

PA 073

**Rhipicephalus microplus** VTDCE: AN ANTIMICROBIAL PEPTIDASE

Daiane Patrícia Oldiges<sup>1</sup>; Giana Blume Corssac<sup>1</sup>; Luís Fernando Parizi<sup>1</sup>; Karine Rígon Zimmer<sup>1</sup>; Adriana Seixas<sup>1,2</sup>; Itabajara da Silva Vaz Jr<sup>1,3</sup>; Carlos Termiguoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biotecnologia, <sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, <sup>3</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, <sup>4</sup> Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre RS, Brazil

The Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase (VTDCE) is a major enzyme in vitellin hydrolysis during the embryo development of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. VTDCE amino acid sequence presents a remarkable characteristic: similarity to antimicrobial peptides. This suggests it also has antimicrobial activity. The aim of present work was elucidate some characteristics of this cathepsin L-like enzyme to clarify it has this novel dual-property: enzyme and antimicrobial activity. A recombinant protein was produced by heterologous expression of *R. microplus* VTDCE in *Escherichia coli* using the pET32a-VTDCE construction. The recombinant protein comprises the VTDCE sequence plus a 109-aa thioredoxin-protein tag and a 6-aa His-Tag. Purified rVTDCE was used in immunological, enzymatic and antimicrobial assays. rVTDCE showed to be immunogenic to rabbit and bovine. As native VTDCE was recognized by sera of animals immunized with rVTDCE, we suggest that rVTDCE can be useful as an antigen in an anti-tick vaccine. Purified rVTDCE was probed with sera of rabbits immunized with *R. microplus* male, female gut or female ovary extracts. As expected, only the anti-ovary serum was able to recognize rVTDCE. rVTDCE enzymatic activity was determined using fluorogenic substrate in presence or absence of inhibitors, showing rVTDCE was able to hydrolyze N-cbz-Phe-Arg-MCA and is completely inhibited by a cysteine endopeptidase specific inhibitor (E-64). *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 and *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 were cultivated in presence of rVTDCE. Antimicrobial assay revealed that rVTDCE significantly inhibits *S. epidermidis* growth at 5.5 µmol but not affects *P. aeruginosa* growth. rVTDCE antimicrobial activity remains after freeze-induced denaturation but enzymatic activity is lost, showing that these are independent properties. This is the first cathepsin L-like enzyme that has an additional antimicrobial activity. More studies are in course aiming a better comprehension of this atypical molecule.

**Órgão de financiamento:** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, FINEP, CAPES, CNPq, FAPERGS and FAPERJ

Anotações

PA 074

**ANOTAÇÃO DE GÊNES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA AOS ECTO E ENDOPARASITOS EM BOVINOS DE LEITE**

Elizângela Guedes; Ana Luísa S. Azevedo; Karla Gasparini; Daniele R. L. Reis; Márcia Cristina A. Prata; John Furlong; Maria Gabriela C. D. Peixoto; Rui S. Verneque; Leonardo G. Andrade; Marta F. Martins; Wagner Antônio Arbex; Marcos Vinicius G. B. Silva; Marco A. Machado  
Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora - MG - Brasil, machado@cnppl.embrapa.br

