

**ELIZIÁRIA CARDOSO DOS SANTOS**

**PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA DE *Babesia bovis*  
COM ATIVIDADE LECTÍNICA**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular  
e Estrutural, para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2011**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T	Santos, Eliziária Cardoso dos, 1977-
S237p	Purificação e identificação de proteína de <i>Babesia bovis</i>
2011	com atividade lectínica / Eliziária Cardoso dos Santos. – Viçosa, MG, 2011. xii, 49f. : il. (algumas col.) ; 29cm.
	Orientador: Leandro Licursi de Oliveira Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Referências bibliográficas: f. 44-49
	1. Babesiose em bovino. 2. Lectinas. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.
	CDD 22. ed. 574.87

**ELIZIÁRIA CARDOSO DOS SANTOS**

**PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA DE *Babesia bovis* COM  
ATIVIDADE LECTÍNICA**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Estrutural, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.**

APROVADA: 25 de julho de 2011.

---

Prof.: Eduardo de Almeida  
Marques da Silva

---

Prof.: Eduardo Rezende Honda

---

Prof.: Leandro Licursi de Oliveira  
(Orientador)

*Dedico:*

*A Deus por estar sempre ao meu lado e por permitir  
mais essa vitória;*

*A minha querida e amada vovó Lilia (in memoriam)  
que junto comigo sonhou com esse dia e que  
infelizmente me deixou na metade do Mestrado, mas  
certamente segurou em minhas mãos para que eu  
nunca desistisse.*

**Ao meu Orientador Leandro Licursi**

“Além dos laços que se formam entre um pesquisador e seus contemporâneos há os que o ligam àqueles que, antes dele, tiveram igual interesse pela ciência. É como se olhasse para trás e fizesse parte de uma família ligada não pelo sangue, mas por laços afetivos com mesmo ideal científico”

*Walber Bradford Cannon (1871-1945)*

Obrigada pela grande oportunidade e confiança, pela convivência e sólidos ensinamentos, por me mostrar a cada dia que eu podia caminhar um pouco mais, por tentar me ensinar a ser menos ansiosa, mas principalmente pela Amizade.

*De todas as invenções, a mais preciosa é o sonho!!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus...

Aos meus Pais pelas incontáveis renúncias em prol dos meus sonhos.

Aos meus Irmãos Ramon, Tiago e Diogo pela força.

A Tia Ilma que desde o início da vida acadêmica tem me acompanhado nesta jornada e a Bárbara Katherine pela amizade.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral.

A Capes pela concessão da bolsa e a Fapemig pelo financiamento do projeto (projeto CVZ APQ-00365-09).

Ao meu orientador, Leandro, que sem nenhum questionamento acreditou que eu fosse capaz.

Ao João Lúcio (John), Amigo incondicional, desde o dia em que pisei no Laboratório e que certamente levarei pra sempre.

Aos co-orientadores Patarroyo e Sérgio de Paula pelo grande apóio e incentivo.

A todos os colegas do Laboratório pela ótima convivência e por tornarem as inúmeras horas de trabalho menos pesadas.

Ao Eduardo Marques e ao Honda por aceitarem o convite para comporem a Banca.

A Edvaldo Barros e ao NUBIOMOL/UFV pela grande contribuição

Ao Marcinho do Laboratório de Hematozoários da UFV pela grande ajuda

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

**A TODOS OS AMIGOS QUE FORAM PRESENÇA NESSA CAMINHADA!!!**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 <i>Babesia bovis</i> .....	01
1.1.1 Aspectos Biológicos de <i>B. bovis</i> .....	02
1.1.2 Ciclo de vida do Parasito <i>B. bovis</i> .....	02
1.1.2.1 Eventos no hospedeiro vertebrado .....	02
1.1.2.2 Eventos no hospedeiro invertebrado .....	03
1.1.3 Fisiopatologia e sinais clínicos de <i>B. bovis</i> .....	06
1.1.4 O Complexo apical do parasito <i>B. bovis</i> .....	08
1.2 Lectinas.....	11
1.2.1 Lectinas de Parasitos Apicomplexas .....	12
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo geral .....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1 Purificação de proteína de <i>B. bovis</i> com atividade lectínica .....	16
3.1.1 Merozoíto de <i>B. bovis</i> .....	16
3.1.2. Antígenos solúveis totais de merozoítos de <i>B. bovis</i> (Bb-STAg) .....	16
3.1.3 Cromatografia de afinidade .....	17
3.2 Caracterização bioquímica da lectina isolada de <i>B. bovis</i> .....	17
3.2.1. Determinação da concentração de proteínas .....	17
.....	17
3.2.2. Análise eletroforética da proteína purificada de <i>B. bovis</i> com atividade.....	18
3.3 Sequenciamento protéico da lectina de <i>B. bovis</i> .....	18
3.3.1 Sequenciamento de aminoácidos internos .....	18
3.3.1.1 Digestão Trípica .....	18
3.3.1.2 Espectrometria de Massa.....	19

3.3.2 Pesquisa no banco de dados .....	20
3.3.3 Degradação de Edman .....	20
3.3.4 Identificação das lectinas .....	21
3.4 Produção anticorpos específicos .....	21
3.4.1 Imunização de camundongos .....	21
3.4.2 Purificação dos anticorpos .....	22
3.4.3 Titulação dos anticorpos anti-lectina de <i>B. bovis</i> por Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) .....	22
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 Purificação e identificação de proteínas de <i>B. bovis</i> com atividade lectínica .....	24
4.2. Sequenciamento protéico da lectina isolada .....	27
4.3. Produção de anticorpos específicos anti-FBP <i>B. bovis</i> purificada .....	35
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>41</b>
<b>Considerações e limitações do Estudo .....</b>	<b>42</b>
<b>Perspectivas do Estudo .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BbAMA-1: Apical Membrane Antigen-1 de *B. bovis*

BbTRAP: Thrombospondin-related anonymous protein de *B. bovis*

RAP-1: rhoptry-associated protein-1

SBP: Spherical Body Protein

VMSA: Variable Merozoite Surface Antigen

MSA: Merozoite Surface Antigen

CRDs: domínio de reconhecimento de carboidrato

CSP: Circumsporozoite Protein

TRAP: Thrombospondin-related Adhesive Protein

EBA-175: Erythrocyte-Binding Antigen 175

PfEMP1: *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein

LAPs: Lectin Adhesive-like Proteins

FBP: Fetuin Binding Proteins

BSA: Bovine Serum Albumin

MALDI: ionização por dessorção de matriz assistida por laser

## RESUMO

SANTOS, Eliziária Cardoso dos, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Purificação e identificação de proteína de *Babesia bovis* com atividade lectínica.** Orientador: Leandro Licursi de Oliveira. Co-Orientadores: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo e Sérgio Oliveira de Paula.

O presente estudo objetivou purificar e identificar uma proteína de merozoíto de *B. bovis* com atividade lectínica. Para tal, antígenos solúveis totais de merozoíto foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna de agarose fetuína imobilizada. A fração protéica adsorvida à resina e eluída com cloreto de sódio foi denominada Fetuin Binding Protein (FBP) *B. bovis*. A homogeneidade e a caracterização da FBP quanto à massa molecular foram avaliados por SDS-PAGE, que revelou uma banda protéica na altura de 27 kDa, a qual não apresentou glicosilações quando conjugada com *Pro-Q Emerald 300 glycoprotein Stain*. Para identificar a constituição da amostra, à banda correspondente à fração protéica foi recortado do gel, tratada quimicamente e teve seus aminoácidos internos sequenciados por Espectrometria de Massa. A análise da sequência evidenciou que o fragmento era referente à albumina sérica bovina de *Bos taurus* com relação massa carga (m/z) de 1567,726 no pico mais intenso e com um score de 62 e 98, 98% de confiabilidade. Uma fração da FBP-*B. bovis* foi ainda submetida a sequenciamento da região NH<sub>2</sub>-terminal por Degradação Automática de Edman, cuja análise no algoritmo BLAST, envolvendo todos os microorganismos, identificou a sequência como sendo parte de uma proteína putativa não caracterizada de *Dappu pulex* (pulga d' água), com um "E-value" de 6,5, 90% de identidade, 90% de positividade e massa aproximada de 26,939 Kilodaltons. Considerando a mesma sequência, outra análise no BLAST, restrita aos organismos do filo apicomplexa, foi realizada tendo seus aminoácidos identificados dentro da sequência de uma proteína putativa de *B. bovis* conservada evolutivamente com um score total de 52,8, cobertura de 71% e "E-value" de 0,40. O fragmento protéico isolado foi ainda utilizado para imunizar camundongos BALB/c para a produção de anticorpos específicos que, após serem purificados por cromatografia de afinidade, foram titulados por "Dot-Elisa" e reconheceram a FBP-*B. bovis* até o título de 102.400. Desta forma, foi obtida uma proteína de merozoíto de *B. bovis* com atividade lectínica, com os aminoácidos internos pertencentes à proteína albumina sérica bovina e os aminoácidos da região NH<sub>2</sub>-terminal a uma proteína putativa de *B. bovis* que foi

reconhecida por anticorpos específicos anti-FBP *B. bovis*. De acordo com os resultados apresentados, acredita-se que a proteína com atividade lectínica de merozoíto de *B. bovis* purificada possa ser um dos mediadores envolvidos na parasitemia dos eritrócitos. Em estudos futuros, se comprovada esta hipótese, ela pode abrir perspectivas para novos processos de intervenção terapêutica contra a Babesiose bovina e maior controle da doença.

## ABSTRACT

SANTOS, Eliziária Cardoso dos, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Purification and identification protein of *Babesia bovis* with lectin activity.** Orientador: Leandro Licursi de Oliveira. Co-Orientadores: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo and Sérgio Oliveira de Paula.

The present study aimed to purify and identify merozoite protein of *B. bovis* with lectin activity. For such, total soluble merozoite antigens (Bb-STAg) were subjected to affinity chromatography on immobilized fetuin agarose column. The resin adsorbed protein, eluted with NaCl, was named Fetuin Binding Protein (FBP-*B.bovis*). The homogeneity and characterization of molecular weight of FBP were assessed by SDS-PAGE, that revealed the protein band of 27 kilodaltons which wasn't glycosylated when combined with *Pro-Q Emerald 300 glycoprotein Stain*. To identify the constituent of the sample, the protein spot was cut from the gel, chemically treated and had their internal amino acids sequenced by mass spectrometry. The sequence analysis showed that the fragment was related to the bovine serum albumin of *Bos taurus* with mass/charge of 1567.726 in the most intense peak with score of 62 and 98,98% confidence. The fraction of the FBP-*B.bovis* was also subjected to sequencing of the NH<sub>2</sub>-terminal region by Automatic Edman degradation analysis which analysis in the BLAST, involving all the microorganisms, identified the following as part of a putative protein uncharacterized of *Dappu pulex* (flea d 'water), with E-value of 6.5, 90% identity, 90% of positivity and mass about 26.939 kilodaltons. Considering the same sequence, other BLAST analysis restricted to organisms of Apicomplexa phylum was made, and their amino acid sequence was identify as putative protein of *B. bovis* evolutionarily conserved with total score of 52,8, covering 71% and E-value 0.40. The isolated protein fragment was also used to immunize BALB/c mice to produce of specific antibodies that after being purified by affinity chromatography were titrated by Dot-ELISA that results in recognition of FBP-*B.bovis* (title 102,400). That away, was possible to obtain a protein fraction of merozoite of *B. bovis* with lectin activity, with the internal amino acid belonging to the protein bovine albumin serum and amino acids of the NH<sub>2</sub>-terminal region belonging to a putative protein of *B. bovis* that was recognized by specific anti-FBP *B.bovis*. According to the results presented, we believe this protein fraction of merozoite of *B. bovis* with lectin activity purified can be one important mediators involved in erythrocyte parasitemia. In future

studies, it is proven hypothesis, it may open perspectives for new processes for therapeutic intervention against bovine babesioses and greater control of the disease.

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Babesia bovis*

Babesiose é uma parasitose causada por protozoários intraeritrocíticos do gênero *Babesia*, os quais possuem mais de 100 espécies caracterizadas (HOMER *et al.*, 2000). Dentre as espécies que afetam os bovinos estão *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. major*, *B. jakimovi*, *B. occultans* e *B. avara*. Destas, *B. bovis* e *B. bigemina* são as formas mais comuns encontradas no território brasileiro (PATARROYO *et al.*, 1982; ZAUGG, 1993). *B. bigemina* é uma espécie considerada pouco patogênica, já *B. bovis* é altamente patogênica, capaz de causar complicações inflamatórias generalizadas, com acúmulo de eritrócitos parasitados na microcirculação, ocasionando falência de múltiplos órgãos e em casos mais extremos morte dos animais (MAHONEY, 1977). Ambas as espécies são transmitidas aos bovinos pela picada do carrapato da família ixodidae, do gênero *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (GUGLIELMONE, *et al.*, 1995).

Geograficamente, as *Babesia sp.* possuem ampla distribuição, que está fortemente relacionada com a ecologia dos vetores, os quais encontram condições favoráveis de sobrevivência e desenvolvimento em regiões tropicais e temperadas do planeta. Eles podem ser identificados em grande parte do continente africano, sul da Europa e Ásia, América Central e do Sul e ilhas do Caribe (BUSHELL *et al.*, 1991; GUGLIELMONE, 1995). A dinâmica de infecciosidade do vetor com *B. bovis* depende da patogenicidade da cepa e apresenta relação direta com o percentual de carrapatos infectantes no ambiente, somado à sua capacidade de transmissão (WRIGHT e GOODGER, 1988). Além disso, a susceptibilidade dos bovinos à infecção é reconhecidamente influenciada pela raça, idade, estado fisiológico e imunitário do animal o que contribui para dificultar o controle da doença, apesar dos inúmeros métodos profiláticos existentes (SOARES *et al.*, 2000; BOCK, *et al.*, 2004).

A baixa efetividade dos métodos de controle da babesiose bovina faz da doença um importante fator limitante ao desenvolvimento da pecuária no Brasil, com grandes perdas econômicas (BOCK, *et al.*, 2004; GOHIL, *et al.*, 2010). A maneira mais efetiva de minimizar tais perdas e aprimorar o aproveitamento econômico da bovinocultura no país consiste na descoberta de novos antígenos vacinais como estratégia chave para o controle destes hematozoários. Dessa forma, o conhecimento detalhado da biologia do parasito, de sua

complexa interação com a célula hospedeira e das estruturas protéicas que medeiam o processo de reconhecimento e invasão do parasito têm sido alvo de pesquisas nos últimos anos (GOHIL, *et al.*, 2010; FRIEDRICH, *et al.*, 2010).

