

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Produção de um anticorpo policlonal anti-Duffy de *Bos taurus taurus* para detecção e quantificação do antígeno em eritrócitos bovinos

ANA TERESA BURLAMAQUI FARACO ANTONANGELO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Genética.

Botucatu-SP
Março-2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Produção de um anticorpo policlonal anti-Duffy de *Bos taurus taurus* para detecção e quantificação do antígeno em eritrócitos bovinos

ANA TERESA BURLAMAQUI FARACO ANTONANGELO

Bióloga

Orientadora: Profa. Dra. Lígia Souza Lima Silveira da Mota
Co-orientadora: Dra. Débora Colombi
Co-orientador: Dr. Rogério Abdallah Curi
Colaborador: Dr. Antonio Sérgio Kimus Braz

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Genética.

Botucatu-SP
Março-2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Antonangelo, Ana Teresa Burlamaqui Faraco.

Produção de um anticorpo policlonal anti-Duffy de *Bos taurus taurus* para detecção e quantificação do antígeno em eritrócitos bovinos / Ana Teresa Burlamaqui Faraco Antonangelo. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2008.

Orientadora: Lígia Souza Lima Silveira da Mota

Co-orientadora: Débora Colombi

Co-orientador: Rogério Abdallah Curi

Assunto CAPES: 20204000

1. Bovino - Melhoramento genético 2. Babesiose 3. Genética animal

CDD 591.15

Palavras-chave: Anticorpo anti-Duffy bovino; Antígeno Duffy-bovino; Babesiose; *Bos taurus indicus*

***Dedico este trabalho àqueles que enchem meus dias de alegria:
meu marido Arthur
e minhas filhas Ana Carolina e Ana Beatriz.***

AGRADECIMENTOS

Já que somos o resultado da interação dos genes que herdamos com o ambiente que nos cerca, agradeço, primeiramente, a meus queridos pais Francisco (já falecido) e Julieta, para os quais o estudo era prioridade tendo sempre me proporcionado um ambiente rico de conhecimentos e curiosidade.

Agradeço principalmente minha mãe, Julieta, que sempre respondeu honestamente às minhas perguntas, me incentivando a fazê-las continuamente e permitindo assim que o espírito investigativo florescesse em mim.

Agradeço às minhas queridas professoras: de ciências, D. Ana Lima e de biologia, Celinha Araújo quem me introduziu no mundo dos laboratórios fazendo-me sua monitora nas aulas práticas no velho laboratório do Instituto de Educação Dr. Manuel José Chaves, antecipando assim minha decisão pela Biologia aos quinze anos de idade.

Agradeço às minhas primeiras orientadoras Marney Pascoli Cereda e Raquel Volpato Serbino, as quais foram marcos importantes, devido ao crédito em mim depositado e me incentivarem sempre.

Agradeço à minha professora de inglês Mônica Tauffic Rosolem pelo grande incentivo, por ouvir freqüentemente meus desabafos e ainda por tão gentilmente corrigir o *Abstract*.

Agradeço ao meu irmão Francisco por ser incansável intermediário entre minha mãe e mim via e-mail, e isto significou digitar correções e sugestões que mudavam a cada instante.

Agradeço aos meus sogros Aparecidinha e Tatinho pela atenção, incentivo e entusiasmo.

Agradeço aos queridos amigos de uma vida inteira pelo constante apoio, pela torcida e, nestes dois últimos anos, entenderem as minhas ausências: Sílvia, Rosane, Maria Lúcia, Martha, Lourdinha, Neca, Tutu, minhas afilhadas Laurinha e Renata e, especialmente a Sônia por constantemente vibrar com minhas conquistas e estar ansiosa para que este mestrado chegue logo ao fim, pois segundo ela, isto roubou-lhe a minha companhia.

Mais que um agradecimento, peço licença para deixar aqui registrado uma homenagem a dois amigos especiais que já partiram: Arion e Pádua, com os quais eu tive o privilégio de conviver e aprender muito.

Agradeço a todos aqueles sem os quais a realização deste trabalho seria impossível:

Prof. Dra. Lígia Souza Lima Silveira da Mota minha orientadora que me recebeu de braços abertos e que, mesmo nos períodos em que tudo parecia dar errado sempre, tinha uma palavra de alento e incentivo e, acima de tudo, pela amizade e respeito a mim dispensados e, por ter apostado que eu era capaz.

Dra. Débora Colombi que foi “pau pra toda obra” e, nos últimos meses, o meu anjo da guarda conduzindo-me pela mão, desembaraçando aquilo que parecia não ter conserto. Enfim guiando-me e dando-me força.

Dr. Antonio Sérgio Kimus Braz pelas valorosas contribuições, não só na parte de bioinformática, mas principalmente por aturar minhas freqüentes consultas.

Dr. Rogério Cury pelas valiosas sugestões e correções.

Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia por ter disponibilizado reagentes e seu laboratório.

Prof. Dra. Adriana Pinto Wasko pelo uso de equipamentos, reagentes e principalmente pela sua amizade.

Prof. Dr. Celso Marino pelo uso de equipamentos.

Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla do Departamento de Parasitologia IB-Unesp-Botucatu/SP por disponibilizar aparelhos, reagentes, pelas valorosas contribuições e acima de tudo por estar sempre tão acessível.

Prof. Dr. João Pessoa do Departamento de Microbiologia e Imunologia IB-Unesp-Botucatu/SP, por disponibilizar aparelhos, as placas de ELISA e reagentes.

Prof. Dr. Silvio Luís de Oliveira do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB-UNESP- Botucatu/SP por ter gentilmente cedido as fêmeas de camundongo.

Prof. Dr. José Luis Moraes Vasconcelos do Departamento de Produção Animal FMVZ Unesp-Botucatu/SP, pelas amostras de sangue de bovinos.

Dr. Maurício Hilário Nabuco da Central Bela Vista – Pardinho/SP por ceder amostras de sangue de bovinos.

Médica Veterinária Andreza Pimenta de Oliveira da Agropecuária W2R – Pardinho/SP, também pelas amostras de sangue.

Prof. Dr. Alexandre Secorum Borges por disponibilizar material, equipamentos, reagentes e por ser sempre uma presença alegre no laboratório.

Prof. Dr. César Martins pelo apoio e amizade.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo a mim concedida.

Agradeço as queridas Irani e Andréa, pelo carinho, amizade e por estarem sempre prontas a me ajudar, mesmo que isto significasse sacrificar o final de semana.

Agradeço imensamente a amizade das minhas queridas companheiras de bancada do LBMA: Fernanda, Magali e Thaís, por vibrarem com minhas vitórias e sofrerem com minhas derrotas. A Magali um agradecimento especial pelas

valiosíssimas dicas e lições de informática e por adoçar muitos dos meus dias com suas maravilhosas trufas. Vocês foram muito importantes no meu dia a dia.

Agradeço aos amigos do Biogen e Cagen: Flávio (Bonsai), Regiane, Akemi, Fábio, Negin, Edmárcia, Rodrigo, Roberto (Bob), Vanuza, Júlio, Virgínia, Tânia e Helena pela ajuda, atenção e amizade que sempre me dispensaram.

Agradeço a Arina e ao Jair do Laboratório de Telômeros, Jaime, Aline e Diego, alunos do Prof. Paulo Ribolla e Sueli aluna do Prof. João Pessoa.

Agradecimentos especiais aos queridos Peres, Paulo e Zé Filho que estavam sempre prontos para coletar as amostras de sangue assim que necessário.

Agradeço aos funcionários Lula e José do Departamento de Microbiologia e Imunologia IB-Unesp-Botucatu/SP, por sangrarem as fêmeas de camundongo.

Enfim agradeço a todos os funcionários do Departamento de Genética: Valquíria, Aline, Zezinho, Maria, Sidneia e Rosana.

Por fim agradeço ao sol da minha vida, Arthur, por me acompanhar em tudo o que eu faço e penso, por mais maluco que seja, e peço perdão pela falta de atenção dos últimos meses.

As minhas queridas filhas Ana Carolina (Pota) e Ana Beatriz (Bia) agradeço por uma vida inteira de alegrias e peço perdão a você, Pota, por ainda não ter ido conhecer sua casa nova; e a você, Bia, por ocupar o computador horas e horas a fio e consequentemente, afastá-la do msn.

Para todos vocês:

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa só: leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo.”

Antonie Saint Exupéry.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

As doenças infecciosas e parasitárias causam perdas importantes em vários setores da produção da pecuária mundial. Estima-se que mais de 600 milhões de bovinos de países tropicais e subtropicais estejam expostos à infecção por *Babesia spp.*, gerando um prejuízo econômico de mais de 1,3 bilhão de dólares por ano. Parte significativa dessa soma destina-se a defensivos e insumos veterinários, os quais poderiam ser substituídos por tecnologias mais eficazes e econômicas, como, por exemplo, animais geneticamente resistentes a parasitas. Os gêneros *Babesia* e *Plasmodium* são hemoparasitas pertencentes ao filo Apicomplexa e apresentam características comuns no processo de invasão eritrocitária. A babesiose bovina causada por *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* apresenta sinais clínicos similares a malária humana causada por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*. O antígeno Duffy é o único receptor para o *P. vivax* em humanos. A maioria dos indivíduos negros africanos é resistente a este parasita devido a uma mutação que provoca a ausência de expressão deste antígeno na superfície das hemácias. Tendo em vista esse fato, e que animais da subespécie *Bos taurus taurus* são mais susceptíveis à babesiose quando comparados à animais *Bos taurus indicus*, este projeto foi desenvolvido com o objetivo de averiguar se essa maior resistência dos animais zebuínos está associada ao fato do antígeno Duffy estar ausente ou expresso em menor quantidade nas hemácias desses animais. Para detecção e quantificação do antígeno Duffy, na superfície das hemácias de bovinos dessas subespécies, foi produzido um anticorpo policlonal anti-Duffy bovino, visto que sua detecção não é possível pelos anticorpos desenvolvidos para a proteína humana, em função dessa diferir da proteína bovina, principalmente na sequência de aminoácidos da região N-terminal. Para tanto, foi utilizado um decapeptídeo sintético (YNETDVEAAA) correspondente à porção do aminoácido 34 ao 43 da região extracelular N-terminal da proteína bovina. Ensaio de ELISA competitivo mostraram que o anticorpo produzido foi capaz de reconhecer o antígeno Duffy presente nas membranas das hemácias de animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. A análise quantitativa não demonstrou diferença significativa na presença do antígeno Duffy nas membranas eritrocitárias de bovinos dessas subespécies, dados que vão ao encontro dos obtidos anteriormente, em que não foram observadas diferenças nos níveis de transcritos do gene *Duffy* em animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Estes resultados sugerem que a resistência maior dos zebuínos à babesiose não se deve à ausência de expressão, ou à presença em menor quantidade do antígeno Duffy na superfície de suas hemácias. Portanto, conclui-se que a princípio, a utilização do antígeno Duffy como fator de seleção para a característica de resistência à babesiose, não se apresenta promissora para programas de melhoramento genético de bovinos.

ABSTRACT

Cattle business worldwide has been affected by all sorts of infections. It's estimated that more than 600 million bovines from tropical and sub-tropical areas are exposed to *Babesia spp.* infection causing loss of more than US\$ 1,3 billion a year. An important part of this amount is spent on veterinarian drugs and vaccines. However this scenario could be changed if cheaper and more efficient technologies such as animal breeding for resistance to parasites were used. The genera *Babesia* and *Plasmodium* are hemoparasites which belong to phylum Apicomplexa and share features such as the RBCs invasion process. Clinic signs presented by cattle infected with *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* are very similar to those presented by human beings infected with *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. The glycoprotein Duffy is the only human erythrocyte receptor for *P.vivax*. The majority of black African people are resistant to this parasite due to a mutation which abolishes expression of the Duffy antigen on its erythrocytes surfaces. Detailed information on molecular interaction between *Babesia* parasite and its receptors on the bovine host cells surface is limited. Moreover, animals from subspecies *Bos taurus taurus* are more susceptible to babesiosis infection than those from *Bos taurus indicus*. This project investigated if this higher resistance of *Bos taurus indicus* animals is due to the fact that the Duffy antigen is absent or less expressed on its RBC surface. Aiming at detecting and quantifying Duffy antigen on erythrocyte surfaces of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus*, a polyclonal antibody against bovine Duffy was produced, because antibodies against human Duffy can not recognize this bovine protein which has different aminoacid sequence at N-terminal. Synthetic decapeptide (YNETDVEAAA) corresponding to aminoacid 34 to 43 of the N-terminal extracelullar domain of the bovine protein, was used. Competitive ELISA showed that the antibody elicited was capable of recognizing the presence of the Duffy antigen in RBC ghosts from both *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus*. Quantitative analyses did not show significant difference on the amounts of Duffy antigen on the erythrocyte membranes from these subspecies. These data are additional to previous ones, where differences at *Duffy* gene transcript levels in bovines from both subspecies could not be observed. These results suggest that *B. taurus indicus* higher resistance to babesiosis is not due to the absence or lower expression of Duffy antigen on their RBC surfaces. Considering these results Duffy antigen would not be useful as an effective selection feature for resistance to babesiosis in bovine breeding programs.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Seqüência total do cDNA do gene <i>Duffy</i> de <i>Bos taurus taurus</i> e sua tradução.....	26
.....	42
Figura 2. Modelo 2D da proteína Duffy de <i>Bos taurus taurus</i>	27
Figura 3. Mapa do Plasmídeo pCMVSPORT6/ <i>Duffy</i>	43
Figura 4. Análise da digestão do clone pCMVSPORT6/ <i>Duffy</i> 5BOV4705	44
Figura 5. Representação da seqüência de nucleotídeos do cDNA do gene <i>Duffy</i> de <i>Bos taurus taurus</i>	45
Figura 6. Análise da amplificação via PCR dos fragmentos FL (A) e Nt (B).....	46
Figura 7. Análise da clonagem do cDNA do gene <i>Duffy</i> de <i>B. taurus taurus</i> correspondente a proteína Duffy e sua porção N-terminal Duffy ₍₁₋₅₇₎ em vetor de expressão pET28a(+)	48
Figura 8. Representação da região de clonagem e expressão do pET28a(+) e análise do seqüenciamento dos clones HisNt1 e HisFL1 em pET28a(+).....	49
Figura 9. Análise da clonagem do cDNA do gene <i>Duffy</i> de <i>B.taurus taurus</i> no vetor de expressão pET28a(+)	47
Figura 10. Análise da clonagem do cDNA do gene <i>Duffy</i> <i>B. taurus taurus</i> por PCR das colônias de <i>E.coli</i> transformadas pelos plasmídeos pMAL-c2E recombinantes	52
Figura 11. Representação da porção extracelular N-terminal da Proteína Duffy de <i>Bos taurus taurus</i>	53
Figura 12. Titulação do anticorpo anti-Duffy bovino por ELISA	54

Figura 13. Detecção da proteína Duffy nas membranas dos eritrócitos de <i>B.taurus taurus</i> e <i>B. taurus indicus</i> por ELISA competitivo	55
---	----

Figura 14. Quantificação da proteína Duffy bovina nas membranas eritrocitárias de <i>B.taurus taurus</i> e <i>B. taurus indicus</i> por ELISA	56
--	----

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos fragmentos de interesse	31
---	----

Tabela 2. Dados básicos das proteínas recombinantes HisFL1 e HisNt1	50
--	----

Tabela 3. Dados básicos das proteínas recombinantes MALFL2 e MALNt2	53
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

A- amper

cDNA- DNA complementar (*complementary DNA*)

DEP- Diferença Esperada na Progenie

DNA- ácido desoxiribonucleico

dNTP- deoxinucleotídeos trifosfato

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

ELISA- ensaio de adsorção imunoenzimática (*Enzyme linked immunoassay*)

FL- *Full Length*

InDels- Inserções e deleções

IPTG- isopropil tio β -galactosídeo

kDa- quilo Dalton

LB- meio de cultura Luria Bertani

LBON- meio de cultura Luria Bertani sem sal (*Luria Bertani medium with NaCl omitted*)

mRNA- RNA mensageiro

NaMOPS- Na 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

Nt- N-terminal

Pb- pares de bases

PBS- *Phosphate buffer saline*

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

SDS- dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SNP- Polimorfismo de base única (*Single Nucleotide Polimorfism*)

TA- Temperatura ambiente

TBE- Tampão tris ácido bórico EDTA

TE- Tris- EDTA

Tris- tris(hidroximetil) amino metano

tRNA- RNA transportador

UTR- região do mRNA não traduzida (*untranslated region*)

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Taxonomia dos bovinos	15
1.2. Bovinocultura no Brasil	16
1.2.1. Aspecto econômico	16
1.3. Melhoramento genético na bovinocultura	17
1.4. Babesiose bovina.....	20
1.5. Antígeno Duffy	22
2.OBJETIVO.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Obtenção do cDNA do gene <i>Duffy</i> de <i>Bos taurus taurus</i>	29
3.2. Minipreparação dos Plasmídeos.....	29
3.3. Eletroforese em gel de agarose	30
3.4. Quantificação do DNA	30
3.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	30
3.6. Digestão	32
3.6.1. Digestão pCMVSPORT6/ <i>Duffy</i>	32
3.6.2. Digestão do plasmídeo de expressão pET28(+) e dos produtos de PCR para clonagem	32
3.6.3. Digestão do plasmídeo de expressão pMalc2E e dos produtos de PCR para clonagem	32
3.7. Purificação de Fragmento de DNA em Gel de Agarose	33
3.8. Ligação	33
3.9. Preparação de Células Competentes	33
3.10. Transformação	34
3.11. Preparo de cultura permanente	35
3.12. Seqüenciamento dos fragmentos de DNA.....	35

3.13. Indução da expressão das proteínas recombinantes	35
3.14. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	36
3.15. Obtenção do Soro antiDuffy bovino	37
3.15.1. Peptídeo sintético	37
3.15.2. Imunização dos camundongos	37
3.16. Processamento do sangue dos bovinos	37
3.17. Extração da membrana dos eritrócitos	38
3.18. ELISA.....	38
3.18.1. ELISA -placa sensibilizada com o peptídeo.....	38
3.18.2. ELISA - placa sensibilizada com membrana dos eritrócitos	39
3.18.3. ELISA Competitivo.....	40
3.19. <i>Western Blotting</i>	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Obtenção do cDNA do gene <i>Duffy</i> de <i>Bos taurus taurus</i>	42
4.2. Amplificação do cDNA do gene <i>Duffy</i> via PCR.....	44
4.3. Clonagem e expressão da proteína Duffy de <i>Bos taurus taurus</i> e sua porção N-terminal Duffy ₍₁₋₅₇₎	47
4.3.1. Vetor pET 28a(+)	47
4.3.1.1. Clonagem.....	47
4.3.1.2. Expressão	50
4.3.2. Vetor pMAL-c2E.....	51
4.3.2.1. Clonagem.....	51
4.3.2.2. Expressão	52
4.4. Produção e caracterização do Soro anti-Duffy bovino.....	53
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. ANEXOS.....	83
8.1. Comparação da porção codificadora do gene <i>Duffy</i> (A) e da proteína (B) Duffy de <i>Bos taurus taurus</i> com as seqüências correspondentes de <i>Homo</i> <i>sapiens</i>	83

8.2. Análise do seqüenciamento de um clone HisNt1 e um HisFL1 em pET28a(+)	84
8.3. Controle do plasmídeo pET pelo promotor T7/lac	87
8.4. Célula E. coli BL21(DE3)pLysS	88
8.5. Modelo 2D da proteína Duffy de <i>Bos taurus taurus</i>	89
8.6. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína Duffy de <i>Bos taurus taurus</i> e <i>Bos taurus Indicus</i> .	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Taxonomia dos bovinos

Os bovinos pertencem ao Gênero *Bos*, Família *Bovidae*, Ordem *Artiodactyla*, sendo encontrados em praticamente todos os países do mundo, com uma estimativa de que existam mais de 1,2 bilhões de animais de aproximadamente 780 raças (FRIES & RUVINSKY, 1999), sendo a criação de gado a maior atividade pastoril do mundo (MACHUGH, *et al.* 1997). A evolução humana tem sido influenciada pela bovinocultura, que representa importante fonte de alimento (CUNNINGHAM, 1992), couro e tração animal (MACHUGH, 1997).