Nos países tropicais, as perdas causadas pela infestação do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e pelas infecções por nematóides gastrointestinais representam um grande impacto econômico sobre os sistemas de produção de bovinos. Avanços no campo da genômica e da disponibilidade da sequência do genoma bovino ocorridos nos últimos três anos, são úteis para identificar genes que controlam a resistência aos ecto e endoparasitos. Estudos de Associação Global (GWAS) estão sendo aplicados para identificar regiões genômicas associadas com a carga parasitária em bovinos. Amostras de DNA foram adquiridas de 476 animais de uma população F2 (Gir x Holandês), e um total de cerca de 54.000 SNPs genotipados com o Illumina BovineSNP50 Bead Chip (Illumina Inc., San Diego, CA) foram investigados para determinar a informatividade desses SNPs associados ao valor genético da resistência ao carrapato e aos nematóides gastrointestinais. Para este estudo, uma varredura parcial do genoma foi desenvolvida do cromossomo 1 ao 10 e SNPs significativos foram encontrados em muitos cromossomos, especialmente nos BTAs 2, 4, 6 e 7, para as duas características estudadas. No total, 97 SNPs foram significativamente associados com o valor genético para a contagem de carrapatos e 129 SNPs com o valor genético para a contagem de nematóides gastrointestinais. A maioria dos SNPs significativos estava localizada próxima a alguns locos de características quantitativas (QTL) já relatados e outros marcadores estavam dentro ou próximos a genes candidatos. Em particular, o SNP BTA-46612-no-rs, localizado no cromossomo 2 e coincidente para as duas características, encontra-se próximo aos genes UBE2E3 e TNFAIP6, ambos relacionados a mecanismos de defesa do sistema imune do animal. Nossos achados não só fornecem evidências confirmatórias de descobertas anteriores de regiões genômicas importantes, mas também explora um novo conjunto de SNPs que, possivelmente, estão associados à resistência a ecto e endoparasitos em bovinos de leite.

**Órgão de financiamento:** CNPq, EMBRAPA, FAPEMIG, CAPES

Anotações

PA 075

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GLOBAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE GÊNES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA AOS CARRAPATOS E AOS NEMATÓIDES GASTROINTESTINAIS EM BOVINOS**

Elizângela Guedes; Ana Luísa S. Azevedo; Karla Gasparini; Daniele R. L. Reis; Márcia Cristina A. Prata; John Furlong; Maria Gabriela C. D. Peixoto; Rui S. Verneque; Leonardo G. Andrade; Marta F. Martins; Wagner Antônio Arbex; Marcos Vinicius G. B. Silva; Marco A. Machado  
Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora - MG - Brasil, machado@cnppl.embrapa.br

Em regiões tropicais e subtropicais, o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, bem como as infecções por nematóides gastrointestinais são responsáveis por grandes perdas de produtividade na pecuária bovina, as quais são estimadas em cerca de 20 bilhões de dólares por ano. Estudos de Associação Global (GWAS) são abordagens utilizadas objetivando estudar a interação parasito-hospedeiro, entender os processos biológicos envolvidos com a resposta imune do hospedeiro à infestação e à infecção por parasitos e identificar regiões genômicas associadas à carga parasitária. Amostras de DNA foram obtidas de 476 animais de uma população F2 (formadas a partir do cruzamento de animais das raças Gir e Holandês), os quais foram genotipados para cerca de 54.000 SNPs por meio do Illumina BovineSNP50 Bead Chip (Illumina Inc., San Diego, CA). Como fenótipos nos estudos de GWAS foram utilizados os valores genéticos obtidos a partir de dados da contagem de carrapatos e de nematóides gastrointestinais. Para este estudo, uma estratégia de varredura parcial do genoma foi usada do cromossomo 1 ao 10. SNPs com call rate <99%, em desequilíbrio de Hardy-Weinberg (teste exato  $p < 0,0001$ ) e com frequência menor de um dos alelos abaixo de 5% foram excluídos, sendo retidos 35.292 marcadores para a análise final. Para correção de testes múltiplos foi utilizado o teste de Bonferroni. O software ITSNBN foi utilizado para detectar associação. Esse software utiliza um modelo linear e leva em consideração as informações de pedigree. Para as características analisadas, SNPs significativos foram encontrados em muitos cromossomos, especialmente nos BTAs 2, 4, 6 e 7. A maior parte dos SNPs significativos foi localizada em posições semelhantes nos cromossomos para as duas características estudadas. Os resultados sugerem que existem regiões cromossômicas onde possam estar genes que, possivelmente, estão relacionados à resistência ao carrapato bovino e aos nematóides gastrointestinais.