### **1.1.1 Aspectos biológicos de *B. bovis***

Taxonomicamente, o agente causador da Babesiose bovina é classificado dentro do subreino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Aconoidasida, ordem Piroplasmorida, família Babesidae e gênero *Babesia* (LEVINE, 1988). O protozoário possui uma interação com as células do hospedeiro altamente específica e não invade outro tipo celular além dos eritrócitos, os quais são cruciais para a complementação do ciclo de vida do parasito (FRIEDHOFF, 1988; BUSHELL *et al.*, 1991).

A manutenção de *Babesia sp* é dependente tanto do hospedeiro invertebrado, o carrapato, que comporta-se como vetor biológico na medida em que o protozoário completa a fase de reprodução sexuada do seu ciclo no organismo desses artrópodes, quanto do hospedeiro vertebrado, bovino, competente em manter o estágio infeccioso do parasito (KESSLER, *et al.*, 1998; HOMER *et al.*, 2000). O desenvolvimento de *Babesia sp* foi revisado por Friedhoff (1988), e apesar dos detalhes apresentados em diversos estudos, a compreensão de alguns mecanismos que envolvem o ciclo de vida do parasito é ainda incompleta (BOCK, *et al.*, 2004).

### **1.1.2 Ciclo de vida do parasito *B. bovis***

#### **1.1.2.1 Eventos no hospedeiro vertebrado**

O ciclo de vida do parasito tem início quando o carrapato vetor inocula os esporozoítos presente em sua saliva, na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Uma vez na circulação o parasito liga-se especificamente na membrana dos eritrócitos. De acordo com Bushell *et al.* (1991), esta interação é mediada por receptores da membrana externa do

eritrócito que reconhecem moléculas complementares do parasito e possibilitam a internalização do mesmo na célula hospedeira. No interior dos eritrócitos, os esporozoítos se transformam em trofozoítos, os quais dividem-se pelo processo de merogonia originando dois merozoítos (BOCK *et al.*, 2004). Algumas horas após a infecção, os eritrócitos infectados sofrem lise liberando a progênie de merozoítos, que então infectam outras hemácias. O ciclo se repete com a diferenciação dos trofozoítos em merozoítos e nova divisão aproximadamente a cada oito horas (MEHLHORN e SHEIN, 1984). Após inúmeros ciclos de replicação, alguns merozoítos podem diferenciar-se em precursores de gametas, originando gametócitos masculinos ou femininos, que uma vez ingeridos pelo carrapato poderão dar continuidade ao ciclo de vida do parasito (JACK e WARD, 1981).

#### **1.1.2.2 Eventos no hospedeiro invertebrado**

O ciclo de vida do protozoário tem continuidade no organismo do hospedeiro invertebrado e a infecciosidade ocorre durante a hematofagia das fêmeas do carrapato em animais com índices de parasitemia e pelo processo de transmissão transovariana (FRIEDHOFF, 1988). A digestão dos eritrócitos parasitados ocasiona a liberação dos merozoítos, precursores de gametas, no intestino das fêmeas ingurgitadas (teleóginas) os quais sofrem alterações morfofisiológicas adaptativas preparando-se para a fase sexuada do ciclo biológico (JACK e WARD, 1981).

Por meio da microscopia eletrônica pode-se observar, no epitélio intestinal da teleógina, estruturas denominadas corpos estelares polimórficos, que são formas características do protozoário associadas à reprodução sexuada. Estas estruturas seriam os gametócitos que, ao chegarem ao intestino das teleóginas, sofrem múltiplos ciclos de replicação e formam agregados de corpos estelares multinucleados. Destes agregados, emerge uma estrutura que é responsável pela continuidade do processo de divisão celular, sofre meiose, e origina uma estrutura com nível haplóide de DNA, denominado gameta. As estruturas maiores e imóveis são caracterizadas como gametas femininos e as menores e imóveis os masculinos (MEHLHORN e SHEIN, 1984).

Esses gametas se fundem e originam uma estrutura esférica, o zigoto diplóide, que infecta seletivamente as células digestivas da teleógina, onde se multiplica e dá origem a estruturas móveis, as quais invadem as células basófilas sintetizadoras de vitelogenina. Desta

multiplicação surgem os oocinetos, também conhecidos como kinetos, que são formas vermiculares altamente móveis, as quais escapam para a hemocele e infectam a hemolinfa da teleógina (MEHLHORN e SHEIN, 1984; FRIEDHOFF, 1988). Esses vermículos, uma vez na hemolinfa, invadem todos os órgãos e tecidos da teleógina, incluindo ovários e glândula salivares. No primeiro caso os vermículos iniciam vários ciclos de esporogonia e infectam toda a prole da teleógina, a esta via de transmissão denomina-se transovariana, fundamental para a manutenção da endemia dessa parasitose no hospedeiro vertebrado. No segundo, os vermículos sofrem os últimos ciclos de esporogonia, também conhecido como esporogonia de terceira geração, e originam a forma infectante do parasito, os esporozoítos (FRIEDHOFF, 1988; GUGLIELMONE, *et al.*, 1997; BOCK, *et al.*, 2004). A infecção dos animais por *B. bovis* ocorre pela picada do carrapato no estágio de larva a qual se torna mais infectante no quarto ou quinto dia após a ovoposição, e então o ciclo se repete. Os eventos que acontecem durante o ciclo de vida de *B. bovis* no hospedeiro vertebrado e invertebrado estão representados na Figura 1.

Ciclo de vida de *Babesia bovis*

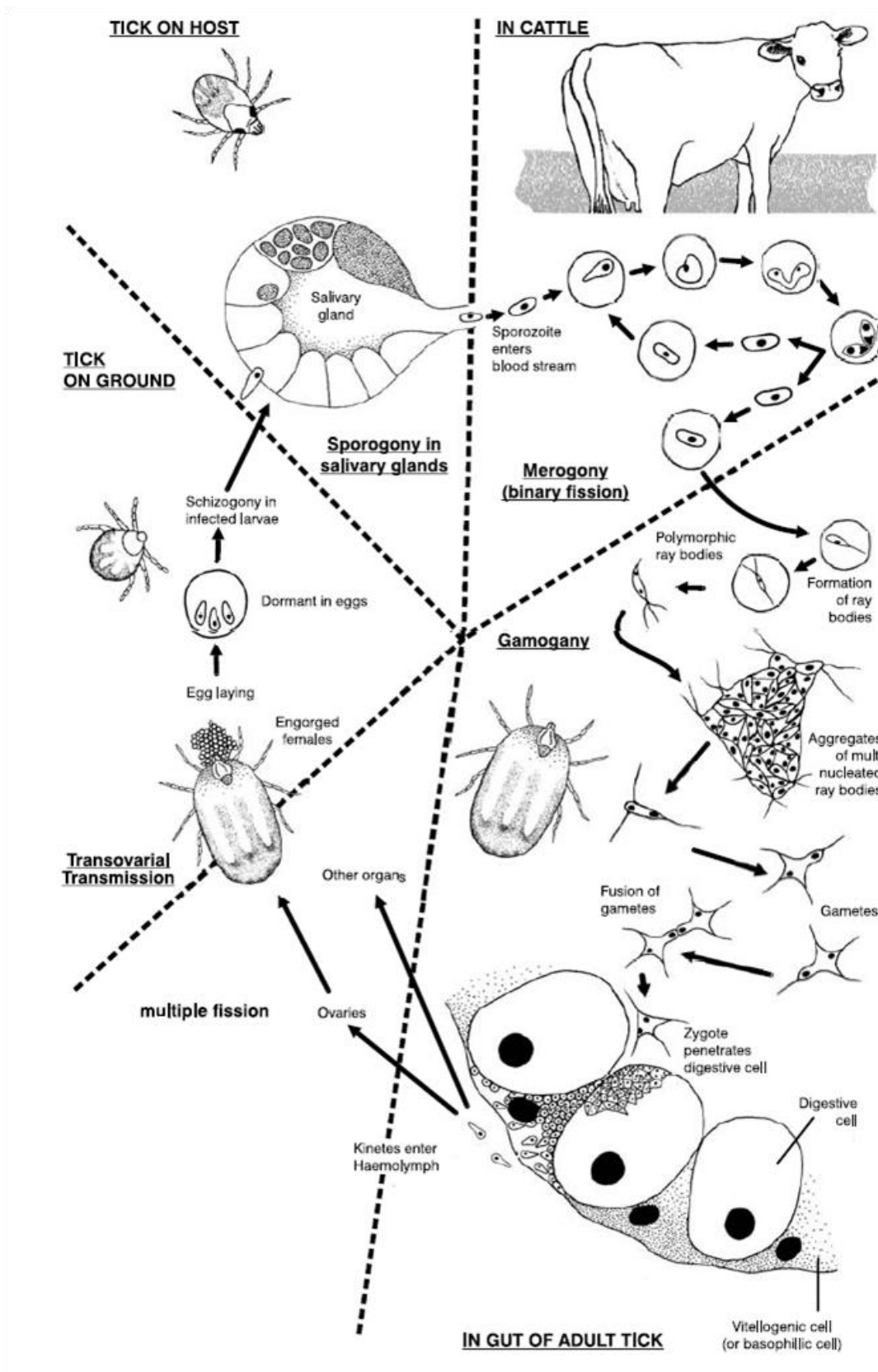


Figura 1 – Ciclo de vida de *B. bovis* no gado e no carrapato vetor *Boophilus microplus*.

Fonte: Bock et al. (adaptada de Mehlhorn & Shein, 1984; Mackenstedt et al. 1995; Gough et al. 1998).

### 1.1.3 Fisiopatologia e sinais clínicos de *B. bovis*

A babesiose bovina está associada tipicamente à baixa parasitemia periférica e acúmulo de eritrócitos parasitados nos vasos da microcirculação dos órgãos vitais. A proliferação do parasito no interior dos eritrócitos é acompanhada especialmente pela ruptura dos mesmos, liberação de mediadores químicos farmacologicamente ativos pelo parasito, além de modificações estruturais na membrana dos eritrócitos, expressão de proteínas de superfície relacionadas à adesão endotelial seguida de sequestro de eritrócitos parasitados e não parasitados na microcirculação (O'CONNOR, 2001; UILENBERG, 2006).

A destruição intravascular de eritrócitos parasitados é um importante evento que ocorre durante à fase aguda da doença. Por meio deste processo ocorre a liberação de merozoítos, após sua multiplicação intraeritrocitária, que em seguida reinfectam outros eritrócitos causando nova ruptura. A consequência direta deste evento é o desenvolvimento de um quadro de anemia hemolítica que pode ser intensificado pela atividade do sistema mononuclear fagocitário de órgãos como o baço e fígado (MAHONEY, 1977; WRIGHT e GOODGER, 1988).

O protozoário *B bovis*, uma vez na circulação, libera mediadores químicos responsáveis por inúmeros distúrbios circulatórios como vasodilatação, hipotensão, aumento da permeabilidade capilar, edema, colapso vascular, desordens de coagulação, danos no endotélio vascular e estase circulatória (WRIGHT e GOODGER, 1988). Estes distúrbios foram revisados por Wright (1981) e Wright e Goodger (1988), e têm início com a produção e liberação de esterases, pelo protozoário, que são enzimas que aceleram a conversão de pré-caliceína plasmática em caliceína ativa na circulação, evento que desencadeia uma cascata de reações que tem como produto final a síntese de bradicinina. A caliceína ativa e a bradicinina são potentes substâncias vasodilatadoras. Além disso, em conjunto elas atuam na ativação da coagulação pela via do fator de Hageman (fator de coagulação XII). Em condições fisiológicas, a ativação deste fator de coagulação levaria a formação de trombos na circulação, no entanto na babesiose sua ativação contribui para um distúrbio no metabolismo de fibrinogênio com o aumento de intermediários solúveis que atuam na conversão do fibrinogênio em fibrina. Destes, os mais importantes são os monômeros de fibrina ou fibrina complexada, cujo acúmulo conduz ao aumento da viscosidade plasmática, o que potencializa os distúrbios de circulação iniciados pela caliceína e bradicinina.

A consequência direta dos distúrbios da circulação é a estase sanguínea, que ocasiona dificuldade de perfusão tecidual, seguida de degeneração e necrose do mesmo. Além disso, as células danificadas liberam mediadores inflamatórios que favorecem a vasodilatação local e atração de neutrófilos por quimiotaxia, os quais induzem a fagocitose e a produção de outros mediadores químicos e a atração de linfócitos (LOSOS, 1986).

Os distúrbios circulatórios, já citados, são agravados pelo sequestro de eritrócitos parasitados na microcirculação. Este fato ocorre, em parte, devido a modificações estruturais e antigênicas na membrana dos eritrócitos do hospedeiro vertebrado provocadas por moléculas protéicas sintetizadas pelo parasito. Como consequência, ocorrem alterações das propriedades mecânicas dos eritrócitos, com a constituição de sítios de ligação para receptores expressos no endotélio vascular (PONGPONRATN, *et al.*, 1991; AIKAWA, *et al.*, 1993). De modo geral, estas propriedades mecânicas decorrem da presença de um esqueleto de membrana altamente especializado constituído predominantemente por uma rede de actina e espectrina (MOHANDAS e GALLAGHER, 2008). O parasito mantém a integridade mecânica e a estabilidade desta rede sintetizando proteínas que irão se agregar a ela aumentando a rigidez dos eritrócitos durante a fase de replicação intraeritrocitária do parasito (HUTCHINGS, *et al.*, 2007). Este mecanismo reduz a capacidade de deformação global das células parasitadas prevenindo a lise prematura dos eritrócitos, favorecendo maior trânsito através da microcirculação, além de contribuir para o desenvolvimento da doença (SUWANARUSK, *et al.*, 2004; HUTCHINGS, *et al.*, 2007).