De acordo com a nomenclatura clássica de Linnaeus, os bovinos são divididos em duas espécies do gênero *Bos*, *Bos taurus* e *Bos indicus*. A espécie *Bos taurus* (taurinos) engloba as raças européias e africanas, sem cupim e a *Bos indicus* (zebuínos) engloba as raças indianas e africanas, com cupim (DEL LAMA, 1991). Esta classificação é sustentada pela alta diversidade genética, estimada a partir de polimorfismos protéicos (MANWELL & BAKER, 1980), do polimorfismo morfológico do cromossomo Y, geralmente submetacêntrico em taurinos e acrocêntrico em zebuínos (KIEFFER & CARTWRIGTH, 1968) e polimorfismos de microssatélites em cromossomos autossômicos (MACHUGH *et al.*, 1997). Entretanto, muitos autores consideram inadequada a proposta de classificação das raças européias e indianas como espécies diferentes em razão da completa infertilidade e por não ter existido isolamento geográfico entre elas, sugerindo assim, a classificação destes grupos como subespécies.

Há duas hipóteses principais para explicar a origem desses grupos. Uma afirma que o gado domesticado primeiro se desenvolveu de um único ancestral selvagem, o Aurorque (*Bos primigenius primigenius*), durante a fase Neolítica. Posteriormente foi produzida a população de *Bos indicus* por meio de cruzamento e seleção do gado *Bos taurus* (EPSTEIN, 1971; EPSTEIN & MASON, 1984; PAYNE, 1991). A hipótese alternativa sugere que a população de zebu foi desenvolvida independentemente no Neolítico, sendo o provável progenitor a subespécie de Aurorque encontrada no sul da Ásia (*Bos primigenius namadicus*). Esta interpretação é suportada por achados arqueológicos e evidências genéticas (MEADOW, 1993; LOFTUS *et al.*, 1994; BRADLEY *et al.*, 1996, MACHUGH *et al.*, 1997).

Devido às diversas teorias de origem dos bovinos, na literatura são encontradas várias classificações e nomenclaturas: *Bos primigenius taurus* e *Bos primigenius indicus*

(HENKS *et al.*, 2005), *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* (BARUSELLI *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2006), *Bos indicus* e *Bos taurus* (MAcHUGH *et al.*, 1997; REGE, 1999). Este trabalho adotará a nomenclatura *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*.

1.2. A Bovinocultura no Brasil

A criação de bovinos é uma vocação natural do Brasil onde as condições de solo e clima permitem que a atividade seja explorada em todo o seu vasto território.

O rebanho brasileiro é composto por aproximadamente 80% de animais da subespécie *Bos taurus indicus* de origem indiana (também chamados zebuínos) e por produtos de seu cruzamento com animais da subespécie *Bos taurus taurus* de origem européia (GARCIA, 1995). Apesar da proximidade filogenética, essas duas subespécies apresentam características fenotípicas bastante distintas com reflexos marcantes nas eficiências produtiva e reprodutiva.

De maneira geral, os zebuínos apresentam grande rusticidade caracterizada pela adaptação às condições climáticas das regiões tropicais e pela resistência/tolerância aos endo e ectoparasitas, bem como a algumas doenças infecto-contagiosas (SANTIAGO, 1985). Os taurinos, por sua vez, são menos adaptados ao clima tropical, pois apresentam dificuldade em eliminar o excesso de calor corporal em função de deficiências de seu aparelho termo regulador e são mais susceptíveis às doenças infecciosas e infestações parasitárias, especialmente a babesiose e anaplasmose. Por outro lado, são significativamente mais eficientes no que se refere aos parâmetros produtivos e reprodutivos, especialmente na qualidade de acabamento de carcaça e precocidade sexual.

As doenças infecciosas e parasitárias causam perdas importantes em vários setores da produção pecuária no Brasil e no mundo. Dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (Sindam) indicam que o Brasil é o terceiro maior mercado de defensivos e insumos veterinários. Parte significativa dessa soma destina-se a produtos que poderiam ser substituídos por tecnologias mais eficazes e baratas, como, por exemplo, animais geneticamente resistentes a parasitas (SANTOS, 2001).

1.2.1. Aspecto econômico

De acordo com a FNP Consultoria e Agroinformativos, o plantel nacional conta, atualmente, com 165 milhões de animais (efetivo do rebanho em 31 de dezembro de 2006) (Anualpec, 2007) e, segundo resultados preliminares do Censo Agropecuário de 2007, com 169,9 milhões de cabeças (IBGE, 2008) representando o maior rebanho

comercial do mundo. Em 2005 o Brasil passou a ser o maior exportador mundial de carne bovina em toneladas (Abiec, 2007). No ano de 2006, de uma produção de 8.581.686 toneladas de equivalente-carcaça, foram exportadas 2.099.630 toneladas gerando US\$ 3.134.436 (Anualpec, 2007). O PIB do agronegócio brasileiro em 2006 foi da ordem de R\$ 540 bilhões correspondendo a 27,9% do PIB nacional, sendo que, destes, aproximadamente R\$160 bilhões (8,3% do PIB nacional) são devidos à pecuária bovina (CNA, 2006). De janeiro a agosto de 2007, o Brasil exportou 1.128.000 toneladas de carne bovina gerando US\$ 2,935 bilhões, 56 mil toneladas de produtos lácteos gerando US\$135 milhões e no setor de couro e seus produtos foram exportados 325 mil toneladas com faturamento de US\$ 2,421 bilhões (CNA, 2007).

A carne brasileira apresenta vantagem frente a de outros países exportadores por ter preço competitivo e volume necessário para abastecer os mercados interno e externo. Entretanto a manutenção e a conquista de novos mercados estão ligadas à qualidade dos produtos e a sanidade do rebanho, o que justifica esforços e investimentos no combate às doenças.

1.3. Melhoramento genético na bovinocultura

O melhoramento das características fenotípicas de interesse produtivo em bovinos vem sendo alvo de grandes esforços e, mesmo que praticada empiricamente, vem ocorrendo há cerca de 10.000 anos. A domesticação dos animais permitiu ao ser humano exercer a seleção artificial para características desejáveis e alterar, mesmo que inconscientemente, a constituição genotípica das populações (SANTOS, 1995). O conhecimento de que certas características fenotípicas são herdáveis, levou o homem a controlar os acasalamentos nas espécies em domesticação, selecionando os reprodutores (REED, 1984). O sucesso da seleção depende do valor da herdabilidade do caráter, sendo que heranças poligênicas, dominâncias parciais ou completas, a influência do ambiente e o tempo necessário para a avaliação fenotípica freqüentemente são fatores limitantes (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os esforços dos serviços técnicos brasileiros no sentido de introduzir e melhorar as raças européias foram, geralmente, mal sucedidos. A fixação das raças européias nas zonas tropicais vem se fazendo com notória dificuldade. Diante das condições adversas, o gado decai rapidamente e, após algumas gerações, a produção de leite e carne é reduzida, a natalidade diminui, enquanto que a mortalidade aumenta. A incapacidade do boi europeu em eliminar o excesso de calor corporal, por deficiência de seu aparelho

termo-regulador, torna difícil sua acomodação às regiões de clima quente. Outro fator desfavorável é a pobreza de recursos forrageiros, situação agravada com a ocorrência de zoonoses, especialmente a babesiose, a anaplasmosse e a febre aftosa (SANTIAGO, 1985). O zebu surgiu, então, como opção para nossa pecuária, tornando-a viável economicamente e dando condições de rusticidade ao gado europeu aqui presente desde o início da colonização. Em função disso, atualmente no Brasil, a maior parte do rebanho é composta por animais “azebuados”, ou seja, boa parte de sua composição genética é derivada do *Bos taurus indicus*, trazido da Índia há aproximadamente um século (GARCIA, 1995).

O melhoramento genético dos animais domésticos tem sido direcionado para características tais como: produção, eficiência reprodutiva, eficiência alimentar e resistência a ecto e endo parasitas aplicando, principalmente, princípios de genética quantitativa, de modo que os indivíduos de uma população sejam avaliados por meio de métodos estatísticos. A maior parte dos programas de melhoramento genético de bovinos utilizou, até meados de 1980, a teoria dos índices de seleção, com ênfase em seleção dentro de rebanhos. A partir dessa data, a metodologia dos modelos mistos para estimar o valor genético dos animais, expresso em termos de Diferença Esperada na Progenie (DEP), vem apresentando grande destaque (HENDERSON, 1988). Apesar dos progressos obtidos, algumas limitações tornaram-se aparentes. A eficiência das técnicas tradicionais de seleção é bastante limitada em relação às características de difícil mensuração ou que não podem ser diretamente mensuradas (resistência a doenças, características de carcaça e de produção de leite de touros), de baixa herdabilidade (fertilidade), ou que apresentam correlações genéticas negativas (produção de leite e concentração de gordura no leite) (SCHWERIN *et al.*, 1995).

Em vista disso, análises que possibilitem detectar variações, ou polimorfismos de DNA que levem às características fenotípicas favoráveis, podem contribuir para solucionar algumas destas limitações. A precisão das predições e a intensidade de seleção aplicada ao rebanho podem ser incrementadas, diminuindo assim, o intervalo entre gerações.

Os polimorfismos são resultantes de mudanças ocorridas na sequência de nucleotídeos do DNA e podem ser classificadas do ponto de vista molecular em três principais tipos: substituições de um único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNPs), inserções/deleções (InDels) que podem variar em comprimento desde uma até centenas de pares de bases, e variações no número de repetições das sequências repetitivas do genoma (VIGNAL *et al.*, 2002). Essas variações podem ocorrer tanto nas

regiões codificantes como nas não codificantes (HARTL & JONES, 1998; GRIFFITHS *et al.*, 2006). São consideradas mutações quando ocorrem em menos de 1% da população e polimorfismos quando ocorrem em mais de 1% da população (VIGNAL *et al.*, 2002).

O tipo mais simples é a substituição em que um nucleotídeo é substituído por outro de mesma natureza química (transição) ou de natureza química diferente (transversão); sendo que as transições são mais comuns que as transversões (HARTL & JONES, 1998). A simples substituição de uma base por outra numa região codificante pode não acarretar mudanças no fenótipo quando altera o códon original para outro códon do mesmo aminoácido (silenciosa ou sinônima), ou resultar numa troca de aminoácido na proteína expressa (não sinônima). No caso das mutações não sinônimas, também chamadas mutação de sentido trocado, quando a troca é feita por um aminoácido quimicamente semelhante ao aminoácido original é chamada substituição conservativa, tendo assim, menos probabilidade de afetar a estrutura e a função da proteína. Alternativamente, as substituições de aminoácidos quimicamente diferentes, chamadas de substituições não conservativas são mais prováveis de produzir mudanças de estrutura e função da cadeia polipeptídica. As substituições podem ainda suprimir ou gerar códons de término de tradução (mutações sem sentido) levando a produção de produtos protéicos inativos, causando assim, grandes efeitos no fenótipo. Já a deleção ou inserção de uma base ocasiona uma mudança na matriz de leitura do RNA mensageiro gerando a partir do sítio mutante uma cadeia polipeptídica sem relação com a seqüência original de aminoácidos da proteína, ou uma proteína truncada sem função (GRIFFITHS *et al.*, 2006). Segundo Guimarães & Costa (2002), embora polimorfismos sinônimos não alterem a seqüência protéica, eles podem modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro e, conseqüentemente, afetar a quantidade de proteína produzida.

Quando as mutações ocorrem em nucleotídeos que estão fora das regiões codificantes como aquelas que intercalam os sítios de ligação a proteínas reguladoras, são geralmente silenciosas não tendo efeito detectável no fenótipo (HARTL & JONES, 1998; GRIFFITHS *et al.*, 2006). No entanto, quando ocorrem em seqüências não codificantes com funções essenciais como, por exemplo, seqüências regulatórias não transcritas como os promotores, os acentuadores (*enhancers*) (ALBERTS *et al.*, 2004) e regiões dos sítios de corte 5' e 3' para junção de éxons do RNA mensageiro causam efeitos no fenótipo (GRIFFITHS *et al.*, 2006). A conseqüência funcional de qualquer mutação de ponto nas seqüências regulatórias depende de sua localização e se esta perturba ou cria um sítio-alvo particular para a ligação de uma proteína, como por

exemplo, os sítios de ligação da RNA polimerase em promotores. Mutações em tais sítios têm o potencial de mudar o padrão de expressão de um gene em relação à quantidade do produto expresso, mas não altera a estrutura da proteína (GUIMARÃES & COSTA, 2002; GRIFFITHS *et al*, 2006). Esta quantidade também pode ser afetada quando ocorrem alterações nas regiões não traduzidas do RNA mensageiro (5' UTR e 3' UTR) (WILKIE *et al*, 2003; GRIFFITHS *et al*, 2006).

Um primeiro estudo dos polimorfismos de base única SNPs em genes humanos demonstrou que cada gene contém uma média de 4 SNPs e que metade dos SNPs causam mutação silenciosa, enquanto a outra metade causa mutações de sentido trocado (não sinônimas) nas proteínas correspondentes, as quais podem ser neutras e não causar alterações detectáveis no fenótipo, ou podem resultar em diferenças nas características individuais de resposta a drogas ou susceptibilidade a doenças (WANG & MOULT, 2001).

Da mesma forma que em humanos, embora os estudos sejam menos numerosos, algumas regiões codificantes de bovinos, podem apresentar grande número de SNPs. Ao seqüenciar fragmentos dos genes da leptina e da APP (*amiloide precursor protein*) de *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, Vignal *et al.* (2002), observaram que a subespécie *Bos taurus taurus* apresentava um número maior de SNPs e, ao compararem indivíduos *Bos taurus taurus* dentro da mesma subespécie, observaram que a região do gene da leptina apresentava um SNP a cada 434bp, e região da APP, um SNP a cada 104pb.

Atualmente, a busca de genes relacionados a características desejáveis está voltada para o estudo da expressão gênica diferencial, baseando-se no princípio de que animais, que apresentam características fenotípicas diferentes, diferem qualitativa e/ou quantitativamente na produção de RNA mensageiros específicos e, conseqüentemente, na produção das respectivas proteínas.

1.4. Babesiose bovina

A babesiose bovina é causada pelos parasitas intraeritrocitários *Babesia spp* (*B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* e *B. major*) (McCOSKER, 1981). O primeiro parasita foi descrito por Babes, em 1888, que o encontrou no sangue de um animal com hemoglobinúria, e o nome *Babesia* foi adotado em sua homenagem (RISTIC & LEVY, 1981). No Brasil, a babesiose é causada pela *B. bovis* e *B. bigemina*, sendo o carrapato do gênero *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, o único vetor (PAIVA-NETO, 2004). Gomes (2000) estimou que este ecto-parasita cause à pecuária brasileira prejuízos que superam US\$ 1,0 bilhão/ano tanto pelos danos causados pelas doenças transmitidas

(anaplasmoses e babesioses), como pela redução da qualidade do couro do animal devido as cicatrizes irreversíveis aí deixadas.

Montenegro (1992) observou que 70% dos casos de doenças hemotrópicas dos bovinos de países em desenvolvimento são devidos à *Babesia spp.*. Em 1981, McCosker estimou que mais de 600 milhões de bovinos, de países tropicais e subtropicais, estariam expostos à infecção por *Babesia spp.*. A babesiose, juntamente com a anaplasmoses, causa a chamada tristeza parasitária dos bovinos que, segundo dados de 1983 do Ministério da Agricultura, provoca prejuízos econômicos consideráveis à pecuária de corte e leite (em torno de US\$ 250 milhões/ano), causando mortalidade de bezerros e gastos com medicamentos no tratamento de animais acometidos pela doença. As perdas econômicas são devido à: redução na produção de leite e carne; infertilidades temporárias de machos e fêmeas; gastos com tratamentos e com medidas preventivas necessárias para introdução do animal de áreas livres em áreas endêmicas e, sobretudo, devido à mortalidade (GONÇALVES, 2000).

Apesar de não existirem dados atuais que quantifiquem os prejuízos totais resultantes dessas parasitoses no Brasil, estima-se que eles sejam consideráveis, uma vez que, só no Estado do Rio Grande do Sul, as perdas anuais causadas, apenas pela babesiose, foram estimadas em US\$ 99 milhões (REGITANO *et al.*, 2006)

Os sinais clínicos do gado infectado por *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* e da malária apresentado por humanos infectados por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* são muito similares sendo inevitável a comparação (COOKE *et al.*, 2005).

Os gêneros *Babesia* e *Plasmodium* pertencem ao filo Apicomplexa e apresentam características comuns no processo de invasão eritrocitária, sendo possível que reconheçam os mesmos receptores (DUBREMETZ, 1998). Nesse sentido, Taylor *et al.* (1990) e Menard (2001) sugeriram a presença de antígenos conservados nos estágios de invasão dos eritrócitos para todo o filo Apicomplexa.