**Órgão de financiamento:** CNPq, EMBRAPA, FAPEMIG, CAPES

Anotações

PA 076

**CHARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE DO CANAL DE CLORO CONTROLADO PELO GLUTAMATO EM *Boophilus microplus*.**

Guilherme Marcondes Klafkel<sup>1</sup>; Paula Pohl<sup>1</sup>; André Silva<sup>1</sup>; Teresinha Tizu Sato Schumaker<sup>1</sup>

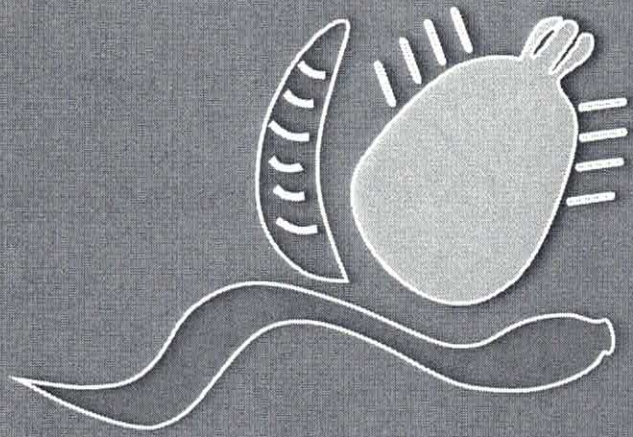
<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia - ICB-USP; <sup>2</sup>FEPAGRO - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; <sup>3</sup>Centro de Biotecnologia - UFRGS.

*Boophilus microplus* é um ectoparasito que acomete principalmente os bovinos e é causador de prejuízos econômicos para a pecuária nacional na ordem de dois bilhões de dólares/ano. O uso de acaricidas químicos é o método mais utilizado para o seu controle e geralmente vem acompanhado do desenvolvimento de resistência. A ivermectina (IVM), molécula da classe das lactonas macrocíclicas (LMs), é uma droga amplamente utilizada no Brasil para o controle de *B. microplus* e na última década, casos de resistência têm sido notificados no Brasil e em outros países da América Latina. Nos invertebrados, a IVM age principalmente no canal de cloro controlado pelo glutamato (GluCl), sendo que mutações neste gene têm sido associadas à resistência a este composto e seus análogos em diversas espécies de importância agrícola e veterinária. O objetivo deste trabalho foi a comparação de sequências codificadoras do GluCl em cepas de carrapatos resistentes (ZOR) e suscetíveis (Mozo) a IVM com vistas a identificar mutações associadas a resistência. A partir da base de dados TIGR foi identificada uma EST incompleta com 92% de identidade com o gene GluCl1 de *Rhipicephalus sanguineus*. O alinhamento destas sequências serviu de base para o desenho de primers em regiões conservadas entre as duas espécies visando a amplificação, clonagem e sequenciamento de trechos do gene GluCl de *B. microplus*. Como fonte de material genômico, foram utilizadas larvas e fêmeas pós-postura da cepa Mozo sem tratamento, e da cepa ZOR sobreviventes à exposição a IVM. A análise dos fragmentos amplificados a partir de cDNA resultou em uma sequência de 972 nucleotídeos. A sequência deduzida de 323 aminoácidos do canal GluCl apresentou idêntidades de 90% e 92% aos genes ortólogos de *R. sanguineus* e *I. scapularis*, respectivamente. No trecho descrito para a proteína GluCl de *B. microplus* foram identificados dois motivos conservados referentes aos domínios de ligação do neurotransmissor e transmembrana da proteína. Na comparação de sequências das cepas Mozo e ZOR foram identificados polimorfismos pontuais que não resultaram em substituições de aminoácidos e não puderam ser associados a resistência. No presente trabalho foi caracterizada parcialmente em *B. microplus* a região do gene GluCl importante para a ligação da IVM e onde foram descritas mutações associadas a resistência em outras espécies. Estudos complementares são necessários para a caracterização total deste gene e permitirão avaliar outras regiões do mesmo em que possam existir pontos de mutação.