Outro importante fator que contribui para o sequestro de eritrócitos na microcirculação é a expressão de moléculas de adesão. Estudos prévios sugerem que existe uma família multigênica de *B. bovis* denominada *ves*, que codifica para a síntese de proteínas, relacionadas com mecanismos de adesão, conhecidas como antígeno variável de superfície eritrocitária (VESA1) (ALLRED, *et al.*, 2000). Além disso, existem indícios de que estas proteínas estejam relacionadas à citoaderência, podendo ligar-se a receptores equivalentes na célula hospedeira (O'CONNOR, *et al.*, 1999; O'CONNOR e ALLRED, 2000). Já foram identificadas mais de cento e cinquenta cópias de VESA1 distribuídas entre os quatro cromossomos que complementam o genoma do parasito, porém evidências precisas de sua função ainda são limitadas (BRAYTON, 2007).

As consequências mais importantes do sequestro de eritrócitos envolvem a congestão vascular, hiperplasia de células endoteliais e distensão de capilares sinusoidais do fígado com infiltração de células mononucleares na tríade portal, hipertrofia da vesícula biliar e cristalização da bile, congestão intertubular de capilares do córtex e medula renal, e anemia

generalizada (PATARROYO, *et al.*, 1982). Em órgãos como o pulmão, coração e intestino há grave obstrução dos vasos da microcirculação. Além disso, no pulmão ocorre ainda grave edema, espessamento dos septos alveolares, infiltração leucocitária e disfunção respiratória. E o sintoma mais severo da babesiose ocorre com a obstrução de vênulas e arteríolas do sistema nervoso central, congestão dos vasos sanguíneos que irrigam as meninges além de grave dilatação dos espaços perivasculares do cérebro e cerebelo, eventos caracterizados como Babesiose cerebral (WRIGHT *et al.*, 1989).

A fase aguda da doença ocorre nos primeiros sete dias após a infecção sendo caracterizada por febre alta ( $> 40^{\circ} \text{C}$ ) normalmente antes do início de outros sintomas clínicos. Após esse período o animal apresenta um quadro de anorexia, letargia, aumento da frequência respiratória e fraqueza muscular generalizada e hematúria (DE VOS e POTGIETER, 1994). Além disso, a febre pode contribuir para abortos espontâneos e infertilidade nos machos (CALLOW, 1984). A fase crônica da doença é caracterizada por intensificação dos sintomas clínicos, atrofia muscular, dispnéia e em casos extremos coma e morte do animal (DE VOS e POTGIETER, 1994).

#### **1.1.4 O complexo apical do parasito *B. bovis***

Parasitas pertencentes ao filo apicomplexa são obrigatoriamente intracelulares capazes de invadir eritrócitos, células do sistema imunológico ou células do canal digestivo de várias espécies de vertebrados (SAM-YELLOWE, 1996). A infecciosidade celular é um processo ativo, diferente dos mecanismos de entrada de vírus e bactérias que ocorrem em muitos tipos celulares. A infecção por *B. bovis*, ocorre em grande parte pelos esporozoítos e merozoítos, os quais são responsáveis por manter a transmissão entre o vetor, o hemoparasito e o hospedeiro vertebrado. Eles parasitam especificamente os eritrócitos bovinos e o processo de invasão envolve interações moleculares complexas mediadas por proteínas da superfície do parasito associadas às proteínas sintetizadas pelas organelas secretoras do complexo apical e por um sistema motor de actina e miosina localizado no espaço entre a membrana plasmática do parasito e o complexo de membrana interna (SOLDATI-FAVRE, 2008).

Parasitas deste filo carregam sua própria maquinaria de invasão, que em conjunto recebe a denominação de complexo apical, para penetrar a célula hospedeira (CARRUTHERS e BOOTHROYD, 2007). O processo de invasão por *B. bovis* está associado diretamente ao

reconhecimento do protozoário por estruturas protéicas específicas presentes na superfície da célula hospedeira, reorientação do parasito estabelecendo um contato entre os constituintes do complexo apical e a membrana plasmática eritrocitária, seguido do estabelecimento de junções comunicantes, formação de um vacúolo parasitóforo e internalização (YOKOYAMA *et al.*, 2006; SOLDATI, *et al.*, 2001).

As organelas do complexo apical, envolvidas neste processo, são denominadas micronemas, roptrias e corpos esféricos e estão localizadas na região anterior dos merozoítos, facilitando o processo de infecciosidade celular (FRIEDRICH, *et al.*, 2010).

Micronemas são as organelas localizadas no extremo apical do parasito, abaixo da membrana interna, e estão associadas ao reconhecimento celular e adesão inicial do parasito aos receptores de superfície da célula hospedeira (RUDZINSKA 1981). Duas moléculas protéicas de merozoítos de *B. bovis* sintetizadas por micronemas e relacionadas a esta função foram descritas por Gaffar e colaboradores (2004a,b), denominadas Apical Membrane Antigen-1 de *B. bovis* (BbAMA-1) e Thrombospondin-related anonymous protein de *B. bovis* (BbTRAP), homologas a AMA-1 e TRAP de *Plasmodium falciparum*, ambas também relacionadas ao processo de invasão.

As roptrias foram descritas como um conjunto de quatro a dez organelas localizadas na região anterior ao núcleo do parasito com função de secretar material membranoso e auxiliar no processo de internalização dos “zoítos” (JOINER e DUBREMETZ, 1993; YOKOYAMA, *et al.*, 2002). Durante este processo, as roptrias aumentam sua atividade e secretam uma variedade de proteínas que, ao serem excretadas, auxiliam na constituição e formação de um vacúolo parasitóforo. Este vacúolo fica temporariamente associado ao merozoíto no interior do eritrócito, como forma de garantir que não haja fusão do parasito com vesículas endocíticas e lisossomais até que o mesmo se torne viável para realizar um novo ciclo de replicação, além de garantir a aquisição de nutrientes do hospedeiro (SAM-YELLOWE, 1996).

Uma importante proteína de roptria de merozoíto de *B. bovis* previamente identificada e caracterizada, que mantém uma homologia com outros gêneros de Babesia, é a rhoptry-associated protein-1 (RAP-1) (SUAREZ, *et al.*, 1991; DALRYMPLE, *et al.*, 1993; SAM-YELLOWE, 1996). RAP-1 é uma proteína com peso molecular de 60 kDa localizada na região apical da membrana externa do parasito. Ela está presente ainda em todos os estágios intracelulares do ciclo de crescimento assexuado do parasito e em merozoítos extracelulares (PALMER, *et al.*, 1991; MOSQUEDA, *et al.*, 2002a, YOKOYAMA, *et al.*, 2002). De acordo com Suarez e colaboradores (1991), a RAP-1 contém epítomos imunogênicos responsáveis

por induzir resposta imune humoral no hospedeiro, além de ser uma estrutura altamente conservada entre diversos isolados.

Outra importante organela do complexo apical são os corpos esféricos caracterizados como estruturas envoltas por membrana cujo conteúdo interno consiste de grânulos densos constituídos por uma família de glicoproteínas de diferentes pesos moleculares (BLACKMAN e BANNISTER, 2001). Um a quatro corpos esféricos podem ser encontrados em um único merozoíto de *B. bovis*. Eles ficam dispersos no citoplasma do parasito e liberam as glicoproteínas durante o processo de internalização, mantendo um microambiente favorável à infecção (DOWLING, *et al.*, 1996). Elas estão associadas ainda a transporte de proteínas, crescimento e viabilidade do parasito (RUEF, *et al.*, 2000), uma vez que, juntamente com as roptrias, libera proteínas no interior do vacúolo parasitóforo, possibilitando o parasito evadir a resposta imune da célula hospedeira e manter o grau de infecciosidade (IGARASHI *et al.*, 1988; MCELWAIN, *et al.*, 1991). Três destas proteínas nomeadas Spherical Body Protein (SBP), denominadas SBP1, SBP2 e SBP3, já foram caracterizadas. Estudos de imunofluorescência e imunocitoquímica aplicada à microscopia eletrônica demonstraram que as proteínas dos corpos esféricos são liberadas durante o processo de invasão pelo merozoíto e interagem com a face citoplasmática do eritrócito (JASMER, *et al.*, 1992; HINES, *et al.*, 1995; DOWLING, *et al.*, 1996; RUEF, *et al.*, 2000).

Além das estruturas protéicas do complexo apical relatadas, foram descritas ainda algumas glicoproteínas expressas na membrana externa de merozoíto de *B. bovis* que além de mediar o processo de adesão endotelial, estão relacionadas à internalização do parasito. Elas são pertencentes à família Variable Merozoite Surface Antigen (VMSA) e os membros desta família são MSA-1; MSA-2a; MSA-2b e MSA-2c (HINES, *et al.*, 1989; JASMER, *et al.*, 1992; FLORIN-CHRISTENSEN, *et al.*, 2002). Estudos de inibição realizados com anticorpos específicos contra os membros da família VMSA demonstraram que eles têm papel chave na fixação inicial dos merozoítos nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado complementando desta forma a função dos constituintes do complexo apical (SUAREZ *et al.*, 2000; MOSQUEDA *et al.*, 2002a,b; WILKOWSKY *et al.*, 2003).

Considerando a representatividade do complexo apical e as glicoproteínas secretadas e excretadas pelo parasito, as quais contribuem para seu processo de invasão e sobrevivência, esses elementos têm sido alvo de pesquisas nas últimas décadas como forma de aprimorar o entendimento da biologia da interação parasito hospedeiro.

## 1.2 Lectinas

Dentre as macromoléculas biológicas, as lectinas correspondem a um importante grupo de proteínas amplamente estudadas desde o início do século XIX (SHARON e LIS, 2004). São definidas como proteínas que possuem no mínimo um domínio não catalítico capaz de estabelecer ligações hidrofóbicas altamente específicas de maneira reversível a um monossacarídeo ou oligossacarídeos (PEUMANS e VAN DAMME 1995). Sua importância na natureza já havia sido demonstrada por Sharon e Lis (1989), por intermédio da constatação de que as lectinas conhecidas apresentavam homologia conservada evolutivamente. E uma grande diversidade destas moléculas vem sendo isoladas e caracterizadas em todos os reinos de seres vivos desde sua descoberta (SHARON e LIS, 2004).

Apesar da grande diversidade destas biomoléculas na natureza, uma análise global da arquitetura de proteínas com atividade lectínica realizada por Drickamer e Taylor (1993), revelou que a capacidade dessas proteínas em ligar-se a moléculas de carboidratos é restrita a um domínio específico da proteína, designada como domínio de reconhecimento de carboidrato (CRDs). Além disso, Weis e Drickamer (1996) relataram que os CRDs de muitas lectinas compartilham alta similaridade entre si em relação à sequência de aminoácidos, o que faz com que a maioria das lectinas conhecidas seja classificada em grupos relativamente pequenos. Dessa forma, elas podem ser agrupadas, em sua maioria, no reino vegetal e animal.

Ao longo de mais de um século, as lectinas do reino vegetal foram extensivamente estudadas e caracterizadas bioquimicamente por meio da análise de extratos purificados de folhas, raízes, sementes, grãos e cereais (LIS e SHARON, 1986). Porém, na última década pesquisadores têm focado no estudo de lectinas do reino animal, especialmente lectinas de microorganismos e de hemoparasitos apicomplexas, por sua capacidade de se ligar a uma variedade de moléculas de carboidrato de origem endógena e exógena da célula (KENNEDY, *et al.*, 1995). As lectinas deste grupo de maior interesse são as do tipo S e as do tipo C.

As lectinas do tipo S também denominadas galectinas, representam uma importante classe de lectinas de animais em que os CRDs apresentam afinidade por carboidratos do tipo  $\beta$ -galactosídeos (BARONDES, *et al.*, 1994; COOPER, 2002). As galectinas representam um grupo de proteínas solúveis presentes em uma grande variedade de tecidos e fluídos intra e extracelulares, podendo ser encontradas em nematódeos, insetos e mamíferos com função variada. Já lectinas do tipo C são representadas em sua maioria por glicoproteínas transmembrana ou podem ser encontradas preferencialmente na matriz extracelular e

dependem do íon cálcio para sua atividade, podendo se ligar a diferentes açúcares. Outras lectinas de animais conhecidas são as do tipo P, também denominadas receptores de Man-6-fosfato; lectinas do tipo I, que incluem as sialoadesinas e proteínas ligantes de carboidratos similares à imunoglobulina; e lectinas com sequências que apresentam similaridades com lectinas de leguminosas (WEIS e DRICKAMER 1996).

O interesse no estudo das lectinas de acordo com SHARON e LIS (2004) tem sido estimulado ao longo dos anos pela demonstração do envolvimento destas proteínas em diversos processos biológicos. Além disso, as lectinas apresentam ampla aplicabilidade como para a detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados, principalmente de glicoproteínas, histoquímica de células e tecidos, análise de possíveis mudanças que ocorrem na superfície da célula durante muitos processos fisiológicos e patológicos, como a diferenciação de células cancerosas, mapeamento de vias neuronais, estímulo mitogênico, transplantes, estudos de biossíntese de glicoproteínas e de interações entre parasitos com células hospedeiras, dentre outras.

Considerando que a maioria das funções biológicas das lectinas baseia-se na especificidade da interação com carboidratos, elas vêm se transformando na atualidade em valiosa ferramenta de pesquisa, tanto na área biomédica quanto veterinária, principalmente na compreensão de processos chave que medeiam à invasão celular por parasitos apicomplexas.

### **1.2.1 Lectinas de Parasitos Apicomplexas**

É sabido que parasitos apicomplexas são capazes de sintetizar um arsenal de proteínas com propriedades adesivas, as quais incluem as lectinas, com grande afinidade por uma rede de glicanas presente nas superfícies das células dos vertebrados com vários graus de especificidade (FRIEDRICH, *et al.*, 2010).

Durante décadas alguns estudiosos já vinham constatando tal fato em parasitos deste filo, e algumas lectinas foram caracterizadas através de sua afinidade por determinados tipos de açúcares. Klein e colaboradores (1998), ao estudarem parasitos intestinais do grupo dos coccídeos constataram que merozoítos do gênero *Sarcocystis muris* apresentavam uma proteína com atividade lectínica com alta afinidade de ligação a N-acetilgalactosamina e galactose.