As variações raciais e individuais de susceptibilidade ou resistência bovina à *Babesia spp.* são conhecidas, sendo as raças taurinas mais susceptíveis e as raças zebuínas mais resistentes à infecção por este protozoário (ZWART & BROCKLESBY, 1979; BOCK *et al.*, 1999a, 1999b). Bock *et al.* (1999a), em trabalho de desafio de bovinos contra a *B. bigemina*, constataram que tanto animais *Bos taurus indicus* quanto cruzados (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*), são mais resistentes que animais *Bos taurus taurus*. Entretanto, foram observadas variações individuais dentro de cada grupo. Em outro estudo realizado com animais *Bos taurus indicus* e cruzados (*Bos taurus indicus* x

Bos taurus taurus), que não tiveram contato prévio com carrapatos, Bock *et al.* (1999b) observaram que animais puros têm alto grau de resistência à babesiose, enquanto que animais cruzados são susceptíveis o suficiente para garantir o uso de medidas preventivas.

Em geral, de acordo com a literatura, os animais indianos são mais resistentes aos carrapatos do que os taurinos (VILARES, 1941, UTECH *et al.*, 1978; PAIVA-NETO, 2004), fato este, que poderia explicar a maior resistência destes animais à babesiose. Porém Bock *et al.* (1997), por meio de inoculação intravenosa de sangue contendo parasitas *B. bovis* e *B. bigemina*, verificaram que os animais indianos eram mais resistentes aos parasitas, independentemente da resistência ao carrapato.

Uma possível explicação para os zebuínos serem menos susceptíveis à babesiose, é que estes convivem com hemoparasitas de *Babesia spp.* e carrapatos há milhares de anos sendo que indivíduos susceptíveis sofrem uma maior pressão de seleção e, portanto, se mantêm em uma baixa frequência nas populações. Por outro lado, os taurinos estão expostos a estes hemoparasitas e carrapatos há pouco mais de algumas centenas de anos, não tendo sofrido igual pressão de seleção (DALGLIESH, 1993).

1.5. Antígeno Duffy

A descoberta do antígeno Duffy em humanos ocorreu em 1950, por Cutbush *et al.* (1950) que detectaram o anticorpo no soro de um paciente hemofílico multitransfundido e o chamaram de anti-Fy^a, em homenagem ao paciente em questão, o Sr. Duffy. No ano seguinte, Ikin *et al.* (1951) descreveram o anti-Fy^b, anticorpo que define o par antitético do antígeno Fy^a. Posteriormente, Sanger *et al.* (1955) observaram que a ausência do antígeno Duffy era mais comum em afro-americanos e que provavelmente representava o produto de um alelo silencioso.

Os anticorpos anti-Fy^a e anti-Fy^b são clinicamente significantes na transfusão sanguínea, pois foram associados com reações hemolíticas transfusionais imediatas ou tardias (BOYLAND *et al.*, 1982) e com a doença hemolítica do recém-nascido (VESCIO *et al.*, 1987).

Em humanos, o loco *Duffy* está localizado no cromossomo 1q22-q23 (DONAHUE *et al.* 1968; MATHEW *et al.*, 1994). Inicialmente, acreditava-se que esse gene consistia de apenas um exon que codificava um polipeptídeo de 338 aminoácidos (CHAUDHURI *et al.*, 1995). Estudos posteriores revelaram a presença de um pequeno exon anterior (exon 1)

que contém seqüências não traduzidas e seqüências codificantes. Este exon pode ser unido, após *splicing*, ao segundo exon (exon 2) para dar origem ao transcrito mais abundante, chamado transcrito maior, que codifica uma proteína de 336 aminoácidos (IWAMOTO *et al.*, 1996a). As isoformas diferem nos aminoácidos da região amino-terminal (N-terminal), onde o transcrito maior tem 6 aminoácidos e o menor tem 9, porém eles não diferem na ligação com anticorpos anti-Duffy, nem na ligação com quimiocinas (YASDANBAKHSH *et al.*, 2000).

O gene *Duffy* apresenta alelos múltiplos, entre os quais os alelos codominantes *FY*A* e *FY*B*, que codificam os dois antígenos principais, Fy^a e Fy^b , respectivamente (CUTBUSH *et al.*, 1950; IKIN *et al.*, 1951). Estes alelos diferem por substituição de uma guanina por uma adenina na posição 131 do cDNA do transcrito menor ou 125 do transcrito maior, alterando o códon 44 ou 42, dependendo da isoforma, o qual codifica o aminoácido glicina no antígeno Fy^a e o ácido aspártico no antígeno Fy^b (CHAUDHURI *et al.*, 1993; 1995). As combinações dos alelos definem quatro fenótipos: $Fy(a+b+)$, $Fy(a+b-)$, $Fy(a-b+)$ e $Fy(a-b-)$, os quais apresentam distribuição diferencial entre as populações humanas. Os fenótipos Duffy positivo $Fy(a+b+)$, $Fy(a+b-)$ e $Fy(a-b+)$ apresentam maior freqüência nas populações caucasóides e asiáticas, enquanto que o negativo $Fy(a-b-)$, se apresenta em maior freqüência nas populações negróides (BEATTIE, 1988).

O fenótipo $Fy(a-b-)$ é devido a uma mutação pontual na região promotora (-33 T>C) do alelo *FY*B*, na região GATA box (TOURNAMILLE *et al.*, 1995; IWAMOTO *et al.*, 1996b), que altera o sítio de ligação do fator de transcrição eritróide GATA-1, resultando na ausência de expressão do antígeno Fy^b apenas nos eritrócitos, não alterando a expressão desta proteína em outros tecidos. Esta mesma mutação foi encontrada no alelo *FY*A* de indivíduos da região endêmica de *Plasmodium vivax* na Papua-Nova Guiné (ZIMMERMAN *et al.*, 1999).

A expressão reduzida do antígeno Fy^b em brancos foi associado à mutação 265 C>T na região codificante do exon 2 do *FY*B* que promove a troca 89 Arg>Cys na cadeia peptídica (TOURNAMILLE, *et al.*, 1998), e caracteriza o alelo *FY*X* postulado por Chown *et al.* (1965). Esta mutação, quando presente, acompanha-se da mutação 298 G>A no mesmo alelo *FY*B*, que leva à substituição 100 Ala>Thr na cadeia peptídica, podendo esta última também ser encontrada isoladamente (OLSON *et al.*, 1998; PARASOL *et al.*, 1998). Porém, de acordo com Yazdanbakhsh *et al.* (2000) a mutação 100 Ala>Thr não influencia na quantidade de proteína expressa.

O antígeno sanguíneo Duffy também foi identificado como um receptor promíscuo de quimiocinas pois é capaz de se ligar tanto a quimiocinas de classe CC como as CXC portanto, foi renomeado DARC (*Duffy Antigen Receptor Chemokine*) (CHAUDHURI *et al.*, 1994; MURPHY, 1994; NEOTE *et al.*, 1994). Trata-se de uma glicoproteína de 35-43 kDa (HADLEY *et al.*, 1984) transmembrana multipassagem que atravessa com sete alças a membrana plasmática, constituindo assim três domínios intracelulares, três extracelulares (ECD2: aminoácidos 119 a 129, ECD3: 189 a 206, ECD4: 267 a 288) (WASNIOWSKA *et al.* 2004), um domínio carboxi-terminal intracelular e um domínio amino-terminal extracelular (*extracellular domain* 1- ECD1). No domínio N-terminal, formado pelos 60 primeiros aminoácidos, está localizado um sítio eficientemente glicosilado no aminoácido 16 (asparigina) (TOURNAMILLE *et al.*, 2003), e mais outros dois prováveis sítios de glicosilação nas aspariginas 27 e 33 (CZERWINSKI, *et.al.*, 2007). É também nesta porção amino-terminal (ECD1) que residem os epítomos antigênicos maiores Fy^a e Fy^b (WASNIOWSKA *et al.*, 2000; TOURNAMILLE *et al.*, 2003), e o epítopo Fy6 (TOURNAMILLE *et al.*, 1997, 2005), pelo qual se dá a interação com o *P.vivax* e o *P. knowlesi* (CHITNIS *et al.*, 1996; TOURNAMILLE, 2003). Embora estes epítomos sejam também responsáveis pelo caráter promíscuo da ligação do DARC à quimiocinas, é necessário que haja uma associação estreita do ECD1 com o quarto domínio extracelular (ECD4), através de pontes dissulfeto, para que isto ocorra (TOURNAMILLE *et al.*, 1997, 2003; BREVERN *et al.*, 2005).

Além dos eritrócitos, a glicoproteína Duffy também é encontrada nas células endoteliais de veias pós-capilares em diferentes órgãos e em outros tipos celulares, incluindo as células de Purkinje no cerebelo, células epiteliais dos túbulos coletores do rim e pneumócitos tipo I dos pulmões (HADLEY *et al.*, 1994; HADLEY & PEIPER., 1997; HORUK *et al.*, 1997; PEIPER *et al.*, 1995; CHAUDHURI *et al.*, 1997; GIRARD *et al.*, 1999).

É postulado que sua função nos eritrócitos seja a de neutralizar níveis elevados de quimiocinas na circulação (DARBONNE *et al.*, 1991) e, apesar de sua função nas células endoteliais não ser bem entendida, tem sido sugerido que este receptor facilitaria o transporte de quimiocinas do tecido para o lúmen vascular. Entretanto, a ligação com quimiocinas não transduz nenhum sinal nem altera a função da célula endotelial (LEE *et al.*, 2003).

Miller *et al.* (1975) e Mason *et al.* (1977) descreveram correlação entre o antígeno Duffy e a malária, em que portadores do fenótipo Fy(a-b-) eram resistentes à infecção

pelo parasita malárico símio *Plasmodium knowlesi*. Esses mesmos autores observaram que, *in vivo*, somente portadores dos antígenos Fy^a e Fy^b contraíam malária por *P. vivax* (MILLER *et al.*, 1976), concluindo que o antígeno Duffy era determinante para a invasão dos eritrócitos pelos merozoítas do *P. knowlesi* e *P. vivax*.

Recentemente algumas associações têm sido feitas entre a ausência do antígeno Duffy nos eritrócitos e a angiogênese tumoral (MOORE *et al.*, 1999; LENTSH, 2002; SHEN *et al.*, 2006), que seria favorecida pelo excesso de quimiocinas na circulação devido à ausência do receptor nos eritrócitos. Aproximadamente 70% dos afro-americanos não expressam os antígenos Duffy nos eritrócitos e a incidência do câncer de próstata nesses indivíduos é 60% maior do que aquela encontrada em caucasianos, com taxa de mortalidade duas vezes mais elevada (STANFORD *et al.*, 1999).

O gene *Duffy* em *Bos taurus taurus* (GenBank: BT021079.1) está localizado no cromossomo 3 e é composto por dois éxons de 21 e 972 nucleotídeos, respectivamente, e um íntron de 426 nucleotídeos. Sua porção funcional (993pb) codifica um polipeptídeo de 330 aminoácidos (GenBank: AAX09096) (Figura 1) de aproximadamente 37KDa que assim como a proteína humana homônima possui sete regiões transmembrana e quatro extracelulares sendo uma destas composta por 56 aminoácidos que correspondem à porção N-terminal da proteína bovina (Figura 2). Embora as seqüências codificantes dos genes *Duffy* humano e de *B. taurus taurus* apresentem homologia de 75,3%, o produto destes têm somente 64,1% de homologia (TOURNAMILLE *et al.*, 2004). Esta diferença é mais pronunciada na região N-terminal da proteína justamente onde residem os epítomos que são reconhecidos pelos anticorpos desenvolvidos para detecção das aloformas humanas, conseqüentemente, não sendo possível a detecção do antígeno bovino por estes anticorpos (TOURNAMILLE *et al.*, 2004) (Anexo 8.1).

Apesar de algumas hipóteses terem sido levantadas e estudos estarem sendo realizados nesse sentido, as bases bioquímicas, fisiológicas e genéticas dessas variações de resistência e susceptibilidade bovina à babesiose ainda não foram totalmente esclarecidas. Diante disso, a hipótese levantada a partir da revisão apresentada é que, a exemplo do que ocorre em humanos em relação à malária vivax, a resistência ou susceptibilidade dos bovinos à babesiose pode estar relacionada, entre outros fatores, à ausência ou presença em menor ou maior quantidade do antígeno Duffy na superfície dos eritrócitos.

AACTACCCCAGCCCATCTCTCTGCCCGCCCTGCA

CAGCATCATGGGGAACGTCTTTTACCGGTGGCTGATGACAACTCACCAAGTTGGCCATTAAAGAGGACTTT
M G N C L Y P V A D Q N S T K L A I K E D F

TTGATTGACTTTCCGGAGGACTACTATCCAGACTATAATGAGACCGACGTGGAAGCAGCTGCACCCCTGCCAC
L I D F P E D Y Y P D Y N E T D V E A A A P C H

TCCTGCTCACTGCTCAACTACTCTCACTGCCCTTTCTTCATCCTTTGTCAGCATCCTGGGCATCCTGGCTAGT
S C S L L N Y S S L P F F I L V S I L G I L A S

GGGACCATCCTCTATGCGCTTCTCAGACCTTTGTTCCGCTGGCAGCTCTACCAGGACAGGTCTACCTGGTG
G T I L Y A L L R P L F R W Q L Y Q D R S T L V

CAACTGCGCTGGGCACTGCCCTCTTCAGCATCGTGGTCCCATCCTGGCACGGGCTCAGTGGGGCTCTC
Q L A V G S A L F S I V V P I L A R G L S G A L

ATCACCTCCCTGTGCCACCTGGCTCACTTGGTCCCTATGCGCTCAGCCCTTGGCTCAAGCTCTGCTAATAGGG
I T S L C H L A H L V A Y G S A F A Q A L L I G

TACCATGCCTGCCCGCCCGCCAGCTGGGTGCAGGCCAAGTCCAGGCCCTCAGGCTGGGGTCACTGTGGCA
Y H A C L G P Q L G A G Q V P G L R L G V T V G

CTTTGGGAGTGGCTGCCCTCTCTCACTGCCAGTGGTGGTGGCAGTGACACTTCCCAAGGACTCTGCACC
L W G V A A L L S L P V V L G S D T S Q G L C T

GTGACCTTTAGCGGGAGTGGGAAACATTCGGGTACATACCGCTGCAGCCTGCTTTGCCATATTGTCTTG
V T F S G E W E T L R Y I H A A A C F A I F V L

TTGCCACTGGGTTTGTTCGGGAACCAAGGGCTGAAGACGGTGGTGGCAGGGCACCGTCCCATGGGTGAT
L P L G L L G T K G L K T V L G R A P C P W V D

GTCTGTGGGTCTGCTTCATTTTCTGGTGGCTCAGGGCATGACTCTGGGATGGACTCCCTAGTGAGGTCC
V L W V W F I F W W P Q G M T L G L D S L V R S

AAGGCCATAGTGGTGTCAACATGTCCAGCCCAGCAGGCCCTGGACATGCTGCTGGATGTGCCAGAAGCCCTG
K A I V V S T C P A Q Q A L D M L L D V A E A L

GCAATATTGCACTCGGTGGCTACACCCCTGCTCCTTGGCTGGGTCTGCTACCAAGGCCACTCACACCTCCCA
A I L H C V A T P L L L A W V C Y Q A T H T S P

CCCTCCCTGCCTCTGCCACACAGACTTCTCATCTGGACACCCCTTGAGGCAAATCCTAGCTCTCTGCC
P S L P L P T T Q T S H L D T L G G K S *

CACCTGTCAACCTGAATTAAAGTCTACGCTGTTTTTATTTT

Figura 1. Sequência total do cDNA do gene *Duffy* de *Bos taurus taurus* e sua proteína (Duffy) depositadas no GenBank sob número de acesso BT021079 (gi|59858522|gb|BT021079.1| *Bos taurus* Duffy blood group (FY), mRNA, complete cds). Em cinza: sequências 5' e 3' UTR, respectivamente. Sublinhado: códons de início (nucleotídeo 47) e de término da transcrição (nucleotídeo 1037). Em vermelho: sequência da proteína traduzida na ORF +1 pelo Servidor BMC Search Launcher

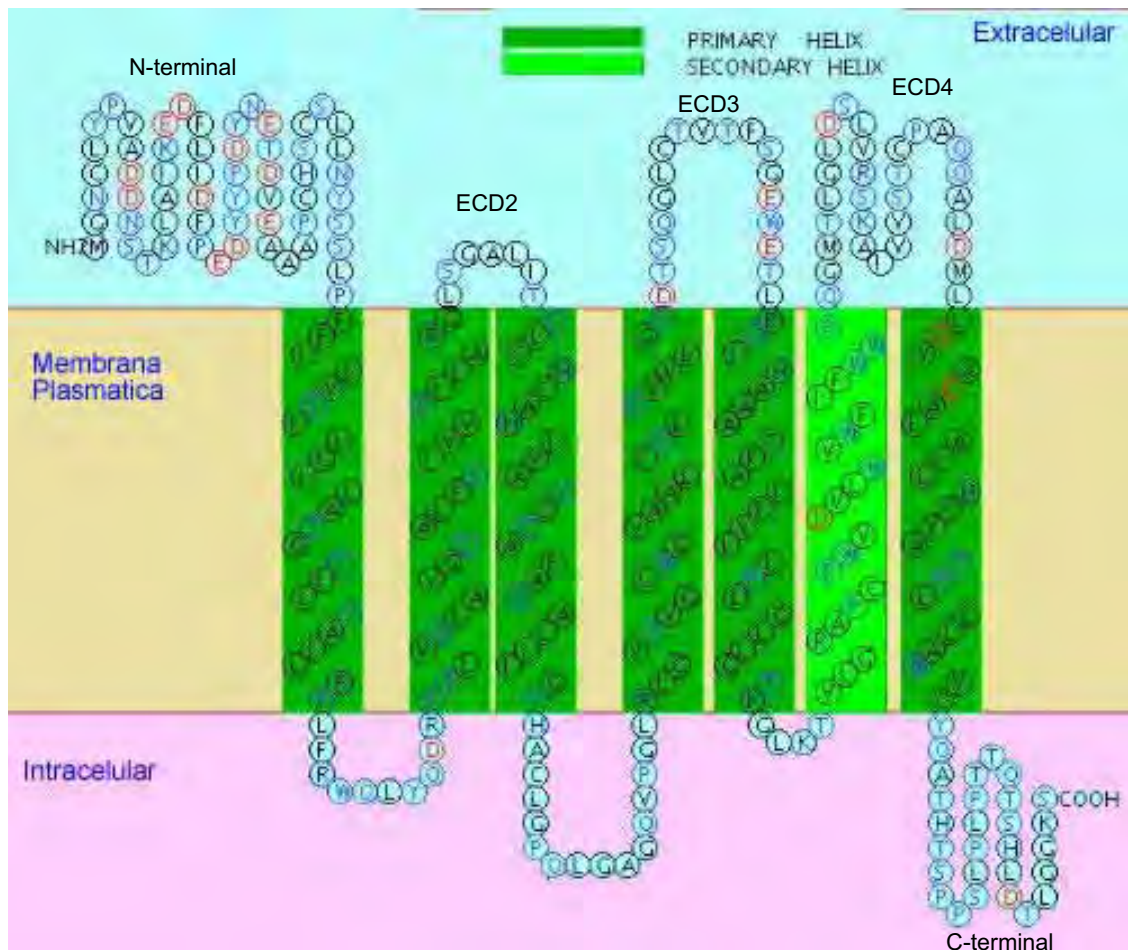


Figura 2. Modelo 2D da proteína Duffy de *Bos taurus taurus* (AAX09096.1) construído pelo servidor SOSUI. Domínio extracelular N-terminal com 57 aminoácidos (Met 1 à Pro 57), ECD2, 3 e 4: Domínio Extracelular (*Extra Celular Domain*) 2, 3 e 4. Domínio intracelular C-terminal. Destacado em verde: 7 regiões transmembrana.