**Órgão de financiamento:** CNPq e FAPESP

Anotações



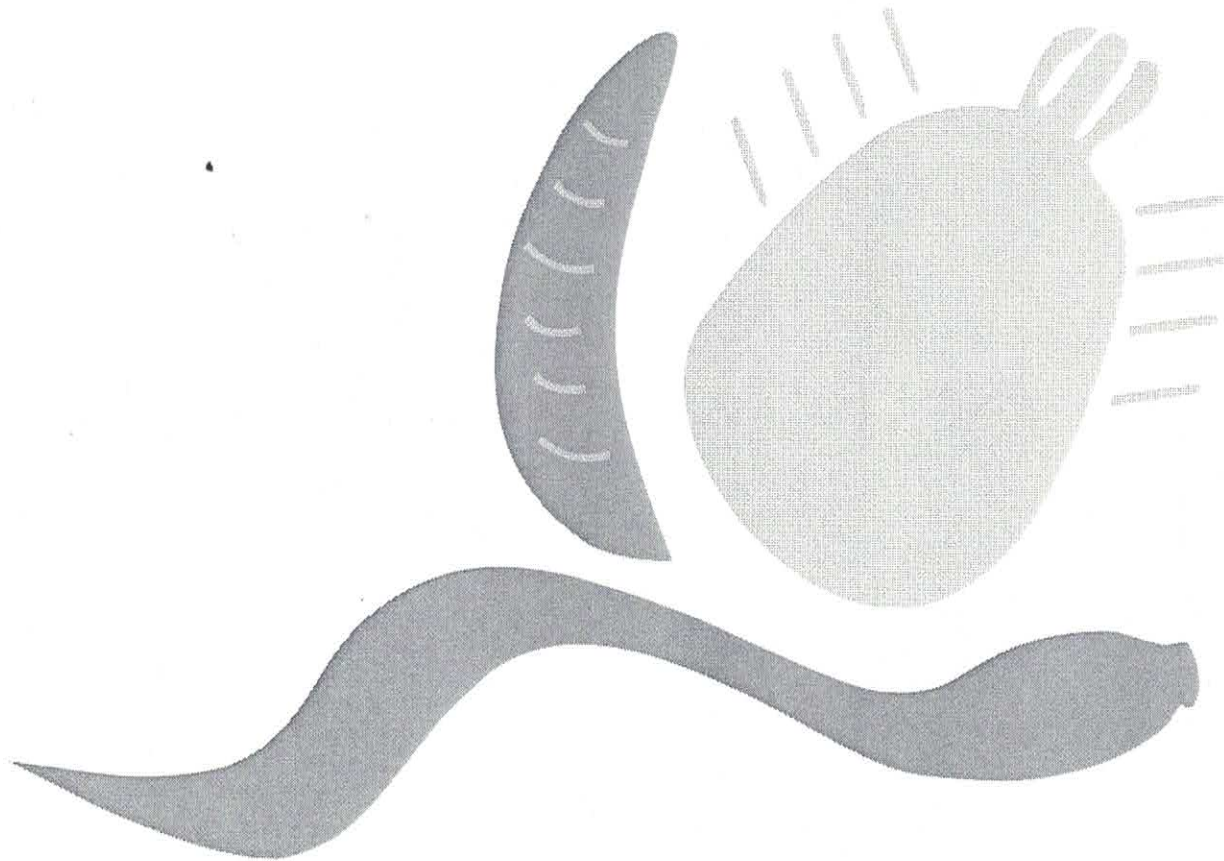


# XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária

“Parasitologia Veterinária, Bem Estar e Produção Animal.”



03 a 06 de Setembro de 2012 | Rio Poty Hotel - São Luis - MA - Brasil.



**CBPV**  
Colégio Brasileiro de  
Parasitologia Veterinária

# Anais