A presença de moléculas com atividade lectina símile também é detectada na superfície de parasitos da espécie *Toxoplasma gondii*. Este achado fundamentou-se na observação de que a membrana do parasito apresentava afinidade de ligação pela laminina, um componente biologicamente importante da lâmina basal da célula hospedeira, o que proporciona ao parasito um mecanismo de adesão (ROBERT *et al.*, 1991). Ensaio de inibição de adesão por anticorpos e peptídeos revelaram a existência de receptores de laminina no parasito (FURTADO *et al.* 1992). Ortega-Barria e Boothroyd (1999) relataram que *Toxoplasma gondii* apresentava um componente de membrana com atividade lectínica que interagiu com açúcares sulfatados na superfície das células hospedeiras. Tais açúcares sulfatados corresponderiam a receptores da lectina parasitária. Desde então, outras proteínas com atividade lectínica de *Toxoplasma gondii* denominadas micronemal proteins (TgMICs) já foram identificadas como a TgMIC1 e TgMIC13 (LOURENCO *et al.*, 2001).

Outros parasitos do filo Apicomplexa bastante estudados são os das espécies *Plasmodium falciparum* e *Babesia bovis*. Merozoítos de *Plasmodium falciparum* têm proximidade filogenética com *B. bovis*, e apresentam lectinas em todos os estágios do ciclo de vida do parasito. Além disso, foi demonstrado que estas lectinas desempenham papel fundamental no processo de adesão e invasão celular por parasitos destas espécies. Algumas das proteínas com atividade lectínica de *Plasmodium falciparum* têm sido identificadas e caracterizadas. Dentre estas pode se citar a Circumsporozoite Protein (CSP) e Thrombospondin-related Adhesive Protein (TRAP) do estágio esporozoíta, Erythrocyte-Binding Antigen 175 (EBA-175), *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein (PfEMP1) do estágio assexuado e a família das Lectin Adhesive-like Proteins (LAPs) do estágio sexuado as quais são conservadas entre as espécies de plasmódio (VON ITZSTEIN *et al.*, 2008).

O mecanismo de invasão da célula hospedeira por parasitos apicomplexas é um processo ativo extremamente rápido, porém requer uma sequência de eventos que controlam o processo de reconhecimento, ligação e internalização (FRIEDRICH, *et al.*, 2010). Os sialoconjugados amplamente distribuídos na superfície das células dos vertebrados representam um dos maiores determinantes neste processo (VARKI, 1997). Lehmann e colaboradores (2006), em um levantamento bibliográfico relataram a existência de lectinas específicas com afinidade de ligação por ácido siálico em *Babesia sp.*

Observações preliminares de nosso grupo apontaram para o fato de que merozoítos de *B. bovis* apresentam uma lectina ligante de fetuína. Considerando que essa proteína possa interagir com fetuína a partir do reconhecimento do ácido siálico de suas glicanas, ela pode

ser candidata a participar dos eventos de adesão e invasão da célula hospedeira. Desta forma, o desenvolvimento de pesquisas que visem à detecção, purificação e caracterização destas proteínas com atividade lectínica torna-se grande aliada da ciência na busca de compostos que possam combater as infecções por microrganismos patológicos abrindo nova perspectiva para controle e prevenção de infecção por apicomplexas especialmente da Babesiose bovina.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- O propósito do estudo consiste na detecção, purificação e caracterização de proteína antigênica, com atividade lectínica, de uma cepa patogênica de merozoíto de *B. bovis* isolada na Zona da Mata mineira seguido de imunização de camundongos com a proteína purificada.

### 2.2 Objetivos específicos

- Purificar uma proteína de merozoíto de *B. bovis* com atividade lectínica;
- Identificar bioquimicamente a proteína com atividade lectínica purificada;
- Sequenciar a região NH<sub>2</sub> terminal e o domínio interno da proteína com atividade lectínica purificada;
- Produzir anticorpos específicos contra a proteína com atividade lectínica purificada de merozoíto de *B. bovis*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Purificação de proteína de *B. bovis* com atividade lectínica

##### 3.1.1 Merozoíto de *B. bovis*

Foram utilizadas amostras de isolado patogênico de *Babesia bovis* BbovUFV1, 7<sup>a</sup> passagem, isoladas na região da Zona da Mata mineira, na microrregião de Viçosa – MG. As amostras foram reproduzidas por passagens em bezerros esplenectomizados, congeladas em sangue total diluído v/v em solução tampão fosfato salina (PBS) constituída por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM e NaCl 73 mM em pH 7.6 acrescida de dimetilsulfóxido 22% e mantidas em nitrogênio líquido, no laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários do DVT / BIOAGRO/UFV.

##### 3.1.2 Antígenos solúveis totais de merozoítos de *Babesia bovis* (Bb-STAg)

Os merozoítos de *Babesia bovis* foram ressuspensos em um coquetel de inibidores enzimáticos contendo PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride), TLCK (tosyl-L-lysine chloromethyl ketone), EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid), aprotinina, leupeptina e pepsina A (Aldrich-sigma Co.; St. Louis, USA) e submetidos a três ciclos (quatro minutos cada) de sonicação (Vibra-cell – Sonics e Materiais Inc., Danbury, USA), com pulsos de 50 Khz, 10 W e entre cada ciclo um minuto de repouso no gelo. As proteínas solúveis foram recuperadas por centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4° C e denominadas Bb-STAg.

### 3.1.3 Cromatografia de afinidade

Amostras de antígenos solúveis totais de merozoítos de *Babesia bovis* (Bb-STAg) foram aplicadas à coluna de agarose fetuína imobilizada (Sigma Co., St. Louis, EUA) e o volume do leite foi de 1 mL. A coluna foi previamente equilibrada com PBS 10 mM, pH 7,4. A resina foi lavada com tampão de equilíbrio para remoção do material não adsorvido à coluna. O material adsorvido foi eluído pela adição de NaCl 1 M. Os procedimentos cromatográficos foram realizados em sistema Fast protein liquid chromatography (FPLC) (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), monitorado por absorvância em 280 nm. A fração ligante à coluna foi submetida à ultradiafiltração em membrana YM-10 (Amicon® Division, W. R., Grace e Co. MA. USA) e denominada FBP (Fetuin Binding Proteins).

## 3.2 Caracterização bioquímica da lectina isolada de *B. bovis*

### 3.2.1 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas obtidas das frações de purificação foi determinada através do método proposto por Smith *et al.*, (1985), também conhecido como dosagem protéica pelo método do Ácido Bicinconínico (BCA) 4,4'-dicarboxi-2,2'- biquinolina, usando como padrão uma curva de Bovine Serum Albumin (BSA) com concentrações variando de 0 a 2000 µg/mL. O preparo do reagente foi realizado adicionando-se sulfato de cobre ao BCA na proporção de 1:50 e para a dosagem de proteínas utilizou-se uma microplaca com fundo chato de 96 poços. Em cada poço da microplaca foram adicionados 10 µL da curva padrão e da amostra a serem quantificadas e 200 µL do reagente preparado. A microplaca foi incubada a 37°C por 30 minutos e a absorvância mensurada a 562 nm em um leitor de microplacas.

### 3.2.2 Análise eletroforética da proteína purificada de *B. bovis* com atividade lectínica

A análise eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida a 12% em condições dissociantes (SDS-PAGE), em sistema Mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratories, Hécules, EUA). As amostras de *B. bovis* purificadas foram precipitadas com Ácido Tricloroacético (TCA) a 10% e ficaram em repouso por trinta minutos no gelo. Em seguida a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por dez minutos, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado duas vezes com acetona gelada. Após esse procedimento a amostra foi ressuspensa em tampão de amostra [TRIS-HCl a 0,5 M, pH 6,5 contendo SDS a 2,5% (m/v), 2-mercaptoetanol a 2,5% (m/v) e glicerol a 10% (v/v)] incubada em banho maria a 100° C, por dez minutos e uma alíquota de 40 microlitros contendo 90 µg de proteína foi aplicada em dois géis, sendo 20 microlitros em cada um. A corrida eletroforética foi realizada em solução tampão contendo Tris 24,8 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (m/v), e durou aproximadamente 45 minutos (80-120mA, 190V). Marcadores protéicos de massa molecular (MM) conhecidas, pré corados foram usados como padrão de migração (BenchMaek Protein Ladder – Invitrogen, Carlsbad, EUA). Após a corrida, um dos géis foi mantido em uma solução contendo Coomassie Brilliant Blue R-250 (Pierce Chemical Co., Rockfors, EUA), ácido fosfórico 10%, sulfato de amônio 10% e metanol 20% durante três dias, e o outro gel foi mantido em *Pro-Q Emerald 300 glycoprotein Stain kit* (Invitrogen) por duas horas.

### 3.3 Sequenciamento protéico da lectina de *B. bovis*

#### 3.3.1 Sequenciamento de aminoácidos internos

##### 3.3.1.1 Digestão Tríptica

O “spot” da fração lectínica purificada, recortada do gel de poliacrilamida, foi inicialmente lavado três vezes com bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) a 25 mM / ácido cianídrico (ACN) 50 % e posteriormente secado em um sistema de SpeedVac (Thermo

Savant). Para a remoção da proteína, o gel foi tratado com 100  $\mu\text{L}$  de ditioneitol a 4 mM em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM a 4° C e alquiladas pela adição de 10  $\mu\text{L}$  de iodoacetamina a 100 mM por 30 minutos a 60° C. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente na ausência de luz, o fragmento de gel foi lavado por 1 hora em acetonitrila 50% em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10 mM, seguido de redução em acetonitrila e centrifugação em Thermo Savant SpeedVac Systems (modelo SC250EXP, LabCommerce, Santa Clara, California, USA). Ao fragmento do gel, em banho de gelo, foi adicionado  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM com 2  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  de tripsina modificada (Promega). Após 45 minutos, o sobrenadante foi removido e o tampão adicionado até cobrir por completo o fragmento de gel que foi incubado por 18 horas a 37° C. Foram procedidas duas extrações consecutivas com 50  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético 0,1% em acetonitrila 60%. Os digestos foram centrifugados no SpeedVac, seguido pelo tratamento com 5  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético 0,1% em acetonitrila 30%. O produto foi analisado por espectrometria de massa.

### 3.3.1.2 Espectrometria de Massa

Peptídeos tripticos foram ressuspensos em uma solução de 10  $\mu\text{L}$  de acetonitrila 50% / ácido fórmico 0,1%. A amostra foi misturada (1:1) com uma matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (5mg/mL de água: ácido cianídrico / ácido trifluoroacético 0,1% v/v tamponado com  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  20 mM). Alíquotas de 0,5  $\mu\text{L}$  foram aplicadas em círculos desenhados em uma placa metálica para análise pela técnica de ionização por dessorção de matriz assistida por laser (MALDI). Os espectros dos peptídeos foram obtidos em um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyzer, AbSciex, Europe) no modo refletor de íon positivo. A massa dos espectros foi obtida entre 800 e 4500 Da com 1500 disparos de feixes de laser. Para cada círculo da amostra um método de aquisição dependente foi criado para selecionar os quatro picos mais intensos, excluindo aqueles da matriz, a autólise de tripsina ou picos de acrilamida, para a subsequente aquisição dos dados em duas etapas de massa acopladas (MS/MS). O espectrômetro de massa foi calibrado internamente com picos de autodigestão de tripsina ( $\text{MH}^+$ : 842.5, 2211.42 Da) permitindo a acuracidade da massa até 25 pulsos por minuto.

### 3.3.2 Pesquisa no banco de dados

As massas monoisotópicas de cada peptídeo oriundos do MALDI-TOF foram submetidas à busca no MS-FIT ProteinProspector (<http://prospector.ucsf.edu>) e/ou MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), programas publicamente disponíveis que permitem a identificação por mapa de peptídeos (PMF). Os critérios de busca foram todas as massas moleculares e pontos isoelétricos, cisteínas modificadas por carboxamidometilação e as modificações possíveis, a saber: oxidação de metionina, fosforilação, cisteínas modificadas por acrilamida. Foi tolerada no máximo uma clivagem para peptídeos semi-trípticos e uma variação de massa dos peptídeos de 70 ppm. A identificação foi considerada não ambígua quando foram identificados pelo menos 5 peptídeos, uma cobertura de pelo menos 15% da sequência inteira da proteína não madura e pela coincidência próxima da massa molecular e pI teóricos e experimentais da proteína. O processamento da sequência dos aminoácidos internos do fragmento protéico foi realizado no programa MASCOT.

Os dados obtidos nos espectros foram filtrados pela relação sinal/ruído dos picos de 20 para os dados de MS e 10 para MS/MS; a busca foi realizada utilizando-se o NCBI com cobertura global envolvendo todos os organismos. Foram consideradas positivas as identificações onde pelo menos 2 peptídeos encontrados por proteína pudessem ser confirmados com dados de MS/MS.

### 3.3.3 Degradação de Edman

Uma fração de 100 µL da lectina de merozoíto de *B bovis* purificada foi transferida para uma membrana de PVDF (difluoreto de polivinileno) (Imobilon™, Millipore, Bedford, USA) em sistema de *Mini-Protean 3* (Bio-Rad Laboratories). A membrana contendo a lectina foi corada com azul de coomassie a 0,1% (Coomassie Brilliant Blue R-250, Pierce Chemical Co.), por 15 minutos, em temperatura ambiente, e descorada com solução de metanol a 45% e ácido acético a 7%. A banda referente a lectina foi recortada e submetida ao sequenciamento de aminoácidos N-terminal pela degradação automática de Edman, em sequenciador automático de proteína modelo PPSQ 33A (SHIMADZU, Japan) no Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa. A sequência de NH<sub>2</sub>-terminal foi

comparada usando os programas (FASTA, BLAST e TFASTA) do banco de dados de proteínas do site ExPASy (<http://tw.expasy.org/tool/#similarity>).

### **3.3.4 Identificação das lectinas**

A identificação e comparação das seqüências de aminoácidos foram realizadas através do sistema BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## **3.4 Produção anticorpos específicos**

### **3.4.1 Imunização de camundongos**

Cinco camundongos BALB/c obtidos do Biotério Central da Universidade Federal Viçosa com idade entre 5 a 8 semanas foram utilizados nesse experimento para a produção de anticorpos policlonais. Três bandas contendo aproximadamente 20 µg de proteínas com atividade lectínica purificadas de merozoíto de *B. bovis*, separadas por SDS-PAGE e coradas com Coomassie, foram recortadas do gel e emulsionadas com adjuvante. Os animais receberam três doses com 20 µg da proteína por via intraperitoneal. A primeira imunização foi realizada com a proteína emulsificada com adjuvante completo de Freund no dia 0. Para a segunda e terceira imunizações a proteína foi emulsificada em adjuvante incompleto sendo aplicada no dia 15 e 30 após a primeira imunização. As coletas de sangue foram realizadas no dia zero e com 45 dias após as inoculações. O sangue foi coletado a partir do plexo venoso retro-ocular dos animais, sendo incubado por 1 hora a 37° C e por mais 1 hora a 4° C em seguida centrifugado e coletado o soro.