2. OBJETIVO

Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo desenvolver um anticorpo policlonal contra a glicoproteína Duffy bovina, para utilização em ensaios de imunodiagnóstico possibilitando análise qualitativa e quantitativa da glicoproteína Duffy nas hemácias destes animais.

Dessa forma, em caso de confirmação da hipótese do antígeno Duffy como receptor para o parasita *Babesia spp.*, poder-se-ia no futuro utilizar este anticorpo na fenotipagem de bovinos resistentes ou susceptíveis à babesiose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Biotecnologia e Genética Molecular (BIOGEM) e do Laboratório de Biologia Molecular Animal (LBMA), ambos pertencentes ao Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (Unesp), campus de Botucatu/SP.

3.1. Obtenção do cDNA do gene *Duffy* de *Bos taurus taurus*

Para a análise experimental da expressão das proteínas Duffy recombinantes foi adquirido junto ao C.H.O.R.I. (*Children's Hospital Resources Oakland Research Institute-BACPAC Resources*, Oakland, Califórnia, USA) o clone de cDNA da sequência correspondente ao mRNA do gene *Duffy* de *Bos taurus taurus* (5BOV4705), cujo número de acesso no GenBank é BT021079.

Os clones se encontravam em 1,5 mL meio de cultura Luria Bertani (LB) ágar *stab* e foram repicados para tubos estéreis contendo meio líquido LB com ampicilina 100 µg/mL. Após incubação de 14 horas a 37°C, alíquotas de 400 µL foram semeadas em LB/agar contendo ampicilina 100 µg/mL para o isolamento de colônias. Algumas colônias isoladas foram utilizadas para a preparação de cultura permanente conforme descrito no item 3.11.

3.2. Minipreparação dos Plasmídeos

A extração do DNA dos plasmídeos contidos em *Escherichia coli* DH5α foi feita por meio de lise alcalina conforme protocolo proposto por Sambrook *et al.* (2001) com modificações. Em tubos contendo 3 mL de meio líquido LB composto de peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1% em pH 7,0 acrescido do antibiótico de seleção do plasmídeo (ampicilina 100 µg/mL ou kanamicina 100 µg/mL) pequenas porções de culturas permanentes ou colônias isoladas de placas de LB/agar foram inoculadas e incubadas a 37°C sob agitação de 230-250 rpm por aproximadamente 12 horas. Após este período, porções de 1,4 mL destas culturas foram transferidas para micro tubos de 1,5 mL os quais foram centrifugados a 12000 x g durante 5 minutos em temperatura ambiente (TA). O sobrenadante foi descartado e cada *pellet* resultante foi ressuspenso em 300 µL da solução P1 (TrisHCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; RNase 100 µg/mL). Os tubos foram agitados com o auxílio de um agitador (*vortex*) até a total dissolução dos *pellets*. As amostras foram então incubadas por 5 minutos a TA ou por 15 minutos a 37°C. Foi adicionado a cada tubo 300 µL da solução de lise P2 (NaOH 200 mM ; SDS

1%) e este agitado suavemente por 5 minutos. Seguiu-se adicionando em cada tubo 300 µL da solução P3 (acetato de potássio 3 M pH 5,5 mantido a 4° C). As amostras foram agitadas suavemente e incubadas por 30 minutos no gelo e então centrifugadas a 12000 x g por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para um novo tubo. Centrifugou-se novamente por 5 minutos a 12000 x g a 4°C. Coletou-se 650 -700 µL do sobrenadante e transferiu-se para novo tubo onde foi adicionado 500 µL de isopropanol 100% gelado. Após homogeneização, incubou-se a -20°C por 12 horas. Após este período as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi totalmente descartado e o restante de líquido retirado com uma micropipeta. Foi adicionado ao precipitado resultante 1mL de etanol 70%. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 5 minutos a 4°C e o etanol foi descartado totalmente. Os tubos foram mantidos abertos em TA ou em estufa a 37°C até a completa secagem do material. Cada amostra foi reidratada com 50 µL de água ultra pura autoclavada.

3.3. Eletroforese em gel de agarose

As amostras de DNA foram adicionadas de 3 a 4% de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%) e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) em Tampão TBE 1X pH 8,3 (Tris-base 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 0,02 M) numa corrente constante de 80 a 100V por 1; 2 e 4 horas, ou até o azul de bromofenol atingir a borda inferior do gel.

3.4. Quantificação do DNA

A quantificação de DNA das amostras foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% por comparação com DNA de concentração conhecida (DNA Lambda) ou em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 *Spectrophotometer* a uma absorbância de 260 nm.

3.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de amplificação dos fragmentos de cDNA foi padronizada e ficou assim definida: 1,25 unidades da enzima *Pfu DNA Polymerase recombinant* (Fermentas, USA), *PCR Buffer* com MgSO₄ [1X], dNTPMix [0,2 mM] , oligonucleotídeo *Forward* [0,2 µM], oligonucleotídeo *Reverse* [0,2 µM], 50 ng DNA molde (plasmídeo pCMV Sport-6 contendo

seqüência de cDNA/Duffy) e água ultra pura autoclavada em quantidade suficiente para um volume total de reação de 50 µL.

As amplificações foram realizadas em termociclador *Mastercycler* personal (Eppendorf AG, Germany) consistindo de 5 passos: (1) desnaturação inicial da fita dupla a 95°C por 5 minutos; (2) desnaturação a 95°C por 1 minuto; (3) anelamento dos oligonucleotídeos a 58°C por 1 minuto; (4) extensão a 72°C por 2 minutos e (5) extensão final a 72°C por 10 minutos. Os passos 2, 3 e 4 constituem um ciclo que foi repetido por 35 vezes. Após o último ciclo ter sido completado pelo passo 4 a temperatura se conservou a 4°C para preservação dos produtos gerados.

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse, assim como os sítios de restrição das enzimas utilizadas para a clonagem direcional nos vetores de expressão pET28a(+) (Novagen, USA) e pMAL-c2E (New England Biolabs Inc., USA) estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos fragmentos de interesse - Os sítios de enzimas de restrição adicionados aos oligonucleotídeos para digestão dos fragmentos amplificados estão sublinhados e o códon de início ATG (*start codon*) está destacado em cinza, F: *forward* e R: *reverse*. FL1 e FL2: Produtos da amplificação do gene *Duffy* correspondente a proteína Duffy total. Nt1 e Nt2: Produtos da amplificação dos fragmentos correspondentes à porção N-terminal da proteína Duffy.

Oligonucleotídeo	Produto	Direção	Sequência	Enzima	Vetor
DfBt_F_Nde/FL	FL1	F	5'CATGTTGCAT <u>ATG</u> GGGAACTGTCTTTACC 3'	Nde I	pET28a(+)
DfBt_R_Xho/FL		R	5'CTACTCGAGCTAGGATTTGCCTCCAAG 3'	Xho I	
DfBt_F_Nde/FL	Nt1	F	5'CATGTTGCAT <u>ATG</u> GGGAACTGTCTTTACC 3'	Nde I	pET28a(+)
DfBt_R_Xho/Nt		R	5'CCGCCTCGAGCAGTGAGGAGTAGTTGAGC3'	Xho I	
DfBt_F_Eco/FL	FL2	F	5'CCGGAATTCAT <u>ATG</u> GGGAACTGTCTTTACC 3'	EcoRI	pMAL-c2E
DfBt_R-Xba/FL		R	5'CTAGTCTAGACTAGGATTTGCCTCCAAG 3'	Xba I	
DfBt_F_Eco/FL	Nt2	F	5'CCGGAATTCAT <u>ATG</u> GGGAACTGTCTTTACC 3'	EcoRI	pMAL-c2E
DfBt_R_Xba/Nt		R	5'CTAGTCTAGACAGTGAGGAGTAGTTGAGC 3'	Xba I	

3.6. Digestão

3.6.1. Digestão pCMVSport6/Duffy

Para a reação de digestão tomou-se 1 µg de DNA plasmidial, Tampão O+ [1X] (Fermentas, USA), 5 unidades de enzima de restrição *SaI* (Fermentas, USA), 5 unidades de enzima de restrição *NotI* (Fermentas, USA) e água ultrapura autoclavada em quantidade suficiente para completar 30 µL de volume total de reação. Incubou-se em banho-maria a 37°C por 4,5 horas.

3.6.2. Digestão do plasmídeo de expressão pET28(+) e dos produtos de PCR para clonagem

O plasmídeo pET28a(+) (Novagen, USA) foi submetido à digestão dupla pelas enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (Fermentas, USA). Para a reação utilizou-se Tampão R+ [1X] (Fermentas, USA), 2 unidades de *XhoI*, 2 unidades de *NdeI*, 500-1000 ng de DNA plasmidial e água ultrapura autoclavada em quantidade suficiente para um volume total de reação de 50 µL. A reação foi incubada em banho-maria a 37°C de 12 a 16 horas. As mesmas concentrações de reagentes foram usadas para a reação de digestão de 400 ng dos produtos de PCR FL1 e Nt1 correspondentes à amplificação da sequência codificante do cDNA do gene *Duffy* bovino e da sequência codificante da porção N-terminal da proteína bovina Duffy respectivamente.

3.6.3. Digestão do plasmídeo de expressão pMal-c2E e dos produtos de PCR para clonagem

A reação de digestão do plasmídeo pMAL-c2E (New England Biolabs Inc., USA) com as enzimas *EcoRI* e *XbaI* (Invitrogen, USA) foi realizada em 2 etapas. Primeiramente utilizou-se Tampão REact® 2 (Invitrogen, USA) [2X] 2 unidades de *XbaI*, 800 a 1000 ng de DNA plasmidial e água ultrapura autoclavada em quantidade suficiente para um volume total de reação de 100 µL. As amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C por 20 horas. Após este período, seguiu-se a segunda etapa da digestão que constou da preparação de uma solução contendo 2 unidades de *EcoRI*, Tampão REact® 3 (Invitrogen, USA) [1X] e 1 µL de NaCl 5 M para ajustar a molaridade da reação anterior de 50 mM para 100 mM e água ultrapura autoclavada em quantidade suficiente para um volume total de 20 µL. Adicionou-se então esta última na reação anterior. A reação foi mantida por mais 18 horas em banho-maria a 37°C. O mesmo procedimento e as mesmas concentrações de reagentes foram empregados para a reação de digestão de 400 ng dos produtos de PCR FL2 e Nt2 correspondentes à amplificação da sequência

codificante do cDNA do gene *Duffy* bovino e da sequência codificante da porção N-terminal da proteína bovina Duffy respectivamente.

3.7. Purificação de Fragmento de DNA em Gel de Agarose

Os produtos de digestão adicionados de 4% de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo até o azul de bromofenol atingir a borda inferior. Um padrão de peso molecular *GeneRuler* DNA Mix, *ready-to-use* (Fermentas, USA) foi usado para a comparação do tamanho das bandas correspondentes ao inserto e ao plasmídeo, as quais foram recortadas do gel e transferidas para um microtubo. O DNA embebido em agarose foi purificado empregando o kit *Quiagen QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen, USA), conforme instruções do fabricante e recuperado em 50 µL de água ultrapura autoclavada previamente aquecida a 65°C. Os produtos de digestão purificados foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 *Spectrophotometer*, e as amostras foram armazenadas a -20°C.

3.8. Ligação

Os plasmídeos foram ligados a seus respectivos insertos utilizando-se 60-80 ng de DNA do vetor, 65-75 ng do produto de PCR FL e 25-45 ng do produto Nt, Tampão de ligação *Ligation Buffer* (Fermentas,USA) [1X], 2 unidades de T4 DNA ligase (Fermentas,USA) e água ultrapura autoclavada em quantidade suficiente para um volume final de 30-40 µL. Foram feitas também reações de ligação nos moldes das anteriores contendo os plasmídeos duplamente digeridos sem os insertos, para servir de controle da eficiência da dupla digestão. As reações foram mantidas em termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorf AG, Germany) a 22°C por 16 horas, seguidas de 10 minutos a 65°C para inativação da enzima T4 ligase.

3.9. Preparação de Células Competentes

Com a ajuda de um palito estéril, pequenas alíquotas de culturas de diferentes cepas de *E.coli* (DH5α, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, USA); BL21(DE3)CodonPlus, BL21(DE3)CodonPlus-RP, ArcticExpress™(DE3) (Stratagene, USA); Rosetta(DE3) (Novagen, USA); BL21(Invitrogen, USA) ou BL21-SI™(Life Technologies) mantidas em placas com meio LB/ágar ou em cultura permanente a -80°C,

foram inoculadas em 3 mL de meio líquido SOB (Tryptona 2%, Extrato de levedura 1%, NaCl 17 mM, MgCl₂ 10 mM e KCl 5 mM) e incubadas a 37°C sob agitação de 250 rpm por 14 horas. Após este período, 500 µL destas culturas foram usados para inocular 50 mL de meio SOB os quais foram incubados a 37°C sob agitação de 250 rpm até atingir a absorbância de 0,6 a 600nm. As culturas foram então mantidas no gelo por 15 minutos e adicionadas de 1 mL de MgCl₂ 1 M previamente filtrado. A seguir, as células foram centrifugadas a 4000 x g por 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram desprezados. Os precipitados de células foram ressuspensos em 20 mL de solução gelada de KCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, KAC 30 mM pH 6,9, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15%, pH 5,8 e incubadas no gelo por mais 15 minutos. Procedeu-se então nova centrifugação a 4000 x g por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos com 2 mL da solução gelada de NaMOPS 10 mM pH7,0, KCl 10 mM, CaCl₂ 74 mM, glicerol 15%, pH 6,2. Porções de 100 µL destas preparações foram transferidas para microtubos de 1,5 µL e armazenadas a -80°C.

3.10. Transformação

Os plasmídeos contendo os insertos de interesse foram primeiramente utilizados para transformar células de *E. coli* DH 5α e posteriormente linhagens de células de expressão. Para cada reação de transformação foram utilizados 100 µL de células competentes e o volume total da reação de ligação (30-40 µL) ou entre 100 e 200 ng de DNA plasmidial. As reações foram incubadas por 30 minutos em gelo, e posteriormente submetidas a um choque térmico de 90 segundos a 42°C seguidos de 5 minutos em gelo. A seguir, as células foram recuperadas por 1 hora a 37°C sob agitação (180 rpm) após a adição de 800 µL de meio LB líquido sem antibiótico. As reações de transformação foram então plaqueadas em meio LB/ágar contendo os antibióticos de seleção dos plasmídeos e/ou das cepas bacterianas (kanamicina 100 µg/mL, ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 50 µg/mL, gentamicina 20 µg/mL) As placas foram mantidas a 37°C por 16 horas. Como controle negativo foram utilizadas as reações de ligação contendo somente os plasmídeos duplamente digeridos (sem inserto), e como controle positivo amostras de plasmídeos fechados. Quando a cepa de bactéria utilizada foi a BL21-SI a recuperação das células foi feita em tubo plástico de 12mL contendo 900 µL de meio SOC (tryptona 2%, extrato de levedura 1%, NaCl 17 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 5 mM e glicose 0,02 M) sem antibiótico e foi semeada em placas contendo meio LBON/ágar (LB sem sal).

3.11. Preparo de cultura permanente

As colônias de interesse foram transferidas com o auxílio de um palito de madeira estéril para tubos contendo 3 mL de meio líquido LB acrescido do antibiótico de seleção da cepa bacteriana e/ou do plasmídeo (ampicilina 100 µg/mL, kanamicina 100 µg/mL, cloranfenicol 50 µg/mL e gentamicina 20 µg/mL). As amostras foram incubadas por aproximadamente 14 horas a 37°C sob agitação de 230-250rpm. Aliquotas de 850 µL foram transferidas para microtubos acrescidas de 150 µL de glicerol e estocadas a -80°C.

3.12. Seqüenciamento dos fragmentos de DNA

Para o seqüenciamento de amostras de DNA plasmidial extraídos por minipreparação foi empregado o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem, USA). Seguindo as recomendações do fabricante, utilizou-se o tampão Save Money [1x], oligonucleotídeo *forward* (*T7 Promoter*) ou oligonucleotídeo *reverse* (Sp6) [0,5 pmol], 400-500 ng de DNA plasmidial, o mix Big Dye 3,1 (1,5 µL) e água ultrapura autoclavada em quantidade suficiente para completar um volume de reação de 10 µL.

As reações foram processadas em termociclador *Mastercycler* personal (Eppendorf, German) consistindo de quatro passos: (1) desnaturação inicial da fita dupla a 96°C por 2 minutos; (2) desnaturação a 96°C por 45 segundos; (3) anelamento do oligonucleotídeo a 52°C por 30 segundos; (4) extensão a 60°C por 6 minutos (1 minuto/kb do plasmídeo). Os passos 2, 3 e 4 constituem um ciclo que foi repetido por 35 vezes. Após o último ciclo ter sido completado pelo passo 4 a temperatura foi mantida a 4°C para preservação dos produtos gerados. O seqüenciador usado foi o modelo ABI PRISM 377 (Applied Biosystem, USA).

