	-
AAO03566.1	:	-----	:	-
CAA62835.1	:	-----	:	-
CAA62833.1	:	-----	:	-

7.2 Currículo

CURRICULUM VITÆ resumido

OLDIGES, D. P.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Daiane Patricia Oldiges

Local e data de nascimento: Joinville, Santa Catarina, Brasil - 24/03/1989

Endereço profissional: Av Bento Gonçalves, 9500, prédio 43421, bairro Agronomia

Telefone profissional: 3308-6078

E-mail: daioldiges@cbiot.ufrgs.br

2. FORMAÇÃO:

Graduação em Ciências Biológicas modalidade médica - Biomedicina – pela Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

3. ESTÁGIOS:

2007 – 2009 : Bolsista de Iniciação Científica, FAPERGS, no Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolítica, sob orientação do professor Carlos Termignoni. Neste período foi desenvolvido o processo de clonagem em vetor de clonagem e de expressão, além da padronização da expressão da rVTDCE.

2009 – 2010 : Bolsista de Apoio Técnico, CNPq, no laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal, sob orientação do professor Itabajara da Silva Vaz Jr. Neste período foi dada continuidade aos estudos com a rVTDCE, a fim de verificar o potencial uso da dela em uma vacina anti-carrapato.

2010 – 2010 : Participação no Programa de Bolsas de Verão do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, sob orientação do professor Mario Thyago Murakami. Foi realizada a síntese e resolução do cristal da alfa-L-Arabinofuranosidase.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

- Destaque - XXII Salão de Iniciação científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010

- Menção Honrosa - II Semana Científica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2009

- Seleção para o 19o Programa de Bolsas de Verão do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, 2009

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

OLDIGES, D.P.; PARIZI, L.F.; ZIMMER, K.; LORENZINI, D.; SEIXAS, A.; MASUDA, A.; DA SILVA VAZ JR, I. & TERMIGNONI, C. A Rhipicephalus (Boophilus) microplus cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity. *Int. J Parasitol.* , v.42, p.635 - 645, 2012.

PARIZI, L.F.; RECK, J.; OLDIGES, D.P.; GUIZZO, M.G.; SEIXAS, A.; LOGULLO, C.; DE OLIVEIRA, P.L.; TERMIGNONI, C.; MARTINS, J.R. & DA SILVA VAZ, I. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus: A field evaluation. *Vaccine, In press.*

SANTOS, C.R.; SQUINA, F.M.; NAVARRO, A.M.; OLDIGES, D.P.; LEME, A.F.; RULLER, R.M., ROLF, P. & MURAKAMI, M.T. Functional and biophysical characterization of a hyperthermostable GH51 β -l-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila*. *Biotechnol Let.* , v.33, p.131 - 137, 2011.

SOUZA, T.; SANTOS, C.R.; SOUZA, A.R.; OLDIGES, D.P.; RULLER, R.; ROLF, A.P.; SQUINA, F.M. & MURAKAMI, M.T. Structure of a novel thermostable GH51 β -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila* RKU-1. *Protein Science (Print).* , v.20, p.1632 - 1637, 2011.

SEIXAS, A., OLDIGES, D. P., DA SILVA VAZ, I. JR., TERMIGNONI, C. Endocrinology and control of tick vitellogenesis. *Acta Scientiae Veterinariae.* , v.38, p.1 - 16, 2010.

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

OLDIGES, D.P.; PARIZI, L.F.; ZIMMER, K.; LORENZINI, D.; SEIXAS, A.; DA SILVA VAZ JR, I. & TERMIGNONI, C. A Rhipicephalus (Boophilus) microplus Cathepsin with a Dual Activity: Peptidase and Antimicrobial In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2012, Foz do Iguaçu.

OLDIGES, D.P.; CORSSAC, G.B; PARIZI, L.F.; ZIMMER, K.; SEIXAS, A.; DA SILVA VAZ JR, I. & TERMIGNONI, C. VTDCE: a peptidase and antimicrobial molecule In: XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2012, Sao Luis.

OLDIGES, D.P.; PARIZI, L.F.; ZIMMER, K.; LORENZINI, D.; SEIXAS, A.; DA SILVA VAZ JR, I. & TERMIGNONI, C. Expression and Characterization of a Recombinant Vitellin- Degrading Cysteine Endopeptidase from the Cattle Tick Rhipicephalus microplus In: XL Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2011, Foz do Iguaçu.

DA SILVA VAZ, I., PARIZI, L. F., RECK JR, J., OLDIGES, D.P., GUIZZO, M.G.,

DOYLE, R., SEIXAS, A., LOGULLO, C., TERMIGNONI, C., OLIVEIRA, P.L. Field evaluation of a Rhipicephalus (Boophilus) microplus multiantigenic vaccine in cattle In: 23rd. Internacional Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2011, Buenos Aires.

OLDIGES, D.P.; PARIZI, L.F.; ZIMMER, K.; LORENZINI, D.; SEIXAS, A.; DA SILVA VAZ JR, I. & TERMIGNONI, C. Production and Immunological Characterization of a Recombinant Rhipicephalus microplus Cysteine Endopeptidase In: 23rd. Internacional Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2011

SOUZA, A.R.; SOUZA, T.A.C.B.; SANTOS, C.R.; OLDIGES, D.P.; RULLER, R.; PRADO, R.A.; SQUINA, F.; MURAKAMI, M.T. Structural Investigations of a Novel Thermostable GH51 & #945;-L-Arabinofuranosidase from Thermotoga petrophila RKU-1 In: XL Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2011, Foz do Iguaçu.

OLDIGES, D.P.; PARIZI, L.F.; LORENZINI, D.; SEIXAS, A.; DA SILVA VAZ JR, I. & TERMIGNONI, C.. Produção da Cisteína Endopeptidase Degradadora de Vitelina recombinante para uso em vacina anti-carrapato In: Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2010, Porto Alegre, RS.

OLDIGES, D.P.; PARIZI, L.F.; LORENZINI, D.; SEIXAS, A.; DA SILVA VAZ JR, I. & TERMIGNONI, C. Production of recombinant Vitellin- Degrading Cysteine Endopeptidase: a candidate antigen for an anti-tick vaccine In: XIII International Congress of Acarology, 2010, Recife.

OLDIGES, D.P.; PARIZI, L.F.; LORENZINI, D.; SEIXAS, A.; DA SILVA VAZ JR, I. & TERMIGNONI, C. Clonagem e expressão da VTDCE de ovário de Rhipicephalus (Boophilus) microplus. In: XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2009, Porto Alegre.

OLDIGES, D.P.; PARIZI, L.F.; LORENZINI, D.; SEIXAS, A.; DA SILVA VAZ JR, I. & TERMIGNONI, C.. Cloning and Expression of an Ovary Protein from Rhipicephalus (Boophilus) microplus In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Águas de Lindóia.

OLDIGES, D.P.; PARIZI, L.F.; LORENZINI, D.; SEIXAS, A.; DA SILVA VAZ JR, I. & TERMIGNONI, C. Expressão e purificação da cisteína endopeptidase VTDCE: um antígeno para vacina contra Rhipicephalus (Boophilus) microplus In: II Semana Científica da UFCSPA, 2009, Porto Alegre.

OLDIGES, D.P.; PARIZI, L.F.; LORENZINI, D.; SEIXAS, A.; DA SILVA VAZ JR, I. & TERMIGNONI, C. Clonagem do Gene de uma Proteína de Ovário do Carrapato Rhipicephalus microplus In: Salão de Iniciação Científica, 2008, Porto Alegre.