### 3.4.2 Purificação dos anticorpos

O soro dos camundongos imunizados foi precipitado com solução de sulfato de amônio, pH 7,8 a uma concentração final de 45% por três horas a 4° C. Em seguida a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos a 4° C e o precipitado ressuspensão em PBS. O precipitado obtido foi ultradiafiltrado contra PBS, utilizando-se a membrana YM10 (Amicon). O material obtido por precipitação foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de proteína A imobilizada, previamente equilibrada com PBS com afinidade para a porção FC dos anticorpos. O material não adsorvido à coluna foi retirado com PBS, enquanto o material adsorvido foi eluído com tampão glicina-HCl a 0,1 M pH 3,0. Após a eluição, as amostras foram neutralizadas com Tris-HCl a 1 M, pH 8,0. A cromatografia foi monitorizada pela leitura de absorbância em 280 nm. As frações obtidas do material adsorvido à coluna e eluído com tampão ácido, foram ultradiafiltradas contra PBS, utilizando-se a membrana YM10 (Amicon).

### 3.4.3 Titulação dos anticorpos anti-lectina de *B. bovis* por “Dot enzyme-linked immunosorbent assay” (Dot-ELISA)

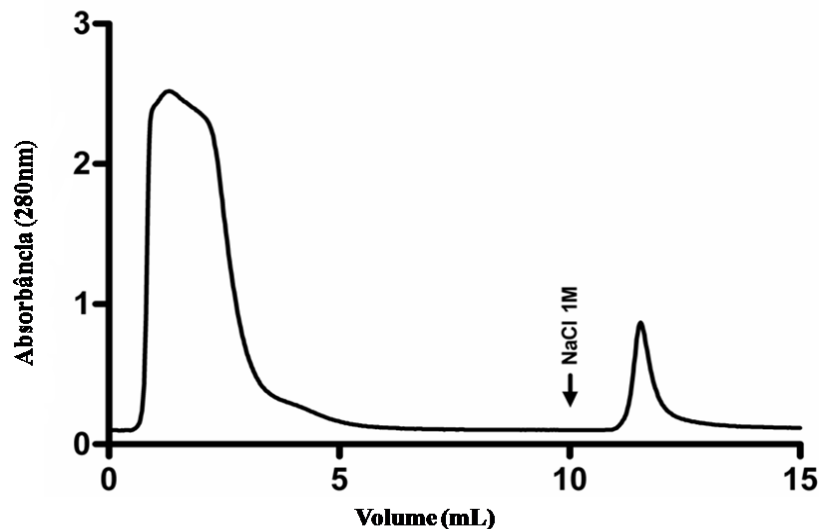
O Dot-ELISA foi o método utilizado para verificar a efetividade das imunizações com a proteína de *B. bovis*. O teste foi realizado em placas de 24 poços. Discos de nitrocelulose (*dots*) foram bloqueados com BSA e após duas lavagens foram sensibilizados com 18 µg de proteína purificada diluída em 10 µL de PBST pH 7,6 (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/L) por *dot*. Após estarem secos, os *dots* foram incubados com anticorpos dos animais purificados diluído em PBS-Tween 0,5% (200 µL /poço) durante 60 minutos. As diluições foram de 1:100; 1:200; 1:400; 1:800 até 1:102400. Realizaram-se 3 lavagens de 5 minutos cada (200 µL/poço), usando PBS-Tween 0,5% sob agitação lateral. Em seguida, incubaram-se os *dots* com 200 µL/poço de conjugado (anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase produzido em coelho, Sigma<sup>®</sup>) diluído (1:5000) em PBS-Tween 0,5% por 30 minutos. Posteriormente, realizaram-se 2 lavagens com PBS-Tween 0,5% e uma terceira lavagem com PBS (200 µL/poço). Sendo cada lavagem de 5 minutos. Adicionou-se então substrato (10 mg de DAB – Sigma<sup>®</sup>; 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 10 mL de Tris-HCl pH 7,6 e 1 mL

NiCl<sub>2</sub> 0,3%) no volume de 200 µL/poço e aguardou-se a revelação. A reação foi parada com 200 µL/poço de água ultra pura. Os “dots” foram lavados 3 vezes com 200 µL/poço de água e mantidos a temperatura ambiente até completa secagem.

## 4. RESULTADOS

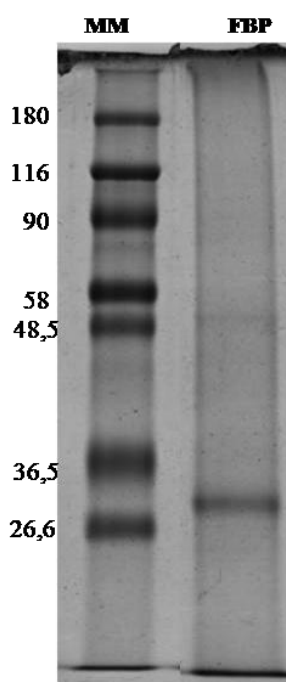
### 4.1 Purificação e identificação de proteínas de *B. bovis* com atividade lectínica

Com o propósito de purificar e identificar proteínas com atividade lectínica as quais possam desempenhar um papel crucial na interação entre merozoítos de *B. bovis* e a superfície dos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, foi utilizada a técnica de cromatografia de afinidade em coluna de agarose contendo fetuína imobilizada. Uma fração de 5 mL do Bb-STAg foi utilizado em sistema de FPLC previamente equilibrado com PBS. O material adsorvido à coluna foi eluído com tampão contendo NaCl 1 M e denominado FBP, apresentando rendimento de aproximadamente 12% da amostra aplicada (Figura 2).



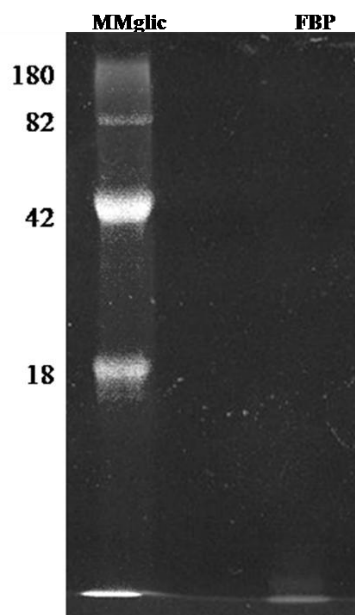
**Figura 2.** *B. bovis* apresenta frações ligantes de fetuína - Bb-STAg foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de agarose fetuína imobilizada, sendo retirado o material não adsorvido à coluna com tampão fosfato 20 mM, pH 7.4. O material adsorvido à coluna foi eluído com solução de NaCl a 1M. a corrida foi realizada em sistema de FPLC e monitorada em absorvância a 280nm. O material adsorvido e eluído com NaCl corresponde a 12% do material recuperado.

A quantificação da FBP purificada revelou a presença de aproximadamente 45 µg/mL de proteínas na amostra. Com o propósito de verificar a pureza e caracterização da mesma, quanto à massa molecular de seus componentes, 90 µg de FBP foi aplicada em um gel de SDS-PAGE, que após a corrida eletroforética e coloração com Coomassie Brilliant Blue, revelou a presença de uma banda protéica majoritária com peso aproximado de 27 kDa. (Figura 3)



**Figura 3. SDS-PAGE (12%) de FBP** - As amostras foram submetidas a tratamento redutor com  $\beta$ -mercaptoetanol. O gel foi colocado em uma solução fixadora contendo ácido fosfórico 10%, sulfato de amônio 10% e metanol 20% e corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. MM: proteínas com massas moleculares conhecidas [ $\alpha$ 2-macroglobulin de plasma humano (180 kDa),  $\beta$ -galactosidase de *E. coli* (116 kDa), Lactoferrina de leite humano (90 kDa), piruvato Kinase de músculo de coelho (58 kDa), fumarase de músculo cardíaco de porco (48,5 kDa), desidrogenase Lactica de músculo de coelho (36,5 kDa), isomerase trifosfato de músculo de coelho (26,6 kDa)].

Esta banda protéica, na altura de 27 kDa, foi ainda caracterizada quanto à presença de glicosilações. Para tal foi realizado um segundo gel de SDS-PAGE 12%, sendo aplicados 90 µg de FBP, que após a corrida eletroforética foi corado com *Pro-Q Emerald 300 glycoprotein Stain kit* (Invitrogen). Este corante possui a propriedade de se ligar no domínio glicosilado da proteína e emitir fluorescência. A imagem foi adquirida no equipamento FLA 3000 Fuji a 530nm. A região do gel determinada por MMglic contém CandyCane que representa um marcador de peso molecular glicosilado e FBP a proteína com atividade lectínica purificada. A análise do gel aponta que a FBP purificada não revelou fluorescência indicando que a mesma não é glicosilada (Figura 4).



**Figura 4. Determinação de glicosilação da lectina isolada de *B. bovis*** - A amostra de FBP foi submetida à SDS-PAGE.12%. O gel foi corado com *Pro-Q Emerald 300 glycoprotein gel stain kit*. MMglic contém uma mistura de marcadores glicosilados [ $\alpha$ 2-macroglobulina (180 kDa), glucose oxidase (82 kDa), glicoproteína ácida  $\alpha$ 1 (42 kDa) e avidina (18 kDa), FBP representa a fração ligante de fetuína.

## 4.2 Sequenciamento protéico da lectina isolada

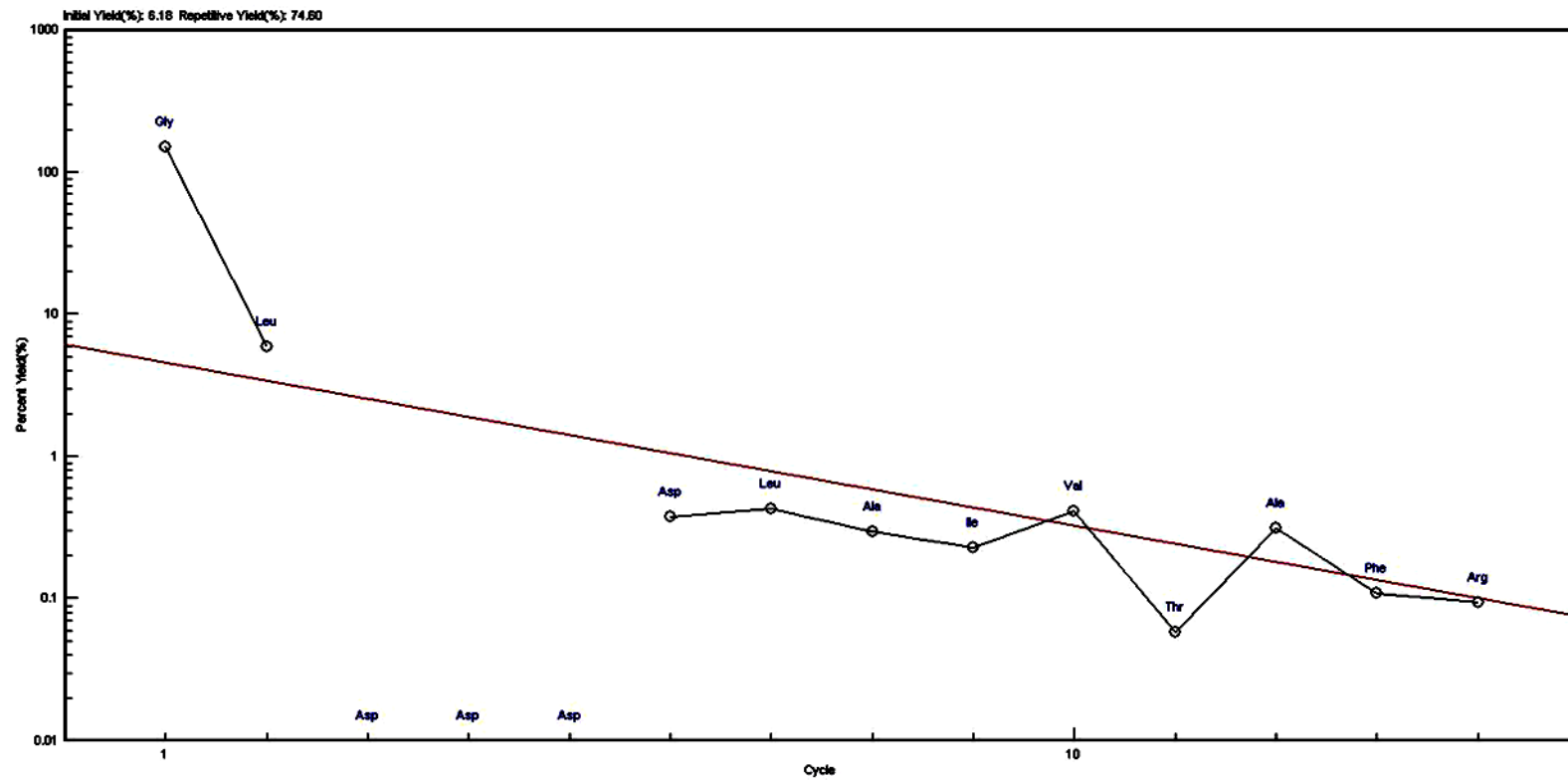
Com o propósito de identificar a constituição da FBP *B. bovis* purificada, o “spot” da fração lectínica, recortada do gel SDS-PAGE e tratado quimicamente, foi submetido à sequenciamento dos aminoácidos internos por MALDI-TOF. As massas monoisotópicas de cada peptídeo sequenciado foram submetidas à busca no software MASCOT e processada no programa Spectra. A análise dos peptídeos sequenciados evidenciou que o fragmento protéico era referente à proteína soro albumina bovina de *Bos taurus* com relação massa carga (m/z) de 1567,726 no pico mais intenso. Através da técnica de “sequenciamento de novo” obteve-se DAFLGSFLYEYSR como sequência dos peptídeos localizados na posição 216 a 228, apresentando um score de 62 com 98, 98% de confiabilidade. (Figura 5).