3.13. Indução da expressão das proteínas recombinantes

Colônias de *E.coli* transformadas com os clones de interesse foram inoculadas com o auxílio de um palito estéril em tubos falcon de 15 mL contendo 3 mL de meio LB líquido e o antibiótico de seleção do plasmídeo correspondente (kanamicina 100 µg/mL para pET28a(+) e ampicilina 100 µg/mL para pMAL-c2E) e/ou da cepa bacteriana (cloranfenicol 50 µg/mL para BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, USA); BL21(DE3)-CodonPlus,

BL21(DE3)-CodonPlus-RP (Stratagene, USA) e Rosetta(DE3) (Novagen, USA) e gentamicina 20µg/mL para ArcticExpress™(DE3) (Stratagene, USA)). Quando as células utilizadas foram BL21(DE3) (Invitrogen, USA) ou BL21-SI™ (Invitrogen, USA)) houve adição somente do antibiótico de seleção do plasmídeo. As culturas foram mantidas a 37°C sob agitação de 230 rpm a 250 rpm por 14 horas. Após este período, alíquotas de 250 µL foram transferidas para tubos contendo 5 mL (1:20 v/v) de meio líquido LB acrescido dos antibióticos de seleção adequados, e as células incubadas de 30° a 37°C sob agitação de 230rpm-250rpm até atingir a absorbância entre 0,6 e 0,8 a 600 nm. A seguir, foi retirado 1 mL destas amostras para controle (não induzido) e foi adicionado ao restante IPTG a uma concentração final de 1 mM ou NaCl a uma concentração final de 0,3 M quando a cepa utilizada era BL21SI contendo plasmídeos pET28a(+) (DONAHUE & BEBEE,1999). As células foram incubadas a temperatura de 13°C (ArcticExpress™(DE3)) , 30 ou 37°C (demais cepas) sob agitação de 250 rpm por mais 2,5; 3 ou 24 horas quando foi retirado mais 1 mL para averiguação da indução em gel SDS-PAGE. Quando a cepa utilizada foi a BL21 SI, as colônias foram mantidas em meio LBON.

As amostras retiradas (não induzidas e induzidas) foram centrifugadas por 5 minutos a 10000 x g, ressuspensas em 100 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 10%, DTT 100 mM, de azul de bromofenol 0,1%) e fervidas por 10 minutos antes da aplicação no gel. O experimento de indução na célula ArcticExpress(DE3) seguiu o protocolo proposto pelo fabricante: Stratagene.

3.14. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

O procedimento foi feito segundo método de Laemmli (1970). O gel de resolução foi de 10 a 15% de acrilamida e o de empilhamento de 5%, ambos com espessura de 0,75 mm. O tampão de corrida usado foi Tris-glicina 1X (Tris base 50 mM, glicina 260 mM e SDS 0,1%). O aparelho de eletroforese utilizado foi o MiniProtean® 3 System BioRad e a amperagem empregada foi primeiramente de 16 mA até o total empilhamento das proteínas e de 20 mA assim que as amostras alcançaram o gel de resolução. Após a eletroforese o gel foi corado com “coomassie blue” 0,25% (metanol 50%, ácido acético glacial 10% e coomassie blue 0,25%) durante 1 hora e depois descorado com uma solução de metanol 30% e ácido acético glacial 10% até a visualização das bandas.

3.15. Obtenção do Soro anti-Duffy bovino

3.15.1. Peptídeo sintético

Um peptídeo sintético foi desenhado no programa HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) pelo Dr. Antonio Sérgio Kimus Braz do Departamento de Genética IB-UNESP-Botucatu/SP. Utilizando a seqüência da proteína Duffy de *Bos taurus taurus* depositada no GenBank (AAX09096.1) foi criado um modelo 2D pelo servidor SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui>), e a seqüência de aminoácidos da região de interesse N-terminal foi analisada nos programas PeptGen (<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/PEPTGEN/PeptGenSubmitForm.html>) e Peptide property calculator (<http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>). O peptídeo sintetizado (Invitrogen, USA) constou de 10 resíduos de aminoácidos: YNETDVEAAA e teve seu peso molecular estimado pelo servidor ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) em 1,082 kDa. O peptídeo liofilizado (5 mg) foi diluído em água ultrapura autoclavada a uma concentração de 5 µg/µL, aliquotado em porções de 120 µL e armazenado a -80°C.

3.15.2. Imunização dos camundongos

Utilizou-se 100 µg de peptídeo sintético diluído em 100 µL de adjuvante de Freund completo (1:1, v/v) para imunizar por via intraperitoneal cada uma das cinco fêmeas de camundongo com 8 semanas de vida da linhagem *High IV-A* (IBANEZ *et al.*, 1988). Após 15 e 25 dias, foram aplicadas a segunda e a terceira injeções respectivamente com a mesma quantidade de peptídeo diluído em adjuvante de Freund incompleto (1:1, v/v). Após 15 dias os animais foram sangrados por punção cardíaca. Deste sangue foi feito um *pool* o qual foi incubado a 37°C em banho-maria por 1 hora, e depois centrifugado a 4000 x g por 15 minutos. O soro obtido foi armazenado a -20°C. Outras cinco fêmeas de mesma idade e mesma linhagem não foram injetadas e serviram para obtenção do soro controle.

3.16. Processamento do sangue dos bovinos

Amostras de sangue de 12 animais puros *Bos taurus indicus* e 12 *Bos taurus taurus* foram fornecidas pela Fazenda Experimental São Manuel e pelo Departamento de Produção e Exploração Animal ambos pertencentes a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp campus de Botucatu, pela Central Bela Vista Ltda e Agropecuária W2R ambas situadas no município de Pardinho, SP.

O sangue dos animais foi colhido por venopunção da jugular externa em tubos com vácuo de 5 mL contendo EDTA. As amostras foram mantidas refrigeradas em gelo até seu processamento. Foi feito um *pool* com o sangue dos animais *Bos taurus taurus* e outro com o sangue dos *Bos taurus indicus* (exceção feita a amostras de sangue de três animais de cada subespécie que foram identificadas e processadas separadamente). As amostras foram centrifugadas a 600 x g por 5 a 10 minutos a TA. O plasma foi separado e congelado a -20°C. Da papa de hemácias resultante foi transferido 3 mL para um tubo falcon de 15 mL contendo 9 mL de solução isotônica pH 7,4 (NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, EDTA 0,1 mM) e centrifugado a 600 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado. Esse processo de lavagem foi repetido mais duas vezes. As hemácias lavadas foram armazenadas a 4°C por no máximo 3 dias.

3.17. Extração da membrana dos eritrócitos

As membranas eritrocitárias foram extraídas segundo protocolo proposto por Mordacq & Ellington (1994) com modificações.

Porções de 3 mL de papa de hemácias de *B.taurus taurus* e de *B. taurus indicus* foram lavadas 3 vezes com 9 mL de tampão isotônico pH 7,4 (NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, EDTA 0,1 mM) e centrifugadas a 600 x g por 5 minutos a 4°C. Porções de 1 mL destas hemácias lavadas foram lisadas com 19 mL de tampão de hemólise pH 8,0 (Na₂HPO₄ 5 mM e EDTA 0,1 mM) e centrifugadas a 11000 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado com o auxílio de pipeta Pasteur plástica e um *pellet* branco opaco leve e difuso correspondente às membranas dos eritrócitos foi formado. Este procedimento foi repetido por mais dois ciclos de centrifugação a 11000 x g por 30 minutos a 4°C ou até que o sobrenadante ficasse transparente (sem hemoglobinas). A concentração de proteínas das amostras foi medida em espectrofotômetro (A_{280nm}) Nanodrop® ND-1000 *Spectrophotometer*. As amostras foram mantidas a 4°C por 5 dias ou -20°C.

3.18. ELISA

3.18.1. ELISA - placa sensibilizada com o peptídeo

Uma microplaca (*Immuno Plate MaxiSorp Surface* NUNC, USA) contendo 96 poços foi sensibilizada com 1 µg/poço de peptídeo sintético diluído em 100 µL/poço de tampão carbonato pH 9,6 (Na₂CO₃ 50 mM e NaHCO₃ 50 mM). A placa foi incubada por 18 horas a 4°C e depois por 1 hora a 37°C. Após os poços terem sido lavados três vezes com

Tampão PBS contendo tween 20 PBS/T (NaCl 136 mM, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 4,2 mM, 0,05% Tween 20) os mesmos foram bloqueados com 200 µL/poço de solução de bloqueio (PBS/T) contendo BSA 3% (Amresco, USA). A placa foi então incubada em estufa por 2 horas a 37°C. Seguiram-se três novas lavagens dos poços com PBS/T e estes foram incubados com 100 µL/poço de diluições seriadas do soro dos camundongos contendo anticorpos anti-peptídeo em tampão PBS/T acrescido de 1% de BSA. A placa foi incubada por 14 -18 horas a 4°C e depois por 1 hora em estufa a 37°C. Após três novas lavagens dos poços com PBS/T, seguiu-se nova incubação a 37°C de 1 ou 2 horas com 100 µL/poço de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase diluído em PBS/T contendo 1% de BSA na proporção de 1:1000. A seguir fizeram-se mais três lavagens com PBS/T e foi adicionado 100 µL/poço da solução de substrato da enzima 0,4 mg/mL de o-phenilediamina dihidroclorato (OPD) em tampão fosfato-citrato 0,05 M pH 5,0 acrescida de 1 µL/mL de H₂O₂. A reação foi interrompida com 50 µL/poço da solução H₂SO₄ 30% e a absorbância foi lida a 492 nm em leitor de microplaca *Biotrak II Plate Reader* (Amersham, USA).

3.18.2. ELISA – placa sensibilizada com membrana dos eritrócitos

Uma microplaca (*Immuno Plate MaxiSorp Surface* NUNC, USA) contendo 96 poços foi sensibilizada com membranas eritrocitárias (100 µL/poço) em diluição seriada de tampão carbonato pH 9,6 e incubada por 18 horas a 4°C e depois por 1 hora a 37°C. Após os poços terem sido lavados três vezes com Tampão PBS/T, os mesmos foram bloqueados com 200 µL/poço de solução de bloqueio (PBS/T) contendo BSA 3% (Amresco, USA). A placa foi então incubada em estufa por 2 horas a 37°C. Seguiram-se três novas lavagens dos poços com PBS/T e estes foram incubados com 100 µL/poço de soro anti-peptídeo (1:200) em tampão PBS/T contendo 1% de BSA. A placa foi incubada por 14 -18 horas a 4°C e depois por 1 hora em estufa a 37°C. Após três novas lavagens dos poços com PBS/T seguiu-se nova incubação a 37°C por 1 ou 2 horas com 100 µL/poço de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina diluído em PBS/T contendo 1% de BSA na proporção de 1:1000. A seguir, mais três lavagens com PBS/T foram feitas e adicionado 100 µL/poço da solução de substrato da enzima 1 mg/mL de p-nitrophenyl fosfato em diethanolamine 9,7% pH 9,8. A reação foi interrompida com NaOH 3 M (50 µL/poço) e a absorbância foi lida a 405 nm em leitor de microplaca Multiskan EX (Labsystems Genesis V.3.03).

O mesmo procedimento descrito no item anterior foi utilizado com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase.

3.18.3. ELISA Competitivo

Da mesma maneira como descrito anteriormente, microplacas foram sensibilizadas com membrana eritrocitária dos três animais *B. taurus taurus* e dos três animais *B. taurus indicus* (100 µL/poço) diluída em tampão carbonato 50 mM pH 9,6 a uma concentração de 100 µg/poço. Algumas placas também foram sensibilizadas com membranas extraídas do *pool* feito com o sangue dos animais *Bos taurus taurus* e dos *Bos taurus indicus*. Cada placa foi incubada por 18 horas a 4°C e depois por 1 hora a 37°C e então lavada três vezes da mesma maneira descrita no item anterior. Após a lavagem, cada placa foi bloqueada por 2 horas a 37°C com 200 µL/poço de tampão de bloqueio PBS/T contendo BSA 3%. Após três novas lavagens, adicionou-se 100 µL/poço de solução contendo anticorpo anti-peptídeo (1:50) e uma diluição seriada de peptídeo iniciando-se com 10 ou 5 µg/poço em PBS/T contendo BSA 1%. Cada placa foi incubada por 18 horas a 4°C e depois por 1 hora a 37°C. Três novas lavagens foram seguidas de uma incubação por 2 horas a 37°C com 100 µL/poço de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina diluído em PBS/T contendo 1% de BSA na proporção de 1:1000. Após três outras lavagens foi adicionado a cada poço 100 µL da solução de substrato da enzima 1 mg/mL de p-nitrophenyl fosfato em diethanolamine 9,7% pH 9,8. A reação foi interrompida com NaOH 3 M (50 µL/poço) e a absorbância foi lida a 405 nm em leitor de microplaca Multiskan EX (Labsystems Genesis V.3.03).

3.19. Western Blotting

O procedimento usado foi basicamente o descrito por Towbin *et al.* (1979). Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15%, os polipeptídeos contidos no gel foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose utilizando um aparato tipo sanduíche MiniTrans-Blot® *Electrophoretic Transfer Cell* (Bio Rad, USA) submerso em tampão de transferência (Tris-base 25 mM, glicina 126 mM e metanol 20%) e submetido a uma voltagem de 100V por 1 hora. Um marcador de peso molecular para proteínas *Prestained* (Fermentas, USA) foi utilizado no gel para a visualização da eficiência da transferência. A seguir, a membrana foi colocada em 20 mL de uma solução de bloqueio PBS/leite (PBS 1X acrescido de leite em pó desnatado 5%) por 30 minutos a 37°C sob agitação de 80 rpm. Após este período, a solução foi desprezada e a membrana incubada com 15 mL de solução contendo soro anti-peptídeo (1:100) diluído em PBS/leite 1% por 16 horas a 4°C e depois por 1 hora a 37°C sob agitação lenta (80 rpm). Após este período, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos com PBS/T a 37°C sob agitação lenta. Uma nova

incubação foi feita por 2 horas a 37°C sob agitação (80 rpm) com 15 mL de solução contendo soro anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:2500) em PBS/leite1% seguida de novas três lavagens como descrito anteriormente. As bandas foram então reveladas pela adição de 12 mg de 4-cloro 1-naphtol em 4 mL de metanol e 20 mL de PBS com 12 µl de H₂O₂ 30%. A reação foi interrompida pela lavagem de membrana em água destilada.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção do cDNA do gene Duffy de *Bos taurus taurus*

O clone correspondente ao cDNA do gene *Duffy* de *Bos taurus taurus* (BT021079) (Figura 1), foi adquirido do C.H.O.R.I. (*Children's Hospital Resources Oakland Research Institute- BACPAC Resources, USA*). O mesmo, identificado como 5BOV4705, contém o cDNA da sequência correspondente ao mRNA do gene *Duffy* de *Bos taurus taurus* clonado no vetor pCMVSPORT6 (Invitrogen, USA) (Figura 3).

```
AACTACCCCAGCCCATCTCTCTGCCCGCCCTGCA
CAGCATCATGGGGAACGTCTCTTACCCGGTGGCTGATGACAACCTCCACCAAGTTGGCCATTAAGCAGGACTTT
M G N C L Y P V A D Q N S T K L A I K E D F
TTGATTGACTTTCCGGAGGACTACTATCCAGACTATAATGAGACCGACGTGGAAGCAGCTGCACCCCTGCCAC
L I D F P E D Y Y P D Y N E T D V E A A A P C H
TCCTGCTCACTGCTCAACTACTCCTCACTGCCCTTCTTCATCCTTGTGACGATCCTGGGCATCCTGGCTAGT
S C S L L N Y S S L P F F I L V S I L G I L A S
GGGACCATCCTCTATGCGCTTCTCAGACCTTTGTTCCGCTGGCAGCTCTACCAGGACAGGTCTACCCCTGGTG
G T I L Y A L L R P L F R W Q L Y Q D R S T L V
CAACTGGCCGTGGGCGTGGCCCTCTTCAGCATCGTGGTGGCCATCCTGGCACGGGGCTCAGTGGGGCTCTC
Q L A V G S A L F S I V V P I L A R G L S G A L
ATCACCTCCCTGTGCCACCTGGCTCACTTGGTCCCTATGGCTCAGCCCTTGTCTAAGCTCTGCTAATAGGG
I T S L C H L A H L V A Y G S A F A Q A L L I G
TACCATGCCTGCCCTGGGCCCCAGCTGGGTGCAGGCCAAGTCCAGGCCCTCAGGCTGGGGGTCAGTGTGGGA
Y H A C L G P Q L G A G Q V P G L R L G V T V G
CTTGGGGAGTGGCTGCCCTCCTGTCACTGCCAGTGGTGGGAGTGACACTTCCCAAGGACTCTGCACC
L W G V A A L L S L P V V L G S D T S Q G L C T
GTGACCTTTAGCGGGAGTGGGAAACATTCGGGTACATACCGCTGCAGCCTGCTTTGCCATATTTGTCTTG
V T F S G E W E T L R Y I H A A A C F A I F V L
TTGCCACTGGGTTTGTGCGAACCAAGGGCTGAAGACGGTCTGGCCAGGGCACCTGCCCATGGCTTGAT
L P L G L L G T K G L K T V L G R A P C P W V D
GTCTGTGGGTCTGCTTCATTTTCTGGTGGCCTCAGGCGATGACTCTGGGATTGGAATCCCTAGTGAGGTCC
V L W V W F I F W W P Q G M T L G L D S L V R S
AAGGCCATAGTGGTGTCAACATGCTCCAGCCAGCAGGCCCTGGACATGCTGCTGGATGTGGCAGAACCCCTG
K A I V V S T C P A Q Q A L D M L L D V A E A L
GCAATATTGCACTGGTGGCTACACCCCTGCTCCTTGCCTGGGTCTGCTACCAAGGCCACTCACACCTCCCCA
A I L H C V A T P L L L A W V C Y Q A T H T S P
CCCTCCCTGCCCTCTGCCCTACAACACAGACTTCTCATCTGGACACCCCTTGAGGCAAAATCCTAGCTCTCTGCC
P S L P L P T T Q T S H L D T L G G K S *
CACCTGTCAACCTGAATTAAAGTCTACGCTGTTTTTATTTT
```

Figura 1. Sequência total do cDNA do gene *Duffy* de *Bos taurus taurus* e sua proteína (Duffy) depositadas no GenBank sob número de acesso BT021079 (gi|59858522|gb|BT021079.1| *Bos taurus* Duffy blood group (FY), mRNA, complete cds). Em cinza: seqüências 5' e 3' UTR, respectivamente. Sublinhado: códons de início (nucleotídeo 47) e de término da transcrição (nucleotídeo 1037). Em vermelho: seqüência da proteína traduzida na ORF +1 pelo Servidor *BMC Search Launcher*.