Serum albumin (Fragment) OS=Bos indicus PE=2 SV=1 Q3I349_BOSIN 62 98.988							
Protein Group							
ALB protein OS=Bos taurus GN=ALB PE=2 SV=1				B0JYQ0_BOVIN			
Peptide Information							
Calc. Mass	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. % Modification
1567.7427	1567.726	-0.0167	-11	216	228 DAFLGSFLYEYSR	62	98.988
1567.7427	1567.726	-0.0167	-11	216	228 DAFLGSFLYEYSR	62	98.988

**FIGURA 5. Análise de espectrometria de massa por MALDI-TOF da FBP de *B. bovis* purificada** - A proteína com atividade lectínica purificada e tripsinizada foi submetida à sequenciamento dos aminoácidos internos por MALDI-TOF. Através do “sequenciamento de novo” do pico mais intenso obteve-se como sequência DAFLGSFLYEYSR referente aos aminoácidos localizados na posição 216-228 da região interna da proteína. A análise da sequência obtida através do software MASCOT identificou o fragmento como sendo Soro albumina bovina de *Bos taurus* com relação massa carga (m/z) de 1567,725 com um score de 62 e 98, 98% de confiabilidade.

De posse deste resultado uma fração protéica de proteína com atividade lectínica de *B. bovis* purificada e transferida para a membrana de PVDF foi submetida a sequenciamento dos aminoácidos da região NH<sub>2</sub>-terminal em três ciclos de reações pelo método de degradação automática de Edman. O primeiro envolveu a reação do aminoácido N-terminal da FBP com PITC. A proteína modificada foi então submetida a hidrólise ácida liberando o primeiro aminoácido N-terminal modificado, e este foi identificado e registrado pelo sequenciador automático.

Novos ciclos de reações foram sendo realizados com os próximos aminoácidos da sequência protéica até a identificação do décimo quarto aminoácido. A melhor sequências estimada codificada pelo aparelho e o percentual de rentabilidade da degradação dos aminoácidos em cada ciclo de reação esta representado na Figura 6. O gráfico aponta uma diminuição da sensibilidade no percentual de rendimento do sequenciamento protéico a cada ciclo de reação até o décimo quarto aminoácido sequenciado.



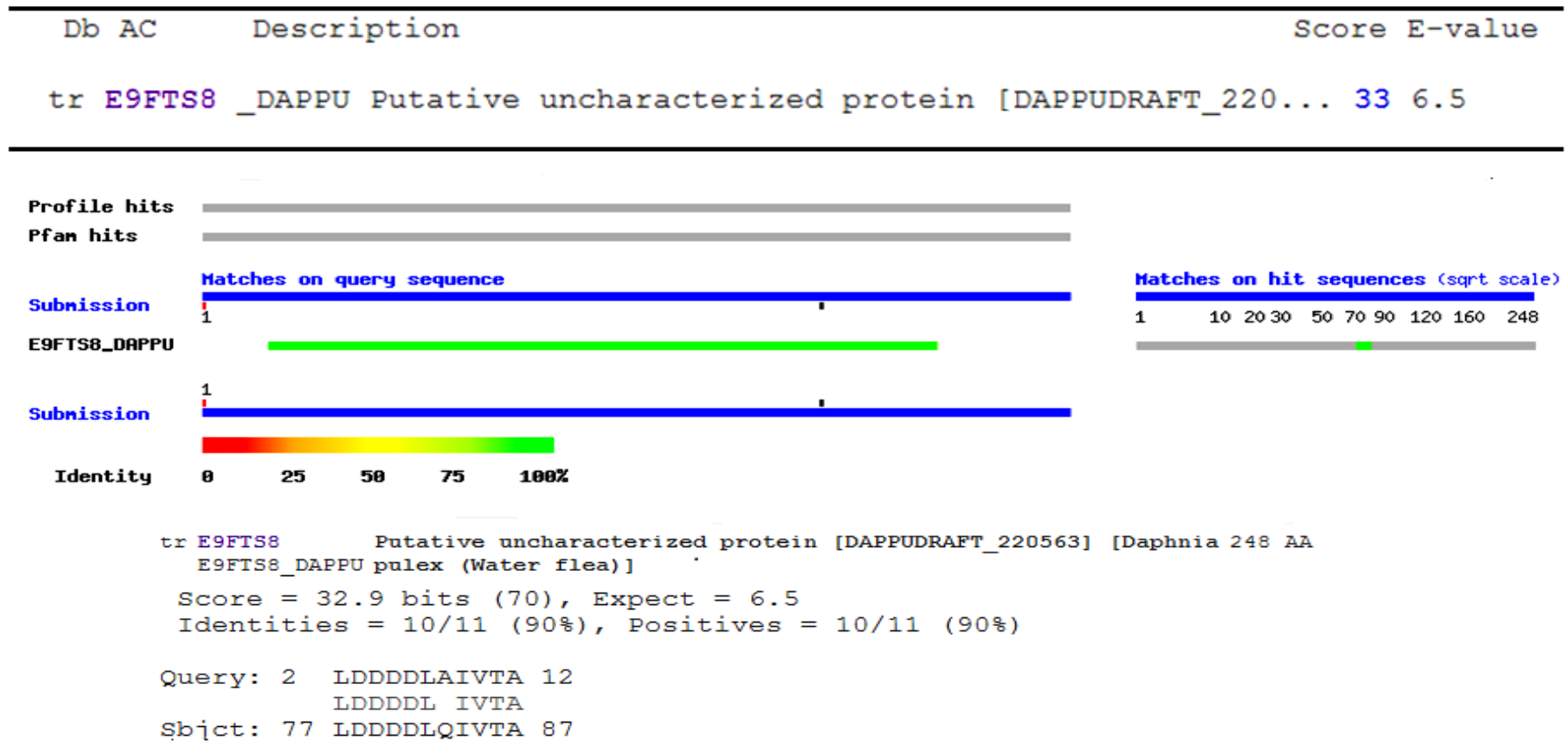
**[Estimated Sequence]**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>1st</b>	Gly	Leu	Asp	Asp	Asp	Asp	Leu	Ala	Ile	Val	Thr	Ala	Phe	Arg
<b>Reliability(%)</b>	33.4	20.6	9.2	10.2	17.4	23.8	11.6	15.9	41.8	11.7	13.9	7.8	11.3	10.8

**FIGURA 6.** Gráfico representativo do sequenciamento dos aminoácidos da região NH<sub>2</sub>-Terminal do fragmento protéico com atividade lectínica de *B bovis* purificado. Abaixo estão representados os aminoácidos estimados na sequência e o percentual de rendimento do sequenciamento.

A identificação da sequência de aminoácidos NH<sub>2</sub>-terminal obtida pelo processo de degradação de Edman foi realizada utilizando à análise através do sistema de algoritmos BLAST como forma de obter um alinhamento ótimo da sequência objeto com sequências alvo do banco de dados e a comparação das sequências foram realizadas utilizando os programas FASTA, BLAST e TFASTA do banco de ferramentas para análise de proteínas do site ExPASy.

Inicialmente a busca foi realizada objetivando uma análise com cobertura global envolvendo todos os microorganismos. A codificação pelo sistema de uma letra da sequência de aminoácidos obtida através da degradação de Edman -LDDDDLAIIVTA- foi utilizada para a consulta no banco de dados. Como resultado foi identificado uma proteína putativa não caracterizada de *Dappu pulex* (pulga d' água), com um E-value de 6,5 e score global de 33. Considerando a sequência objeto, o sistema identificou dentro do genoma deste microorganismo, a tradução de uma sequência de aminoácidos codificada com alto grau de similaridade representando 90% de identidade e 90% de positividade alcançando uma cobertura dentro da sequência de partida de aproximadamente 80%. Estes dados estão representados na Figura 7.



**FIGURA 7.** Representação esquemática de alinhamento local da sequência objeto com sequências alvo no BLAST - Considerando a sequência objeto o sistema identificou uma sequências alvo como sendo uma protéica putativa não caracterizada de DAPPU PULEX com Score de 33, E-value de 6.5, identidade e positividade de 90% com ausência de apenas um aminoácido dentro da sequência.

Considerando a proteína identificada no BLAST de *Dappu pulex* foi realizada uma nova busca com o propósito de avaliar as características desta proteína quanto ao nome, taxonomia do organismo, status da sequência completa de aminoácidos e massa da proteína utilizando o algoritmo FASTA. O resultado representado na Figura 8 revelou baseado no status da sequência completa da proteína constituída por 248 aminoácidos de *Dappu pulex*, a existência de uma sequência que correspondente a sequência preditiva obtida por degradação de Edman da proteína com atividade lectínica de *B. bovis* neste estudo. A localização destes aminoácidos dentro da sequência completa da proteína de *Dappu pulex* encontra-se entre os aminoácidos da posição 80 e 90. A massa dos aminoácidos desta sequência foi de 26,939 KDa, o que bate com massa aproximada da nossa proteína purificada e seqüenciada que foi de aproximadamente de 27 KDa.

Names and origin	
Protein names	Submitted name: Putative uncharacterized protein <a href="#">EMBL EFX89590.1</a>
Gene names	ORF Names:DAPPUDRAFT_220563 <a href="#">EMBL EFX89590.1</a>
Organism	<a href="#">Daphnia pulex (Water flea)</a> <a href="#">EMBL EFX89590.1</a>
Taxonomic identifier	6669 [NCBI]
Taxonomic lineage	<a href="#">Eukaryota</a> › <a href="#">Metazoa</a> › <a href="#">Arthropoda</a> › <a href="#">Crustacea</a> › <a href="#">Branchiopoda</a> › <a href="#">Diplostraca</a> › <a href="#">Cladocera</a> › <a href="#">Anomopoda</a> › <a href="#">Daphniidae</a> › <a href="#">Daphnia</a>

### Protein attributes

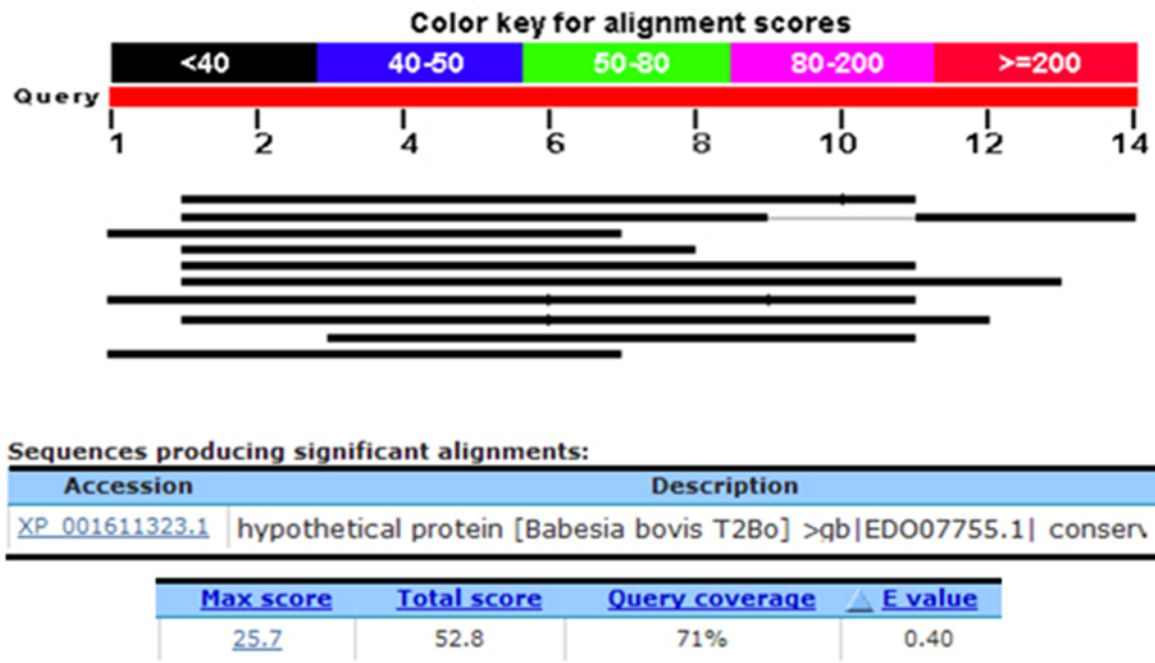
Sequence length	248 AA.
Sequence status	Complete.
Protein existence	Predicted.

### Sequences

Sequence	Length	Mass (Da)	Tools
E9F7S8 [UniParc]. Last modified April 5, 2011. Version 1. Checksum: 02315818A99FD13D	FASTA	248	26,939 Blast
<pre> 10      20      30      40      50      60 MKFAVIFAIA VACAMAAPT TSAGQSATSN SASSVSDDVD GVVKRSPASS MVNQNTKQIV 70      80      90     100     110     120 RRRFVSLIDA NGKLVLDLDD DLQIVTADLS GRQVSFQPKQ NVVNRVPVRF SNVGSVSTSG 130     140     150     160     170     180 QATGDIIFVS DDSREIDLDL DLDDLDDLAI ISPNRLSSFP FVNGQNAARL VSQSSIFNPS 190     200     210     220     230     240 TSEVRTPLRP TRMKPREVQS ASTCTCPPQR ESAFQFSRFP QQSFNRFSEQ GREPFVSSFP  GVQFVDDD </pre>			

FIGURA 8. Características da proteína *Dappu pulex* no algoritmo FASTA - Caracterização da identidade da proteína de *Dappu pulex* quanto ao nome, taxonomia, sequência completa de aminoácidos e massa.

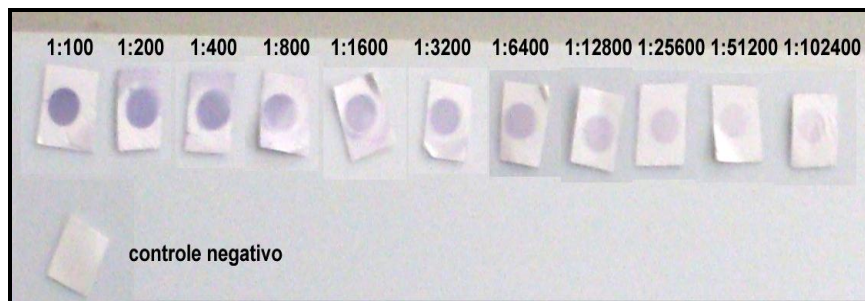
Uma busca mais refinada da sequência de aminoácidos obtida da região N-terminal da FBP de *B. bovis* purificada e submetida à degradação de Edman foi realizada restringindo a sequência obtida apenas aos microorganismos do filo Apicomplexa. O resultado evidenciou uma proteína hipotética de *B. bovis* conservada evolutivamente com um score total de 52,8, cobertura de 71% e E-value de 0,40. O resultado gráfico para o score de alinhamento está representado na figura 9. As diferentes cores identificadas no topo da figura representam as classes de aminoácidos que apresentam similaridade com a sequência objeto mostrando que há similaridade  $\geq 200$  com os quatorze aminoácidos da sequência objeto.