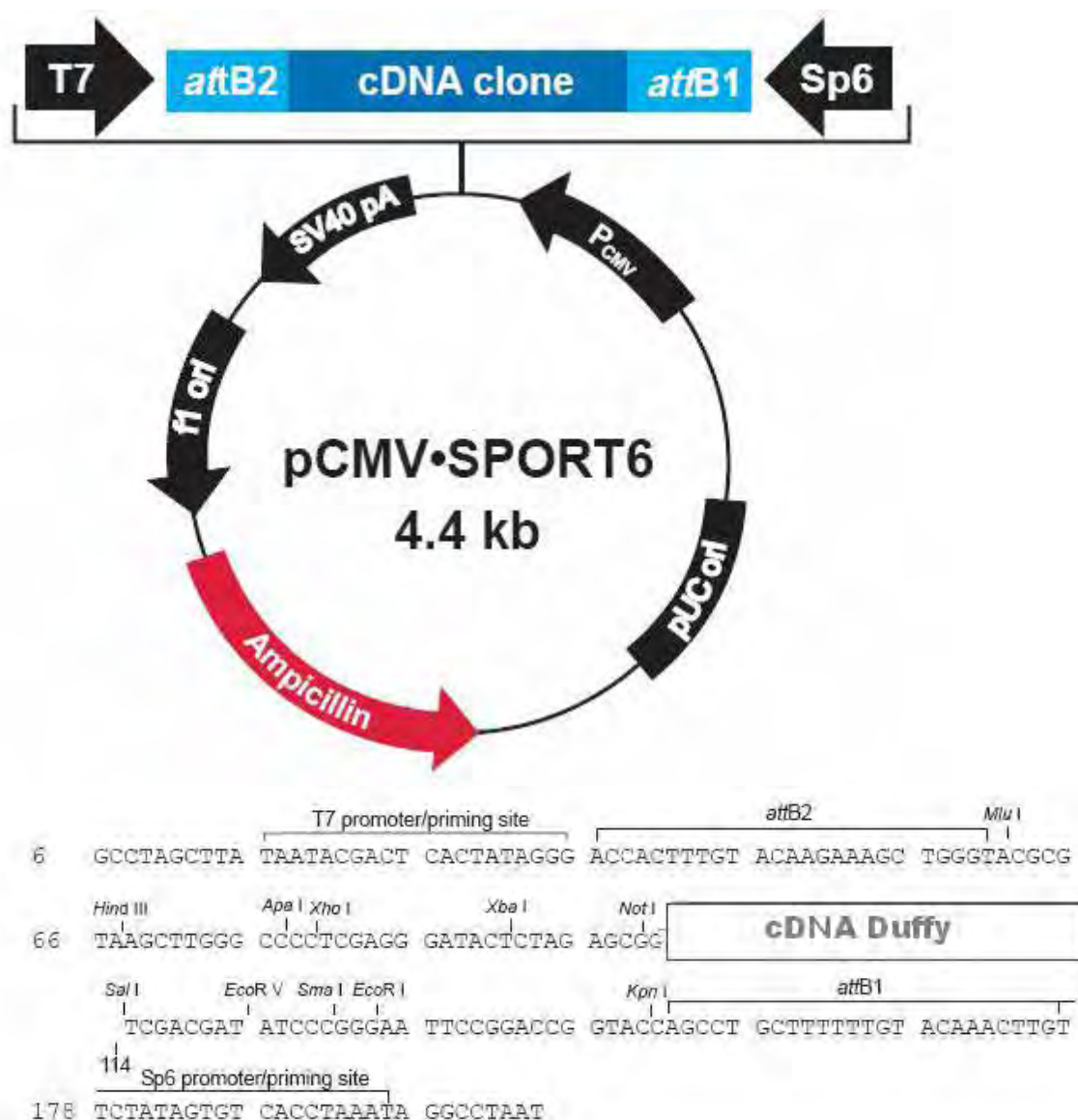


Figura 3. Mapa do Plasmídeo pCMVSPORT6/Duffy. Sequência do Sítio Múltiplo de Clonagem do vetor pCMVSPORT6 contendo a inserção do cDNA do gene *Duffy* (1089pb) de *Bos taurus taurus* entre os sítios *NotI* e *SalI* no clone 5BOV4705 adquirido do C.H.O.R.I-BACPAC Resources.

Para confirmar a presença do cDNA correspondente ao gene *Duffy* bovino no plasmídeo pCMVSPORT6 (Invitrogen, USA) foi feita uma digestão dupla com as enzimas de restrição *NotI* e *SalI*. O tamanho esperado do inserto era de 1089 pares de bases correspondente a parte codificante do gene (990 pb - nucleotídeo 47 a 1037) mais as seqüências 5'e 3'UTR. O produto de digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo onde um padrão de peso molecular foi utilizado para permitir o cálculo aproximado do tamanho do fragmento digerido, o qual tinha aproximadamente 1089 pares de bases como esperado (Figura 4).

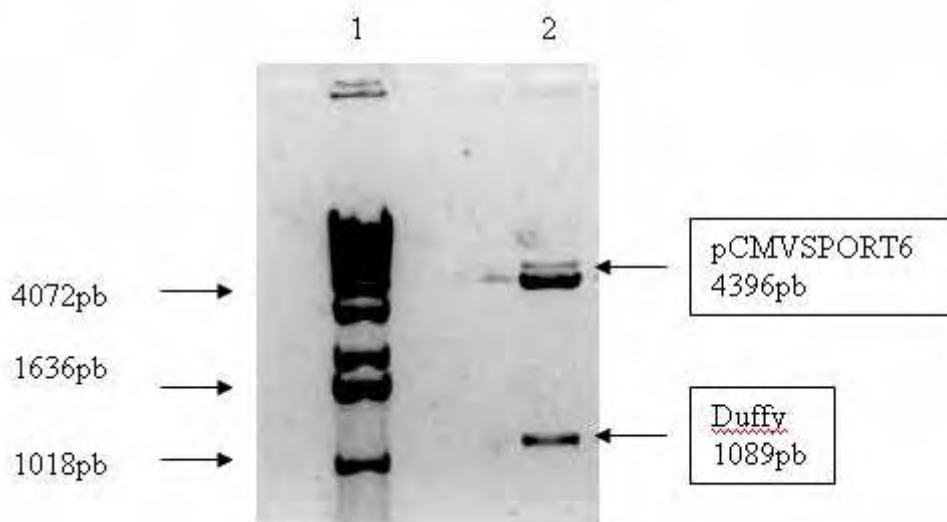


Figura 4. Análise da digestão do clone pCMVSPORT6/Duffy 5BOV4705 C.H.O.R.I-BACPAC Resources. O clone pCMVSPORT6/Duffy foi digerido com as enzimas de restrição *NotI* e *SalI*. 1: Marcador de peso molecular 1kb (Gibco,USA); 2: Produto da digestão do pCMVSPORT6 contendo a sequência cDNA-Duffy.

A fim de certificar-se de que o clone adquirido continha toda a sequência codificante do gene *Duffy* de *B. taurus taurus*, foi feito seqüenciamento do DNA plasmidial pCMVSPORT6/Duffy com o oligonucleotídeo *forward T7promoter* e *reverse (Sp6)* (Integrated DNA Technologies - IDT, USA). O resultado do seqüenciamento mostrou que a região codificante estava presente de forma completa no inserto (resultado não mostrado).

4.2. Amplificação do cDNA do gene *Duffy* via PCR

Foram desenhados conjuntos de oligonucleotídeos específicos para amplificação via PCR da região codificante do gene *Duffy* bovino (990 pb) e para a região codificante da porção N-terminal da proteína Duffy (168 pb) (Figura 5). Estes oligonucleotídeos receberam em suas extremidades 5' sítios das enzimas de restrição *XhoI* / *NdeI* e *EcoRI* / *XbaI* para garantir a clonagem dos insertos em fase de leitura correta nos Sítios Múltiplos de Clonagem dos vetores de expressão pET 28a(+) (Novagen,USA) e pMAL-c2E (New England Biolabs Inc., USA), respectivamente. Assim, os fragmentos FL e Nt correspondentes à proteína Duffy e a sua porção amino-terminal Duffy₍₁₋₅₇₎ a serem clonados em pEt28a(+), foram amplificados pelos oligonucleotídeos *forward* contendo sítio *NdeI* e *reverse* contendo sítio *XhoI*, e os fragmentos a serem clonados em pMAL-c2E foram amplificados pelos oligonucleotídeos *forward* contendo sítio *EcoRI* e *reverse* contendo sítio *XbaI*. O DNA

molde utilizado para amplificação dos fragmentos desejados foi o plasmídeo pCMVSPORT6 contendo cDNA do gene *Duffy* de *Bos taurus taurus*.

O tamanho dos produtos gerados foi confirmado em gel de agarose utilizando-se para comparação um marcador de massa molecular (Figura 6 A e B).

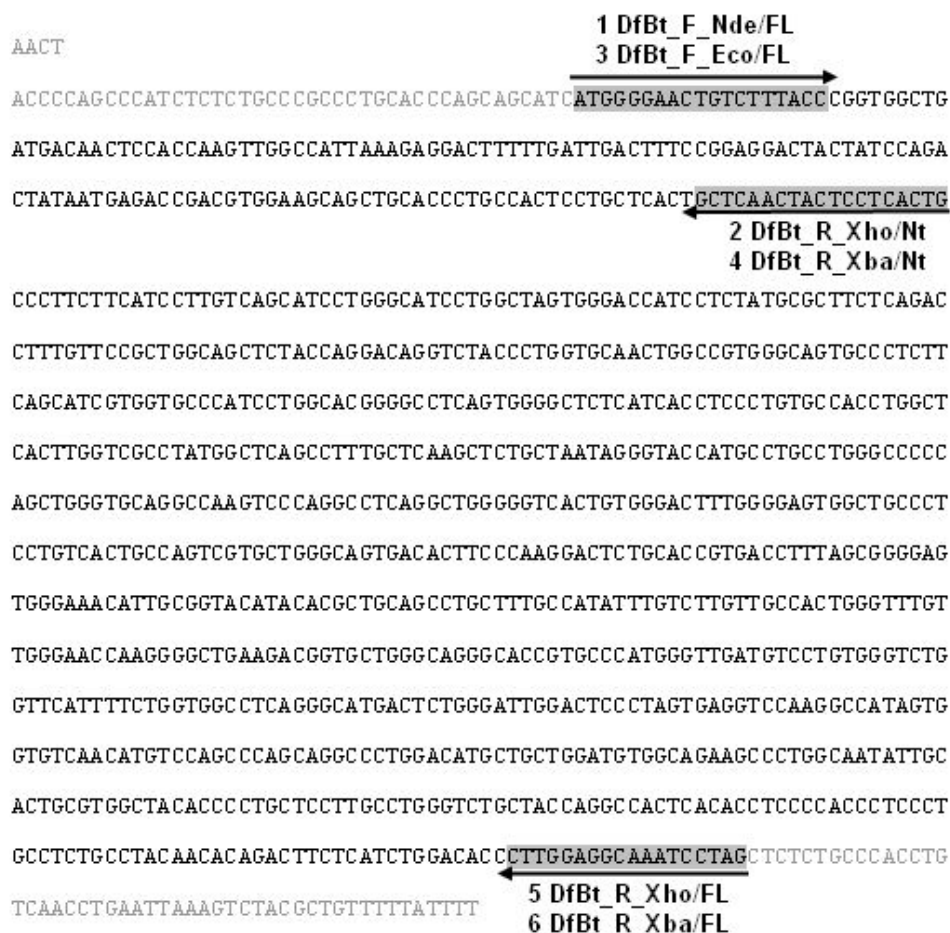


Figura 5. Representação da sequência de nucleotídeos do cDNA do gene *Duffy* de *Bos taurus taurus* (BT021079.1). Sequência em cinza claro: Regiões 5' e 3' UTR do RNA mensageiro. Região amplificada pelos oligonucleotídeos 1-2 e 3-4 (nucleotídeo 1-A do ATG inicial ao nucleotídeo 168-G): sequência codificante da porção N-terminal da proteína Duffy₍₁₋₅₇₎ de *Bos taurus taurus*. Região amplificada pelos oligonucleotídeos 1-5 e 3-6 (nucleotídeo 1-A ao 990-G): sequência codificante da proteína total Duffy de *Bos taurus taurus*. Realçado em cinza: local de anelamento dos oligonucleotídeos.

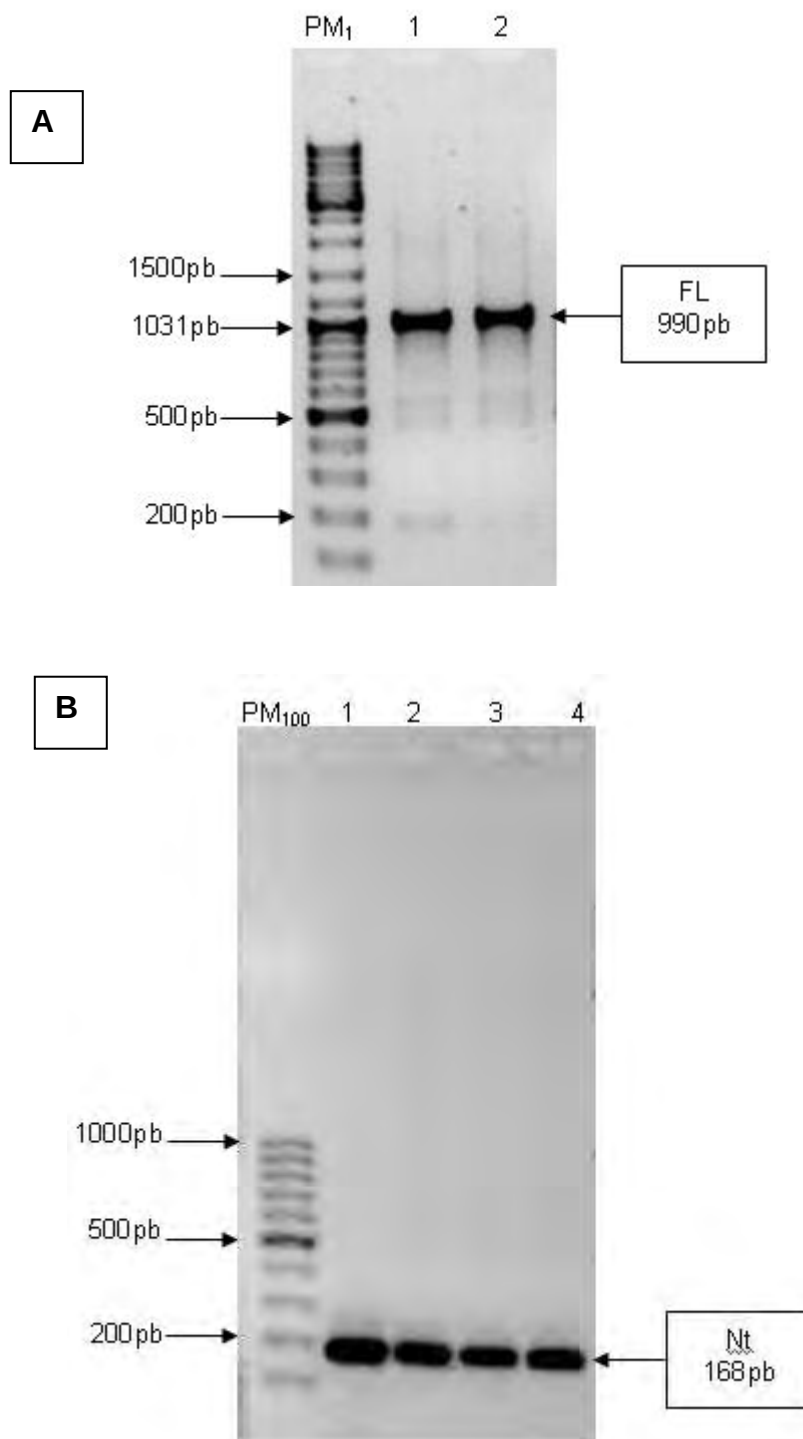


Figura 6. Análise da amplificação via PCR dos fragmentos FL (A) e Nt (B). Amplificação do pCMVSPORT6/*Duffy* pelos oligonucleotídeos DfBt_F_Nde/FL-DfBt_R_Xho/FL e DfBt_F_Eco/FL-DfBt_R_Xba/FL (A) e DfBt_F_Nde/FL-DfBt_R_Xho/Nt e DfBt_F_Eco/FL-DfBt_R_Xba/Nt (B). **A.** 1 e 2: fragmentos FL (~990pb) **B.** 1 a 4 fragmentos Nt (~168pb). Pb: pares de bases, PM₁: Marcador de peso molecular 1Kb (*MassRuler DNA Ladder Mix ready-to-use*, Fermentas,USA), PM₁₀₀ Marcador de peso molecular 100pb (*GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus*, Fermentas,USA).

4.3. Clonagem e expressão da proteína Duffy de *Bos taurus taurus* e sua porção N-terminal Duffy₍₁₋₅₇₎

4.3.1. Vetor pET 28a(+)

4.3.1.1. Clonagem

Os produtos de PCR gerados pelo par de oligonucleotídeos DfBt_F_Nde/FL - DfBt_R_Xho/FL correspondem à amplificação do cDNA correspondente a sequência codificante do gene *Duffy* bovino e foram nomeados FL1. Os produtos gerados pelo conjunto DfBt_F_Nde/FL - DfBt_R_Xho/NT correspondem à porção codificadora da região N-terminal da proteína bovina (Duffy₍₁₋₅₇₎) e foram nomeados Nt1.

O vetor pET28a(+) de aproximadamente 5370pb foi submetido à digestão dupla pelas enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I e após purificação foi ligado aos produtos de PCR FL1 (990pb) e Nt1 (168pb) previamente digeridos com as mesmas enzimas e purificados. As ligações foram transformadas em *E. coli* DH5 α e, com a finalidade de avaliar a presença do fragmento de interesse, foram realizadas PCR de algumas colônias (Figura 7 A₁ e A₂). O DNA plasmidial das colônias positivas foram submetidas a uma digestão dupla com as mesmas enzimas de restrição utilizadas na clonagem (*Nde*I e *Xho*I). As análises foram feitas em gel de agarose (Figura 7 B₁ e B₂).