**FIGURA 9. Identificação e Representação gráfica da sequência de aminoácidos da região N-terminal dentro dos organismos Apicomplexas através do algoritmo BLAST - Foi identificada uma proteína putativa de *B. bovis* com score total de 52,8, E-value de 0,40 e cobertura de 71% da sequência objeto.**

### 4.3 Produção de anticorpos específicos anti-FBP *B. bovis* purificada

Os anticorpos anti-FBP *B. bovis* produzidos em camundongos e purificados em sistema de FPLC utilizando uma coluna de proteína A imobilizada, com afinidade pela porção FC do anticorpo foram titulados por Dot-ELISA. Para tal discos de nitrocelulose foram imobilizada com 18 µg de FBP de *B. bovis* e o anticorpo anti-FBP purificado reagiu com a proteína até uma diluição de 1:102400 (Figura 9). Visualmente considerou-se a melhor titulação de até 1:6400.



**Figura 10. Titulação dos anticorpos anti-lectina de *B. bovis* e reconhecimento da FBP purificada por Dot-ELISA** - Discos de nitrocelulose foram sensibilizados com FBP purificada de merozoíto de *B. bovis* diluída em PBST pH 7,6 e incubados com anticorpos policlonais anti-FBP com diluições entre 100 a 102400. A reação foi revelada com DAB e mostrou afinidade do anticorpo anti-FBP pela proteína até o título de 102400. Como controle negativo foi usado uma proteína com atividade lectínica de *Paracoccidioides brasiliensis*.

## 5. DISCUSSÃO

A partir da descoberta da Babesiose em 1911, inúmeras estratégias profiláticas passaram a ser desenvolvidas em diferentes centros de pesquisa em todo o mundo. Devido ao moderado ou baixo nível de proteção conferida por elas (Bock, *et al.*, 2004), a Babesiose permanece como uma das afecções mais importantes que acometem os bovinos, com grandes perdas econômicas à bovinocultura, principalmente em países com clima tropical e temperado. Atualmente, o controle da doença ainda é um grande desafio, e diversos mecanismos moleculares básicos envolvidos na interação do hematozoário com os eritrócitos do hospedeiro permanecem pouco conhecidos. Nesse contexto, o presente estudo foi desenvolvido considerando-se que a compreensão da base molecular da Babesiose é uma importante ferramenta para a descoberta de novos antígenos protéicos que podem ser alvos potenciais de intervenções terapêuticas utilizadas para o controle da doença (SUAREZ e MCELWAIN, 2010).

De acordo com Soldati, *et al* (2001), parasitos do filo Apicomplexa possuem um conjunto de organelas secretoras, que auxilia nos estágios de invasão destes microrganismos. Dubremetz, *et al.*, (1998); Mosqueda, *et al.* (2002) e Baravalle, *et al.*, (2010) demonstraram que merozoítos de *Babesia* utilizam uma combinação de moléculas de superfície celular e de proteínas secretadas e excretadas pelas organelas do complexo apical para se ligar e invadir os eritrócitos do hospedeiro vertebrado. Uma vez que o parasito depende da atividade do complexo apical para parasitar os eritrócitos, essa maquinaria de invasão tem sido extensivamente estudada, e algumas de suas proteínas caracterizadas e com função definida. Dessa forma, o foco do presente estudo foi averiguar se merozoítos de *B. bovis* apresentavam alguma proteína que possa ter relação com a função de invasão celular.

Em uma recente revisão bibliográfica, Gohil, *et al.*, (2010) descreveram proteínas de *B. bovis* envolvidas no processo de invasão como MAS-1, MAS-2, MAS-2c RAP-1, BbAMA-1, BbTRAP, duas proteínas dos corpos esféricos nomeadas SBP2 e SBP3 relacionadas com modificações da membrana eritrocitária pós invasão e a VESA-1, envolvida na citoaderência. Em estudo prévio, Bork, *et al.*, (2007) constataram que as proteínas do complexo apical poderiam ser o ponto chave para o desenvolvimento de novos processos terapêuticos e medidas preventivas para a Babesiose.

Friedrich, *et al.*, 2010, relataram que o reconhecimento celular e interação inicial entre parasitos apicomplexas e a célula do hospedeiro relaciona-se com a especificidade do parasito

em ligar-se ao ácido siálico presente na superfície das células de todos os vertebrados. Além disso, pelo fato da distribuição das glicanas, especialmente o ácido siálico, ser ubíqua em todas as células dos organismos vertebrados, é alvo potencial para patógenos. Camus e Hadley (1985) foram um dos primeiros pesquisadores a evidenciar tal fato, demonstrando a ligação de antígenos de *Plasmodium falciparum*, um parasito que apresenta proximidade filogenética com *B. bovis*, ao ácido siálico presente na membrana eritrocitária.

Como já relatado neste estudo, alguns organismos do filo Apicomplexa apresentam moléculas com atividade lectínica que se ligam ao ácido siálico mediando o processo de invasão celular. Esta propriedade abriu a perspectiva de investigar uma proteína com atividade lectínica de merozoíto de *B. bovis* com afinidade de ligação pela fetuína a partir do reconhecimento do ácido siálico de suas glicanas. Lehmann, *et al.*, (2006), ao revisar lectinas com especificidade pelo ácido siálico, sua ocorrência e função em diferentes organismos, relatou um crescente identificação, caracterização e função biológica destas proteínas em organismos pertencentes ao reino Protozoa, dentre estes *Leishmania sp*, *Tritrichomonas sp*, *Babesia sp*, *Trypanosoma sp*. e *Plasmodium sp*, sendo este último extensivamente estudado. Atentando para este fato, foi obtido, no presente estudo, uma proteína com atividade lectínica, ligante de fetuína de um isolado patogênico de merozoíto de *B. bovis* por cromatografia de afinidade. Vários métodos cromatográficos podem ser utilizados para purificação de proteínas com atividade lectínica, no entanto em revisão bibliográfica prévia, Kennerdy, *et al.*, (1995) relataram que a cromatografia de afinidade representa um marco no isolamento de lectinas, além de ser uma das técnicas mais sensíveis e específicas de purificação de proteínas. Em adição, é a mais vantajosa devido a seleção de biomolécula ser realizada com base em suas funções biológicas ou de afinidade, com alto grau de recuperação quando comparada as outras técnicas cromatográficas, o que justifica escolha dessa técnica para purificação de proteínas com atividade lectínica realizada no presente estudo. Kennerdy, *et al.*, (1995) ainda relatou que as matrizes de afinidade para as lectinas são escolhidas de acordo com sua especificidade para determinado carboidrato definido por ensaios de inibição da atividade hemaglutinante. Para *B. bovis*, Yokama *et al.*, (2006) demonstraram a importância do ácido siálico no processo de invasão deste parasito quando trataram os eritrócitos bovinos com neuraminidase, o que reduziu significativamente a susceptibilidade a invasão.

De posse do material purificado, o primeiro passo foi quantificá-lo para posterior caracterização. E em subsequente análise eletroforética evidenciou-se ser uma proteína com massa aproximada de 27kDa não glicosilada, a qual foi submetida ao sequenciamento de seus aminoácidos internos e da região NH<sub>2</sub>-terminal.

Em uma revisão bibliográfica realizada por Sam-Yellowe (1996), foi relatada à identificação de proteínas de diferentes massas moleculares com afinidade de ligação a eritrócitos em parasitos apicomplexas. De acordo com esse autor, essas proteínas variavam entre 21kDa e 240kDa. Nas espécies de *Babesia* as proteínas descritas com capacidade de se ligarem ao ácido siálico presente na membrana dos eritrócitos tiveram sua massa identificada entre 58 kDa e 225 kDa, sendo a maioria sintetizada por roptrias. Proteínas de baixo peso molecular, semelhante ao peso do fragmento protéico encontrado no presente estudo, foram identificadas e caracterizadas em organismos da espécie *Toxoplasma*, e estas são pertencentes aos grânulos densos com a massa variando entre 21 kDa a 69 kDa podendo ser uma proteína conservada entre os apicomplexas.

Considerando ainda a descoberta e caracterização de proteínas de *B. bovis* com afinidade de ligação a eritrócitos, Alvarez, *et al.*, (2010), relataram a existência de um *locus* gênico de *msa-1* e *msa-2c* pertencentes à família de antígenos variáveis de superfície de merozoíto de *B. bovis* que codificam para a síntese de uma glicoproteína de membrana com peso de 42 kDa e 30 kDa respectivamente. Esta última apresenta massa molecular bem próxima do fragmento protéico isolado no presente estudo, desta forma é possível inferir que a mesma possa pertencer a essa família. Além disso, Borgonio, *et al.*, (2008) ao compararem diferentes isolados de *Babesia* relatou que estes genes são conservados entre quatorze diferentes isolados de *Babesia* avaliados em distintas regiões geográficas.

O processamento da sequência dos aminoácidos internos do fragmento protéico isolado no presente estudo, no programa MASCOT, evidenciou que o mesmo é referente à proteína soro albumina bovina de *Bos taurus*. Considerando este resultado, inferimos que o fragmento sequenciado é referente a um contaminante e que possivelmente uma porção da proteína alvo de merozoíto de *B. bovis* com afinidade pelo ácido siálico possa exercer sua função ligada à albumina bovina no organismo do hospedeiro vertebrado até mesmo como uma forma de escape do sistema imunológico.

Nakamura, *et al.* (1997), relataram que a albumina é uma das proteínas mais abundantes do plasma sanguíneo dos bovinos e tem a função de transporte de numerosas moléculas protéicas para distintos compartimentos endógenos e exógenos da célula ligados por alta afinidade. É importante ressaltar também que os CDRs das lectinas representam uma pequena porção da molécula, constituídos com menos de 200 aminoácidos, e comparado com a abundância da albumina no organismo do hospedeiro, ela pode ter mascarado o resultado encontrado. Porém, não significa necessariamente a ausência da lectina alvo do merozoíto de *B. bovis*, uma vez que apenas o pico que apresentou maior relação massa carga ( $m/z$ ) foi

avaliado. Nakamura, *et al.* (1997) abordaram que em condições não fisiológicas a albumina bovina pode sofrer modificações reversíveis em sua conformação ou ser degradada. Desta maneira, a degradação da albumina bovina, que reconhecidamente apresenta massa molecular de 66 kDa, pode parcialmente explicar o fato de o fragmento protéico sequenciado no presente estudo apresentar massa molecular aproximada de 27kDa, e ainda ser identificado como albumina bovina.

A análise da sequência dos aminoácidos internos obtida do fragmento protéico isolado no presente estudo no algoritmo BLAST, foi realizada inicialmente objetivando uma cobertura global envolvendo todos os microorganismos e em seguida restringindo a busca apenas a organismos pertencentes ao filo apicomplexa.

A busca generalizada da sequência do fragmento protéico alvo no BLAST identificou uma semelhança com 90% de identidade e um E-value de 6,5 com uma proteína putativa não caracterizada de *Dappu pulex* (pulga d' água). Este microorganismo quase microscópico é um crustáceo de água doce que teve seu DNA completamente mapeado recentemente por Colbourne, *et al.*, (2011), apresentando 31 mil genes. De acordo com estes autores, *Dappu pulex* representa um modelo de estudos da genômica ambiental a qual objetiva o conhecimento da interação entre os genes e o ambiente. Além disso, eles relataram ainda que entre os organismos invertebrados é a espécie que apresenta um maior número de genes compartilhados entre os humanos. Apesar da sequência de aminoácidos alvo coincidir com um fragmento protéico deste microorganismo, não se sabe até o presente se há alguma compatibilidade com organismos do filo Apicomplexa ou com *B. bovis*.

Considerando este achado, restringiu-se a busca de similaridade dos aminoácidos NH<sub>2</sub>-terminal a organismos do filo Apicomplexa e o resultado obtido foi uma proteína hipotética de *B. bovis*, porém ainda sem função definida com um E-value de 0,4 e cobertura de 71%.

Para verificar, em análises futuras, se este fragmento protéico de merozoíto de *B. bovis* apresenta relação com o processo de reconhecimento, ligação ao ácido siálico e internalização do parasito na célula hospedeira foi realizada a produção de anticorpos específicos anti-*B bovis* em camundongos inoculados com um emulsificado da FBP- *B bovis* purificada com adjuvante completo e incompleto de Freud. O resultado mostrou que os anticorpos purificados do soro destes animais com diferentes títulos de diluições foram capazes de reconhecer e se ligar a proteína alvo.

Diante do que foi descrito no presente estudo e de acordo com os resultados apresentados, acredita-se que a proteína com atividade lectínica de merozoíto de *B. bovis*

purificada possa ser um dos mediadores envolvidos na parasitemia dos eritrócitos. Em estudos futuros, se comprovada esta hipótese, ela pode abrir perspectivas para novos processos de intervenção terapêutica contra a Babesiose bovina.

## Conclusões

- Através do processo de purificação por cromatografia de afinidade em coluna de agarose fetuína imobilizada foi obtida uma proteína com atividade lectínica de merozoíto de *B. bovis* com peso aproximado de 27KDa, com ausência de glicosilações.
- O spot da proteína isolada submetido ao sequenciamento dos aminoácidos internos por espectrometria de massa evidenciou o fragmento protéico como pertencente à proteína albumina bovina de *Bos tauros*.
- A análise *in silico*, envolvendo todos os microorganismos, através do algoritmo BLAST da sequência obtida dos aminoácidos da região NH<sub>2</sub>-terminal do fragmento protéico isolado apontou que o mesmo era pertencente a uma proteína de *Dappu pulex* e ao restringir a busca apenas para organismos pertencentes ao filo apicomplexa ficou evidenciado que o fragmento pertence a uma proteína putativa de *B. bovis*.
- Foi possível obter anticorpos anti-FBP *B. bovis* produzidos em camundongos imunizados com a proteína isolada e estes foram capazes de reconhecer o fragmento protéico de merozoíto de *B. bovis* até altas diluições.