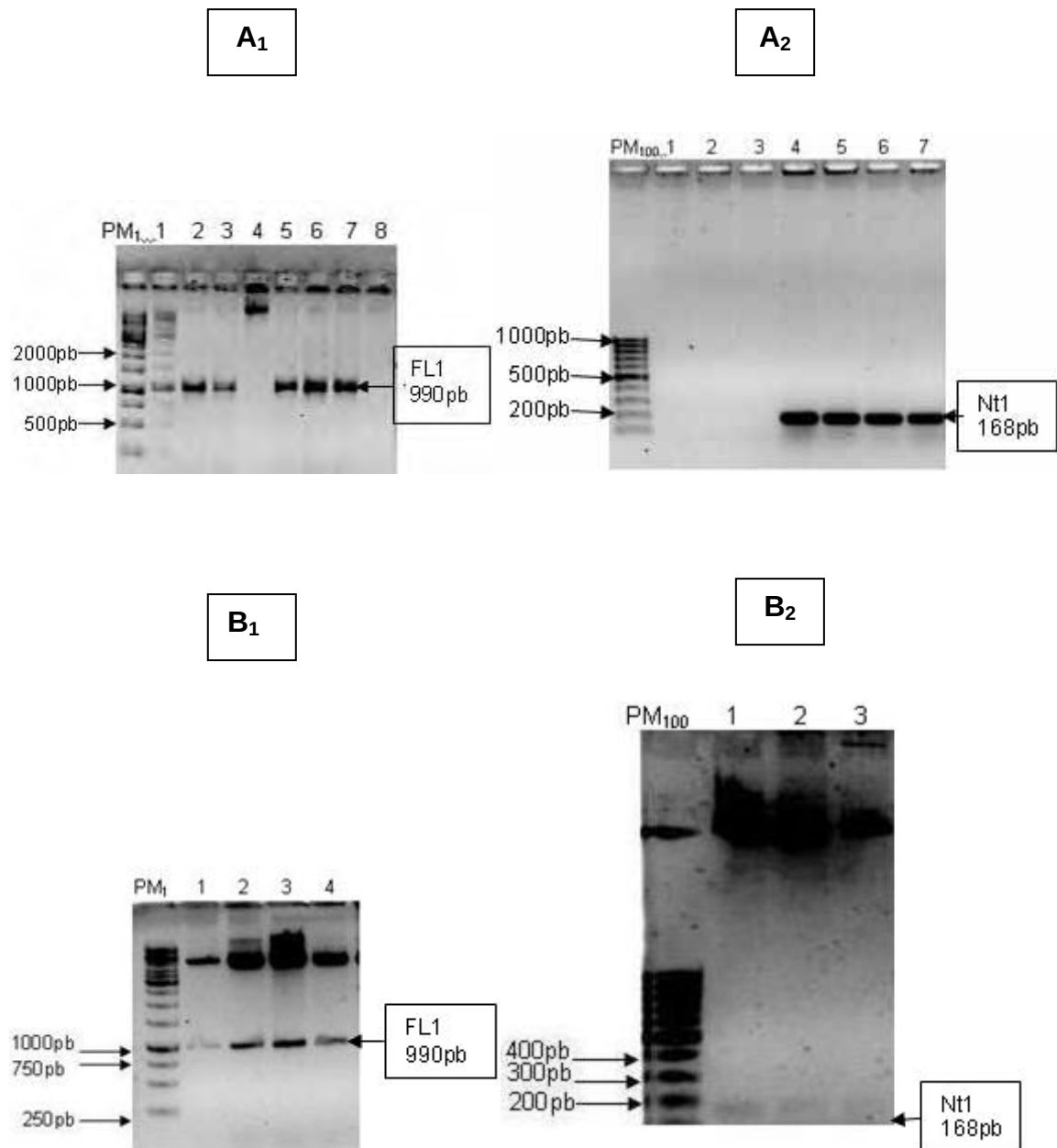
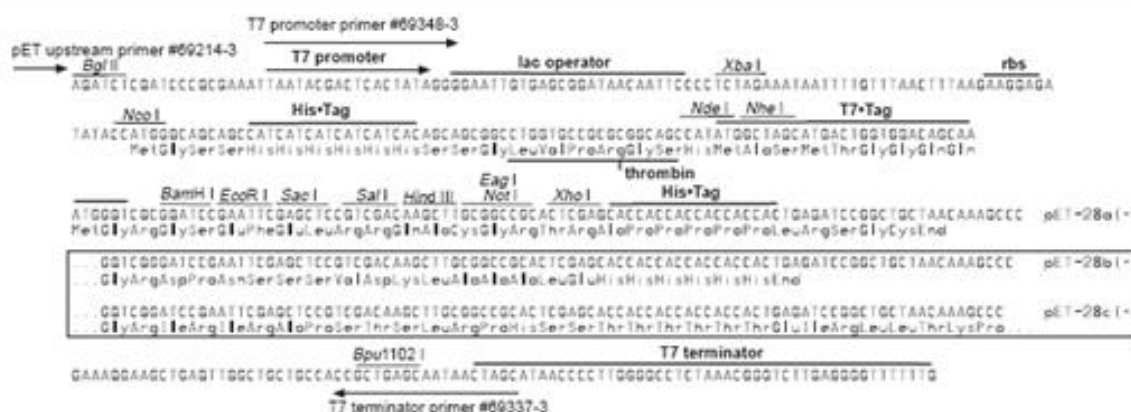


Figura 7. Análise em gel de agarose da clonagem do cDNA do gene *Duffy* de *B. taurus taurus* correspondente a proteína Duffy e sua porção N-terminal *Duffy*₍₁₋₅₇₎ em vetor de expressão pET28a(+). (A) Análise por PCR das colônias de *E.coli* transformadas pelos plasmídeos pET28a(+) recombinantes contendo inserto correspondente a proteína Duffy. (A₁) ou a sua região N-terminal (A₂). **A₁**: 2, 3, 5, 6 e 7: Colônias positivas contendo clones HisFL1; 8: Branco (controle negativo); 4: DNA Lambda. **A₂**: 1: Branco (controle negativo); 2 e 3: Colônias que não foram amplificadas; 4, 5, 6 e 7: Colônias positivas contendo clones HisNt1. (B) Análise dos clones HisFL1 (B₁) e HisNt1 (B₂) por digestão dupla com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. **B₁**: 1,2,3 e 4: Clones HisFL1 positivos. **B₂**: 1, 2 e 3: Clones HisNt1 positivos. PM₁₀₀: Marcador de peso molecular *GeneRuler* 100bp (Fermentas,USA) e PM₁: Marcador de peso molecular *GeneRuler* 1kb DNA Ladder (Fermentas, USA).

Os clones HisFL1 e HisNt1 considerados positivos por PCR das colônias e digestão enzimática, foram seqüenciados. O resultado do seqüenciamento revelou que embora os insertos HisFL1 e HisNt1 estivessem íntegros e inseridos na fase de leitura correta, o plasmídeo pET28a(+), no qual os fragmentos foram clonados, apresentava uma modificação entre os seus sítios *NcoI* e *NdeI* que quando comparada com seqüências depositadas no GenBank, revelou ser uma seqüência de *Xylella fastidiosa* (Figura 8 A e B) (Anexo 8.2). Estes clones foram descartados e novos fragmentos FL1 e Nt1 foram clonados em outro pET28a(+) (Figura 9).

A) Região de clonagem e expressão do pET28a(+)



B) Análise do seqüenciamento dos clones HisFL1 e HisNt1

pET28a(+)

B₁ rbs *NcoI* *NdeI*
 GAAGGAGATATACCATGGGCGAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTCCGCGCGGCGAGCCATATGGCTAGCATGACT

HisFL1 e HisNt1

B₂ rbs *NcoI* *NdeI*
 GAAGGAGATATACCATGGTGAACGAAATGCGAGATGACACGCGTCCCATATGGGGAAGTGTCTTTACCCGGTGGCTGATGACAACTCCA

→Duffy

Query 1 ATGGTGAAACGAAATGCGAGATGACACGCGTCCC 33

B₃ Sbjet 719251 ATGGTGAAACGAAATGCGAGATGACACGCGTCCC 719219

> gb|AE003849.1| Xylella fastidiosa 9a5c, complete genome
 Length=2679306

Features in this part of subject sequence:
 transcriptional regulator (ArsR family)
 conserved hypothetical protein

Score = 65.9 bits (33), Expect = 4e-09
 Identities = 33/33 (100%), Gaps = 0/33 (0%)

Figura 8. Representação da região de clonagem e expressão do pET28a(+) (A) e análise do seqüenciamento dos clones HisNt1 e HisFL1 em pET28a(+) (B). B₁. Seqüência da região íntegra do plasmídeo pET28a(+) contendo o sítio de reconhecimento ribossomal em negrito (rbs), os sítios das enzimas *NcoI* (CCATGG) e *NdeI* (CATATG) (em negrito e sublinhadas). B₂. Região destacada pela caixa: região não correspondente ao pET28a(+) e submetida à comparação no banco de dados no GenBank. B₃. Resultado da comparação da seqüência de nucleotídeos desconhecida entre os sítios das enzimas *NcoI* e *NdeI* do pET28a(+) com as seqüências de nucleotídeos depositadas no GenBank.

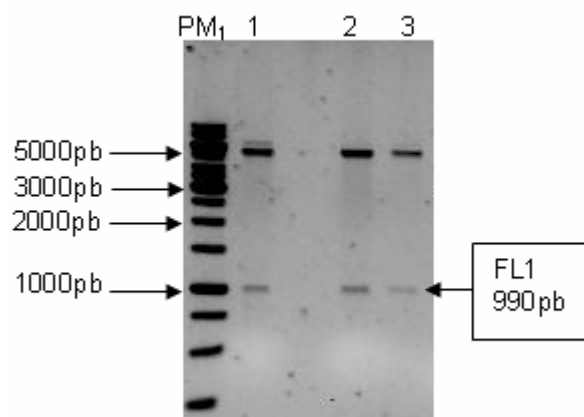


Figura 9. Análise da nova clonagem do cDNA do gene *Duffy* de *B.taurus taurus* no vetor de expressão pET28a(+). Análise em gel de agarose da digestão dupla dos clones HisFL1-1, 2 e 3 com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. PM₁: Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas); 1, 2 e 3: Clones HisFL1 positivos.

4.3.1.2. Expressão

Cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)-CodonPlus, BL21(DE3)-CodonPlus-RP, Rosetta(DE3), ArcticExpress™(DE3) e BL21SI transformadas com os plasmídeos contendo os insertos de interesse, foram induzidas com IPTG (1mM) ou NaCl (0,3M) conforme descrito no item 3.13. Amostras (induzidas e não induzidas) foram aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS (resultados não mostrados) para a observação de bandas de aproximadamente 37 kDa para a proteína Duffy (35,4 kDa + 1,82 kDa do *histag*) e de 10kDa para a porção N-terminal Duffy₁₋₅₇ (6,3 kDa +1,82 kDa do *histag* N-terminal e 1,83 kDa do *histag* C-terminal) (Tabela 2).

Tabela 2. Dados básicos das proteínas recombinantes HisFL1 e HisNt1. (pb): Pares de bases, AA: Número de aminoácidos, MW: Massa molecular da proteína e da partícula de fusão em kilo Daltons (kDa) preditas pelo servidor ProtParam. Obs. Na proteína recombinante HisNt1 as duas partículas de fusão de histidina (N-terminal 1,82kDa e C-terminal 1,83kDa) foram mantidas.

Construção	Plasmídeo	Inserto (pb)	AA	MW (kDa) Prot+part.fusão	MW (kDa) total
HisFL1	pET28a(+)	FL1 (990)	330	35,4 + 1,82	~ 37,2
HisNt1	pET28a(+)	Nt1 (168)	57	6,3 + 3,65	~ 9,95

As induções das proteínas recombinantes foram testadas em várias temperaturas, concentrações de IPTG e valores de absorbância sem sucesso (resultados não mostrados).

4.3.2. Vetor pMAL-c2E

4.3.2.1. Clonagem

Os produtos de PCR gerados pelo par de oligonucleotídeos DfBt_F_Eco/FL - DfBt_R-Xba/FL correspondem à amplificação da sequência total do cDNA do gene *Duffy* bovino codificadora da proteína Duffy de 330 aminoácidos e foram nomeados FL2. Os produtos gerados pelo conjunto DfBt_F_Eco/FL - DfBt_R-Xba/NT correspondem a porção codificadora da região N-terminal da proteína bovina Duffy₍₁₋₅₇₎ e foram nomeados Nt2. Após digestão dupla com as enzimas *Xba*I e *Eco*RI e purificação, o vetor pMALc-2E (~6600pb) foi ligado aos produtos de PCR FL2 (990pb) e Nt2 (168pb) também digeridos pelas mesmas enzimas e purificados. Os clones obtidos foram denominados MalFL2 e MalNt2. Os plasmídeos recombinantes contendo os insertos de interesse foram utilizados para transformar células de *E. coli* DH 5 α e algumas colônias resultantes foram testadas por PCR para confirmação de clonagem (Figura 10). Os plasmídeos recombinantes foram digeridos com as mesmas enzimas de restrição utilizadas na clonagem e análises em gel de agarose confirmaram o tamanho dos insertos desejados (resultados não mostrados).

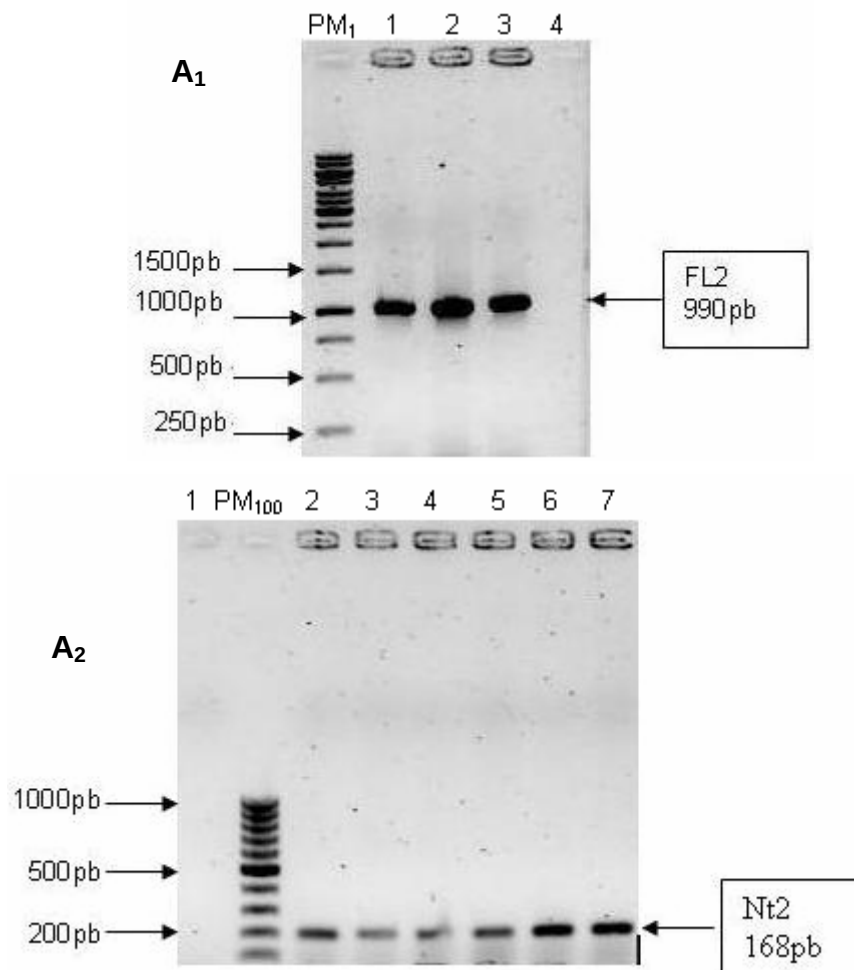


Figura 10. Análise em gel de agarose da clonagem do cDNA do gene *Duffy B. taurus taurus* por PCR das colônias de *E. coli* transformadas pelos plasmídeos pMAL-c2E recombinantes. A₁: 1, 2 e 3 Colônias positivas contendo clones MALFL2; 4: Branco (controle negativo). A₂: 1: Branco (controle negativo); 2 a 7: Colônias positivas contendo clones MALNt2. PM₁: Marcador de peso molecular 1kb (*GeneRuler 1kb DNA Ladder* Fermentas, USA) e PM₁₀₀: Marcador de peso molecular 100pb (*GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus*, Fermentas, USA).

4.3.2.2. Expressão

Para os clones obtidos em pMAL-c2E (MALFL2 e MALNt2), que é um plasmídeo dirigido pelo promotor *lac*, foram utilizadas as células DH5α e BL21SI. As bactérias transformadas com os plasmídeos contendo os insertos de interesse foram induzidas com IPTG (1mM) conforme descrito no item 3.13. Amostras (não induzidas e induzidas) foram aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS para a observação de bandas de aproximadamente 78,4 kDa para a proteína Duffy (35,4 kDa + 43 kDa da MBP) e 50,77 kDa para a porção N-terminal Duffy₍₁₋₅₇₎ (6,3 porção N-terminal + 43 kDa da MBP+ 7,7 kDa da porção C-terminal da região de expressão do plasmídeo até o códon de parada) (Tabela 3).

Tabela 3. Dados básicos das proteínas recombinantes MALFL2 e MALNt2. pb. Pares de bases, AA: Número de aminoácidos, MW: Massa molecular da proteína e da partícula de fusão em kilo Daltons (kDa) preditas pelo servidor ProtParam. Obs. Na proteína recombinante MalNt2 há um acréscimo de ~7 kDa no peso da proteína por conta da tradução da sequência C-terminal da região de expressão do plasmídeo até o códon de parada de transcrição.

Construção	Plasmídeo	Insero (pb)	AA	MW (kDa)	
				Prot+part.fusão	MW (kDa) total
MALFL2	pMAL-c2E	FL2 (990)	330	35,4 + 43	~ 78,4
MALNt2	pMAL-c2E	Nt2 (168)	57	6,3 + 50,7	~ 57,0

Novamente as induções das proteínas recombinantes foram testadas sem sucesso em várias temperaturas, concentrações de IPTG e valores de absorbância (resultados não mostrados).

4.4. Produção e caracterização do Soro anti-Duffy bovino

Devido ao fato do insucesso da expressão da proteína recombinante Duffy, um peptídeo sintético constando de 10 resíduos de aminoácidos (YNETDVEAAA) correspondentes a sequência compreendida entre o aminoácido 34 (tirosina) e o 43 (alanina) da porção N-terminal da proteína Duffy de *Bos taurus taurus* (Figura 11), foi desenhado e sintetizado conforme descrito no item 3.15.1. Este peptídeo (Duffy₃₄₋₄₃) foi diluído, quantificado e injetado (100 µg/animal) em fêmeas de camundongos da linhagem *High IV-A* (conforme descrito no item 3.15.2) para a obtenção do antisoro anti-Duffy bovino.