## Considerações e limitações do Estudo

Apesar da análise *in silico* dos aminoácidos sequenciados da região NH<sub>2</sub>-terminal do fragmento protéico isolado ter apontado a proteína como pertencente a *B. bovis*, devemos considerar o inconveniente da contaminação por albumina bovina evidenciada na análise por espectrometria de massa. A contaminação foi um dos fatores limitante neste estudo, além disso, todas as análises foram realizadas com apenas três alíquotas de 1mL de hemácias bovinas contendo merozoítos de *B. bovis* em quantidades não definidas e obtidas do laboratório de hematozoários da UFV. Como não tivemos controle do isolamento destes merozoítos, ficou difícil avaliar possíveis contaminantes na amostra.

## **Perspectivas do Estudo**

O fato de termos encontrado uma fração protéica de merozoítos de *B. bovis* com afinidade de ligação pelo ácido Siálico e dos anticorpos anti-FBP produzidos neste estudo terem reconhecido e se ligado a esse fragmento protéico abre novas perspectivas para estudos futuros. Após a confirmação e caracterização bioquímica desta proteína pretende-se avaliar sua função na biologia do parasita e seu papel nas relações estabelecidas com a célula hospedeira na infecção por *B. bovis*. Para tal, será realizada a expressão heteróloga do fragmento protéico isolado, seguido de testes de invasão *in vitro e in vivo*. Além disso, com os achados futuros este estudo pode abrir uma nova perspectiva para o desenvolvimento de novas formas de controle e conseqüentemente para prevenção da Babesiose bovina.

## REFERÊNCIAS

- AIKAWA, M. et al. "A study on the pathogenesis of human cerebral malaria and cerebral babesiosis." **Fundação Oswaldo Cruz**. v. 87, Suppl 3, p. 297-301. 1992.
- ALLRED, D. R. et al. The ves multigene family of *B. bovis* encodes components of rapid antigenic variation at the infected erythrocyte surface. **Molecular Cell**. v. 5, p. 153-162. 2000.
- ALVAREZ, J. A. et al. Immunization of *Bos taurus* Steers with *Babesia bovis* Recombinant Antigens MSA-1, MSA-2c and 12D3. **Transboundary and Emerging Diseases**. v. 57, p. 87-90. 2010.
- BARAVALLE, M. E. et al. The novel protein BboRhop68 is expressed by intraerythrocytic stages of *Babesia bovis*. **Parasitology International**. v. 59, p. 571-578. 2010.
- BARONDES, S. H. et al. Structure and function of a large family of animal lectins. **Journal of Biological Chemistry**. v. 269, n. 33, p. 20807-20810. 1994.
- BLACKMAN, M. J.; BANNISTER, L.H. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 117, p. 11-25. 2001.
- BOCK, R. et al. Babesiosis of cattle. **Parasitology**. v.129, p. 247-69. 2004.
- BORGONIO, V. J. et al. msa-1 and msa-2c gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *Babesia bovis* isolates. **New York Academy of Sciences**. v. 1149, p. 145-148. 2008.
- BORK, S. et al. Asexual growth of *Babesia bovis* is inhibited by specific Sulfated glycoconjugates. **The Journal of Parasitology**. v. 93, n. 6, p.1501-1504. 2007.
- BRAYTON, K. A. et al. Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoproteins. **PLoS Pathogens**. v. 3, p. 1401-1413. 2007.
- BUSHELL, G. R. et al. *Babesia bovis* host cell recognition proteins. **International Journal for Parasitology**. v. 21, p. 609-611. 1991
- CALLOW, L. L. Piroplasms. In *Animal Health in Australia, Protozoal and Rickettsial Diseases*, vol. 5. Animal Health in Australia, pp. 121-160. Canberra, Australian Bureau of Animal Health, AGPS. 1984.
- CAMUS, D.; HADLEY, T. J. A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. **Science**. v. 230, p.553-556. 1985.
- CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J.C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**. v. 10, p. 83-89. 2007.

COLBOURNE, J. K. et al. The Ecoresponsive Genome of *Daphnia pulex*. **Science**. v. 331, p. 555-561. 2011.

COOPER, D. N. W. Galectinomics: Finding themes in complexity. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, p. 209–231. 2002.

DALRYMPLE, B. P. et al. Characterization of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis*, and *Babesia canis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 57, p. 181-192. 1993.

DE VOS, A. J.; POTGIETER, F. T. Bovine babesiosis. In *Infectious Diseases of Livestock* (ed. Coetzer, J. A. W., Thomson, G. R. & Tustin, R. C.), pp. 278–294. Capetown, Oxford University Press. 1994.

DOWLING, S. et al. A *Babesia bovis* 225-kilodalton spherical-body protein: localization to the cytoplasmic face of infected erythrocytes after merozoite invasion. **Infection Immunity**. v. 64, p. 2618-2626. 1996.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of Animal Lectins. **Annual Review of Cell Developmental Biology**. v.9, p. 237-264. 1993.

DUBREMETZ, J. F. et al. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. **International Journal for Parasitology**. v. 28, p. 1007-1013. 1998.

FLORIN-CHRISTENSEN, M. et al. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. **Infection Immunity**. v. 70, p. 3566-3575. 2002.

FRIEDHOFF, K. T. Transmission of Babesia. In: RISTIC, M. (ed). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton. CRC Press, 1988. p. 23-52.

FRIEDRICH, N.; MATTHEWS, S.; SOLDATI-FAVRE D. Sialic acids: Key determinants for invasion by the Apicomplexa. **International Journal for Parasitology**. v. 40, p. 1145-1154. 2010.

FURTADO, G. C.; CAO, Y.; JOINER, K. A. "Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the beta 1 integrin receptor alpha 6 beta 1 on human foreskin fibroblasts and Chinese hamster ovary cells." **Infection and Immunity**. v. 60, n. 11, p. 4925-31. 1992.

GAFFAR, F. R. et al. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. **Infection Immunity**. v. 72, p. 2947-2955. 2004a.

GAFFAR, F. R. et al. A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in *Plasmodium* sporozoites. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 136, p. 25-34. 2004b.

GOHIL, S. et al. Recent insights into alteration of red blood cells by *Babesia bovis*: moovin' forward. **Trends in Parasitology**. v. 26, n. 12, p. 591-599. 2010.

GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**. v.57, p. 109-19. 1995.

GUGLIELMONE, A. A. et al. Some quantitative aspects of natural babesial infection in the haemolymph of *Boophilus microplus* engorged Female ticks. **Parasite**. v.4, p.337-341. 1997.

HOMER, M. J. et al. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 3, p. 451-469. 2000.

HUTCHINGS, C. L. et al. New insights into the altered adhesive and mechanical properties of red blood cells parasitized by *Babesia bovis*. **Molecular Microbiology**. v. 65, p. 1092-1105. 2007.

HINES, S. A. et al. Molecular characterization of *Babesia bovis* merozoite surface proteins bearing epitopes immunodominant in protected cattle. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 37, p. 1-9. 1989.

HINES, S.A. et al. Genetic and antigenic characterization of *Babesia bovis* merozoite spherical body protein Bb-1. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 69, 149-159. 1995.

IGARASHI, I.; AIKAWA, M.; KREIER, J. P. Host cell-parasite interactions in babesiosis. Babesiosis of domestic animals and man. Ristic, M. Boca Raton, CRC Press: 53-70. 1988.

JACK, R. M.; WARD, P. A. Mechanisms of entry of Plasmodia and babesia into red cells. Babesiosis. Kreier, J.P., Ristic, M. New York, Academic Press: 445-458. 1981.

JASMER, D. P. et al. Surface epitope localization and gene structure of a *Babesia bovis* 44-kilodalton variable merozoite surface antigen. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 55, p. 75-83. 1992a.

JASMER, D. P. et al. A *Babesia bovis* 225-kilodalton protein located on the cytoplasmic side of the erythrocyte membrane has sequence similarity with a region of glycogen phosphorylase. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 52, 263-269. 1992b.

JOINER, K. A.; DUBREMETZ, J. F. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. **Infection Immunity**. v. 61, p. 1169-1172. 1993.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review **Carbohydrate Polymers**. v. 26, p. 219-230. 1995.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. **Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos**. , Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 1998. 115p.

KLEIN, H. et al. "Expression, purification, and biochemical characterization of a recombinant lectin of *Sarcocystis muris* (Apicomplexa) cyst merozoites." **Glycoconjugate Journal**. v. 15, n. 2, p. 147-53. 1998.

LEHMANN, F.; TIRALONGO, E.; TIRALONGO, J. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 63 p. 1331-1354. 2006.

- LEVINE, N. D. Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. v. 35, n. 4, p. 518-520. 1988.
- LIS, H.; SHARON, N. "Lectins as molecules and as tools." **Annual Review of Biochemistry**. v. 55, p. 35-67. 1986.
- LOSOS, G. J. Infectious tropical diseases of Domestic Animals. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 28, n.8, p. 539. 1986.
- LOURENCO, E. V. et al. "*Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin." **Glycobiology**. v. 11, n. 7, p. 541-7. 2001.
- MAHONEY, D. F. Babesia of domestic animal. In: Kreier, J. P. Parasitic Protozoa. New York: Academic Press. 1977.
- MCELWAIN, T. F. et al. "Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins." **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 47, n. 2, p. 213-22. 1991.
- MEHLHORN, H.; SHEIN, E. "The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**. v. 23, p. 37-103. 1984.
- MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. **Blood**. v. 112, p. 3939-3948. 2008.
- MOSQUEDA, J. et al. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. **Infection Immunity**. v. 70, p. 1599-1603. 2002a.
- MOSQUEDA, J.; MCELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. **Infection Immunity**. v. 70, 6448-6455. 2002b.
- NAKAMURA, K. et al. Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. **Federation of European Biochemical Societies**. v.417, p. 375-378. 1997.
- O'CONNOR, R. M. et al. Cytoadherence of *Babesia bovis* infected erythrocytes to bovine brain capillary endothelial cells provides an in vitro model for sequestration. . **Infection Immunity**. v. 67, p. 3921-3928. 1999.
- O'CONNOR, R. M.; ALLRED, D. R. "Selection of *Babesia bovis*-infected erythrocytes for adhesion to endothelial cells coselects for altered variant erythrocyte surface antigen isoforms." **The Journal of Immunology**. v. 164, n. 4, p. 2037-45. 2000.
- ORTEGA-BARRIA, E.; BOOTHROYD, J. C. "A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection." **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 3, p. 1267-76. 1999.

- PALMER, G. H. et al. Strain variation of *Babesia bovis* merozoíto surface-exposed epitopes. **Infection Immunity**. v. 59, p. 3340-3342. 1991.
- PATARROYO, J. H.; VARGAS, M. I.; BICUDO, P. L. Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. **Veterinary Parasitoy**. v. 11, p. 301-308. 1982.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. "Lectins as plant defense proteins." **Plant Physiology**. v. 109, n. 2, p. 347-52. 1995.
- PONGPONRATN, E. et al. "Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study." **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.44, n. 2, p. 168-75. 1991.
- ROBERT, R. et al. "Specific binding of neoglycoproteins to *Toxoplasma gondii* tachyzoites." **Infection and Immunity**. v. 59, n. 12, p. 4670-4673. 1991.
- RUDZINSKA, M. A. Morphologic aspects of host-cell-parasite relationships in babesiosis. **Babesiosis**. Kreier, J.P., Ristic, M. New York, Academic Press: 87-141. 1981
- RUEF, B. J. et al. A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.105, p. 1-12. 2000.
- SAM-YELLOWE, T. Y. Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitology Today*. v. 12, n. 8. 1996.
- SHARON, N.; LIS, H. "Lectins as cell recognition molecules." **Science**. v. 246, n. 4927, p. 227-234. 1989.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. v. 14 n. 11, p. 53-60. 2004.
- SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**. v. 150, n. 1, p. 76-85. 1985.
- SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v.31, p. 1293-1302. 2001.
- SOLDATI-FAVRE, D. Molecular dissection of host cell invasion by the apicomplexans: the glideosome. **Parasite**. v. 15, p. 197-205. 2008.
- SOARES, C. O. et al. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 75-79. 2000.
- SUAREZ, C. E. et al. Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 46, p. 45-52. 1991.

SUAREZ, C. E. et al. Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 (MSA-1) locus and identification of a cross-reactive inhibition-sensitive MSA-1 epitope. **Infection Immunity**. v. 68, p. 6865-6870. 2000.

SUAREZ, C. E.; MCELWAIN, T. F. Transfection systems for *Babesia bovis*: A review of methods for the transient and stable expression of exogenous genes. **Veterinary Parasitology**. v. 167, p. 205-215. 2010.

SUWANARUSK, R. et al. The deformability of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **Journal of Infectious Diseases**. v. 189, p. 190-194. 2004.

UILENBERG, G. Babesia - A historical overview. **Veterinary Parasitology**. v. 138, n.1-2, p. 3-10. 2006.

VARKI, A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. **The FASEB Journal**. v.11, n. 4, p. 248-255. 1997.

VON ITZSTEIN, M. et al. "Hot, sweet and sticky: the glycobiology of *Plasmodium falciparum*." **Trends Parasitology**. v. 24, n. 5, p. 210-218. 2008.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. "Structural basis of lectin-carbohydrate recognition." **Annual Review of Biochemistry**. v. 65, p. 441-73. 1996.

WILKOWSKY, S. E. et al. Babesia bovis merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 127, p. 133-141. 2003.

WRIGHT, I. G. Biochemical characteristics of Babesia and physicochemical reactions in the host. **Babesiosis**. Kreier, J. P., Ristic, M. New York, Academic Press: 171-206. 1981.

WRIGHT, I. G., GOODGER, B.V. Pathogenesis of babesiosis. Babesiosis of domestic animals and man. **Ristic, M.** Boca Raton, CRC press: 99-118. 1988.

WRIGHT, I. G. et al. "Immunopathophysiology of babesial infections." **Royal Society Tropical Medicine Hygiene**. Suppl. 83, p. 11-13. 1989.

YOKOYAMA, N. et al. Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte binding activity. **Infection Immunity**. v. 70, p. 5822-5826. 2002.

YOKOYAMA, N.; OKAMURA, M.; IGARASHI, I. Erythrocyte invasion by Babesia parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. **Veterinary Parasitology**. v. 138, p. 22-32. 2006.

ZAUGG, L. J. Babesiose. In: SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. Ed. Manole, v.2, p. 1080-1084. 1993.