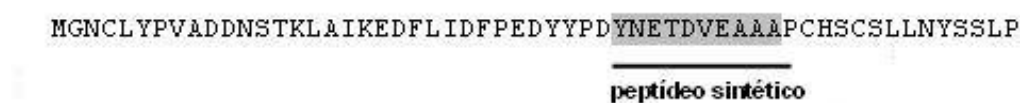


Figura 11. Representação da porção extracelular N-terminal da Proteína Duffy de *Bos taurus taurus*. Sequência que compreende 57 aminoácidos (Met 1- Pro 57). Região destacada em cinza: sequência correspondente ao peptídeo sintético desenhado Tyr 34 a Ala 43.

A análise da titulação do anticorpo obtido foi feita por ELISA em placas sensibilizadas com o peptídeo (Figura 12) onde foi possível observar que o anticorpo produzido reconhece o peptídeo e seu título está ao redor de 1:800 (diluição do soro que fornece leitura maior que 0,1).

Com o intuito de verificar a especificidade do anticorpo, foi realizado um experimento de *western-blotting* utilizando amostras das membranas de eritrócitos de *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Entretanto, não foi possível observar presença de bandas correspondentes a proteína Duffy (resultado não mostrado). Devido a este fato, foram realizados ensaios de ELISA competitivo (conforme descrito no item 3.18.3) a fim de averiguar a especificidade do anticorpo pela proteína Duffy nas diferentes subespécies. Para tanto, os experimentos foram feitos utilizando placas sensibilizadas com membranas de eritrócitos (100-200 µg/poço) das duas subespécies bovinas onde diluições seriadas de peptídeo competiram pelo anticorpo anti-Duffy bovino (1:100) com uma concentração fixa de proteínas de membrana. Dessa forma foi observado que o anticorpo reconhece o antígeno Duffy presente na membrana dos eritrócitos tanto de *Bos taurus taurus* como de *Bos taurus indicus* (Figura 13). Para quantificar a concentração da proteína Duffy presente na membrana dos eritrócitos das duas subespécies bovinas foram realizados testes de ELISA utilizando-se placas sensibilizadas com membranas eritrocitárias de *Bos taurus taurus* e de *Bos taurus indicus* (conforme descrito no item 3.18.2) onde foi observado que a quantidade de proteína Duffy da membrana dos eritrócitos é equivalente em *Bos taurus taurus* e em *Bos taurus indicus* (Figura 14).

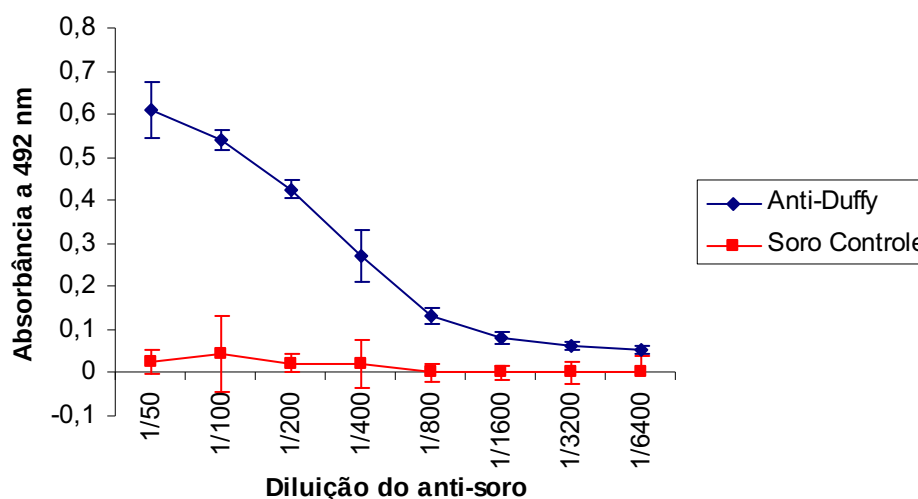


Figura 12. Titulação do anticorpo anti-Duffy bovino por ELISA. A placa foi sensibilizada com peptídeo sintético (1µg/poço). Concentrações do anticorpo primário (anti-Duffy) e soro controle foram diluídos serialmente (1/50 a 1/6400) e utilizadas para a titulação. Os valores de absorbância mostrados no gráfico correspondem à diferença entre o valor obtido e o branco. O símbolo [] indica o desvio padrão.

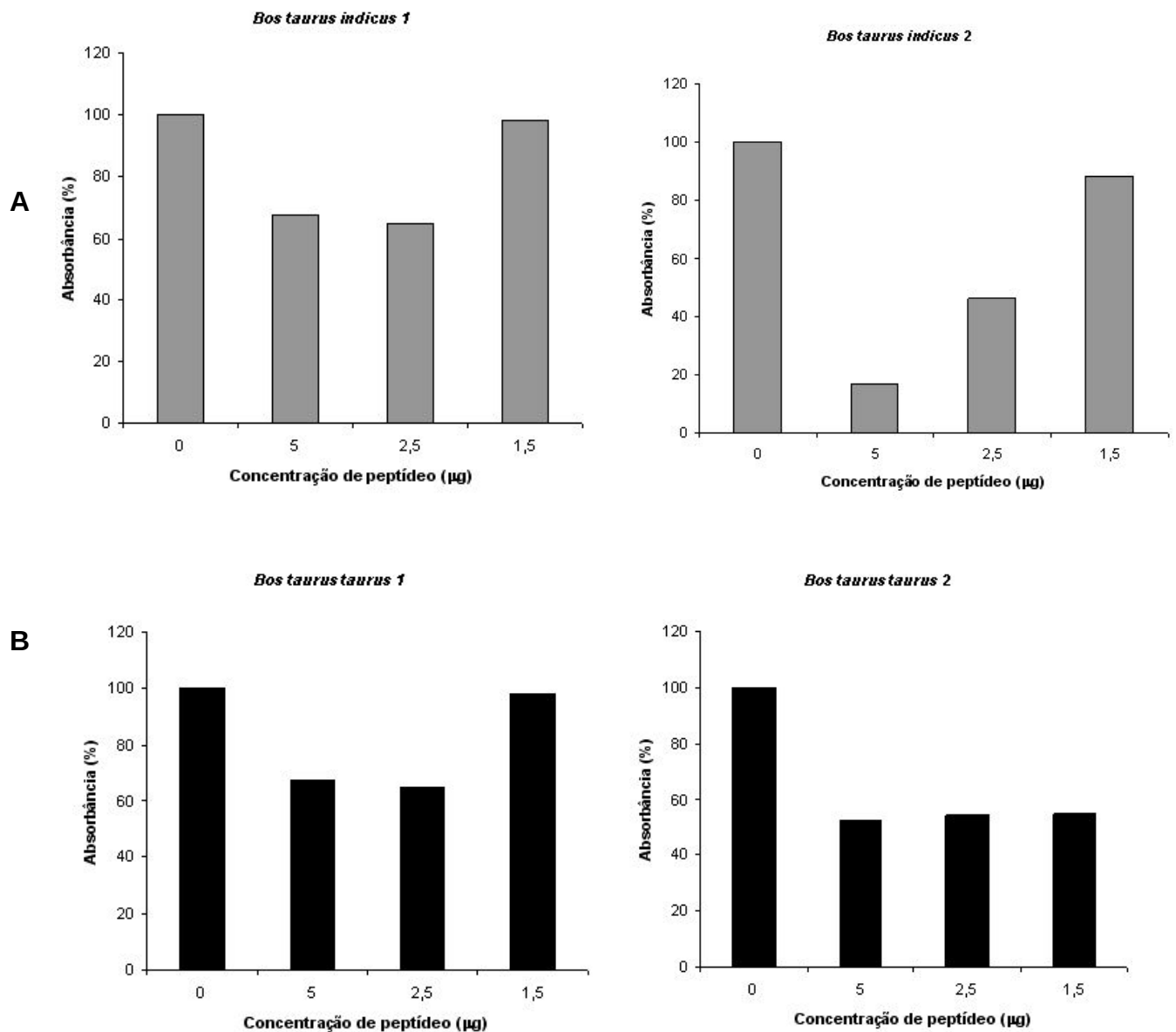


Figura 13. Detecção da proteína Duffy nas membranas dos eritrócitos de *B.taurus indicus* (A) e *B. taurus taurus* (B) por ELISA competitivo. Diferentes concentrações de peptídeo competiram pelo anticorpo primário anti-Duffy bovino com uma concentração fixa de membranas eritrocitárias (100-200 µg/poço) de animais das duas subespécies. Abcissas: Concentração de peptídeo (µg). Ordenadas: Valores relativos de absorbância expressos em porcentagem.

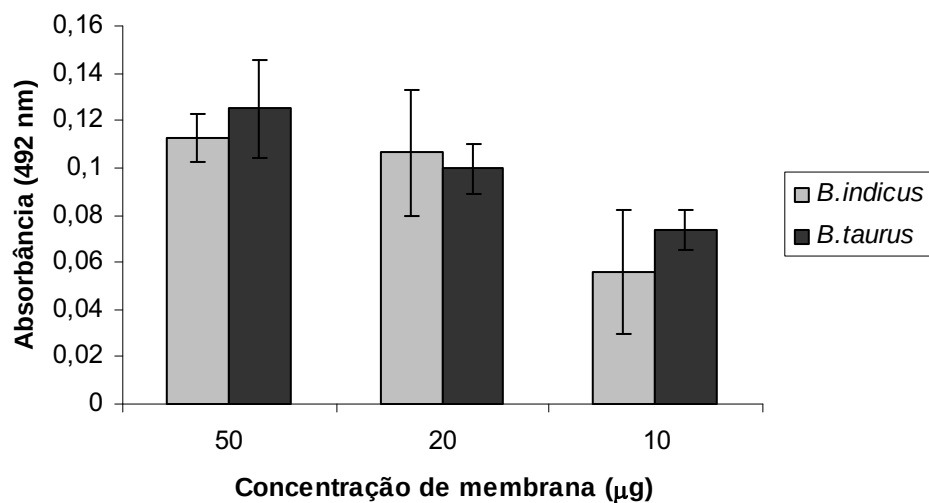


Figura 14. Quantificação da proteína Duffy bovina nas membranas eritrocitárias de *B.taurus taurus* e *B. taurus indicus* por ELISA. A placa foi sensibilizada com diferentes concentrações de membrana eritrocitária das duas subespécies bovinas (50, 20 e 10µg/poço). Para detecção da proteína Duffy utilizou-se concentração fixa do anticorpo primário anti-Duffy (1:100). Os valores de absorbância mostrados no gráfico correspondem à diferença entre o valor obtido com o soro anti-Duffy e o soro controle.

5. DISCUSSÃO

Os gêneros *Babesia* e *Plasmodium* são hemoparasitas pertencentes ao filo Apicomplexa e apresentam várias características comuns, entre as quais se destacam: o processo de invasão eritrocitária (DUBREMETZ, 1998; TAYLOR *et al.*, 1990; MENARD, 2001), o ciclo de reprodução assexuada intracelular do parasita, e as mudanças morfológicas que provocam na membrana das células parasitadas (YOKOYAMA *et al.*, 2006; HUTCHINGS *et al.*, 2007). Os sinais clínicos da babesiose bovina e da malária humana são muito similares, sendo inevitável a comparação (COOKE *et al.*, 2005). Assim, a severidade da doença causada no gado por *Babesia bovis* é comparada à malária humana causada por *Plasmodium falciparum* ocorrendo, inclusive seqüestro dos eritrócitos parasitados pela microcirculação (HUTCHINGS *et al.*, 2007); e a babesiose mais branda causada por *Babesia bigemina* (HOMMER *et al.*, 2000) é comparada à malária vivax (COOKE *et al.*, 2005). Para a invasão dos eritrócitos hospedeiros por estes parasitas é crucial que haja uma interação entre um receptor específico na membrana da célula e um ligante na superfície do parasita (LOBO, 2005; YOKOYAMA, 2006).

O antígeno Duffy é o único receptor para o *Plasmodium vivax* causador da malária vivax em humanos (MILLER *et al.*, 1976). A maioria dos indivíduos negros africanos e seus descendentes são resistentes a este parasita devido a uma mutação na região promotora do gene *Duffy* que impede a sua transcrição apenas nos eritrócitos (TOURNAMILLE *et al.*, 1995; IWAMOTO *et al.*, 1996b). Ao contrário do que ocorre com a malária, pouco se sabe a respeito das moléculas usadas pelas babésias para se fixar e invadir os eritrócitos do hospedeiro vertebrado (LOBO, 2005). Em relação à babesiose bovina, sabe-se que animais de raças taurinas são mais susceptíveis à infecção pelo parasita quando comparados aos animais de raças zebuínas (ZWART & BROCKLESBY, 1979; BOCK *et al.*, 1999a, 1999b).

Com o intuito de avaliar se esta maior resistência à babesiose dos animais zebuínos está relacionada ao fato do antígeno Duffy estar ausente ou expresso em menor quantidade nas hemácias destes animais, este trabalho objetivou a produção de anticorpos policlonais anti-Duffy bovino para detecção e quantificação deste antígeno em eritrócitos bovinos.

Com este propósito, resolveu-se expressar tanto a proteína Duffy total como apenas a sua região amino-terminal Duffy₍₁₋₅₇₎ em *Escherichia coli*, utilizando para isso, dois tipos diferentes de vetor de expressão: pET28a(+) e pMal-c2E.

O vetor pMAL-c2E possui o gene *MalE* de *E. coli* (que codifica para a MBP-*maltose-binding protein*, proteína ligadora de maltose) em fase de leitura com o sítio

múltiplo de clonagem, produzindo uma proteína de fusão com esta. A proteína MBP possibilita a recuperação da proteína de interesse por cromatografia de afinidade por amilose. O vetor contém também uma seqüência que codifica para cinco aminoácidos (4 Asp e 1 Lys) os quais constituem um sítio de clivagem para enteroquinase que permite a separação da proteína de interesse da MBP. A vantagem do uso de plasmídeos contendo MBP é o fato desta geralmente aumentar a solubilidade da proteína recombinante expressa (TOLIA & JOSHUA-TOR, 2006). O pMal-c2E é um vetor controlado pelo promotor *lac/tac* indutível por IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Neste promotor forte (híbrido do promotor *trp* e do promotor *lacUV5*) a transcrição do gene de interesse, se dá pela RNA polimerase da *E. coli* hospedeira e é regulada pelo repressor *lac*, que em resposta ao IPTG libera o sítio de reconhecimento da enzima no promotor, possibilitando assim a transcrição (AMANN *et al.*, 1988; LEBENSOHN, 2007). Desta forma, para as seqüências clonadas em pMAL-c2E (MALNT2 e MALFL2) utilizou-se a cepa de *E. coli* DH5 α (SCHMITT, *et al.* 1999) e *E. coli* BL21SI (DONAHUE & BEBEE, 1999), e as células foram induzidas com IPTG.

O vetor pET28a(+) possui uma seqüência que codifica uma cauda para 6 histidinas (poli-histidina His6) nas porções N-terminal e C-terminal da proteína de interesse, a qual tem a propriedade de se ligar fortemente à resina de níquel em cromatografia de afinidade em metal imobilizado (IMAC -*Immobilized Metal Affinity Chromatography*), o que possibilita o isolamento das proteínas recombinantes dos extratos celulares (WOESTENENK, *et al.*, 2004). A cauda de histidina (His6) é a proteína de fusão mais utilizada nos sistemas de expressão heterólogo por trazer vantagens como: ser compatível com todos os sistemas de expressão utilizados atualmente; poder ser produzida com sucesso em organismos procariotos e eucariotos; não afetar, na maioria dos casos o *folding* nem comprometer significativamente a função biológica da proteína; não ser muito imunogênica e assim não interferir com a produção de anticorpos em animais modelos; e, por ser de pequeno tamanho, comumente elimina a necessidade de remoção proteolítica (GABERC-POREKAR & MENARD, 2001).

O controle da transcrição do gene clonado em plasmídeo pET28a(+) é feito pelo promotor T7*lac* (DUBENDORFF *et al.*, 1991; STUDIER *et al.*, 1990), assim nomeado por trazer na porção 5' do seu sítio múltiplo de clonagem, uma seqüência gênica que é reconhecida pela RNA polimerase do fago T7 e, na porção 3' desta (*downstream*), a seqüência do operador *lac* o qual se encontra reprimido pelo repressor *lac*. (Anexo 8.3) (Novagen, 2005).

Para a expressão dos clones em pET28a(+) foram utilizadas cepas de *E. coli* da série BL21, as quais são deficientes nas proteases lon e OmpT, o que impede que a

proteína recombinante expressa seja degradada (SORENSEN & MORTENSEN, 2005). As células da série BL21 (DE3) carregam em seu genoma o lisogene lambda DE3 que codifica para a RNA polimerase do fago T7, sob o controle do promotor *lacUV5* o qual é regulado pelo repressor *lac* (NOVAGEN, 2005; TOLIA & JOSHUA-TOR, 2006). Este gene *lac* operador está localizado na posição 5' (*upstream*) do gene da T7RNA polimerase no cromossomo bacteriano, de modo que, ao se adicionar o agente indutor IPTG, a proteína repressora se solta do operador *lac* (na bactéria e no plasmídeo) permitindo que a RNA polimerase da célula hospedeira transcreva o gene da T7RNA polimerase. A maquinaria da célula hospedeira traduzirá este transcrito dando origem a enzima T7RNA polimerase que irá se ligar ao promotor T7 do vetor e iniciará a transcrição do gene clonado no sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo (Anexo 8.3). Foram também utilizadas cepas de BL21(DE3) pLysS, as quais possuem um plasmídeo contendo a sequência do gene que codifica a enzima lisozima do fago T7 que é inibidora da T7RNA polimerase, suprimindo assim a expressão basal desta enzima antes da indução, promovendo, desta maneira, um controle mais rigoroso da transcrição do gene de interesse (NOVAGEN, 2005, SORENSEN & MORTENSEN, 2005) (Anexo 8.4).

A cepa de *E.coli* BL21SI induzida com NaCl também foi utilizada para expressão dos clones HisFL1. Esta cepa contém em seu genoma um gene da T7RNA polimerase sob o controle de um promotor *proU* indutível por sal, assim altas osmolaridades, como por exemplo 0,3M de NaCl, induzem a expressão da T7RNA polimerase pelo promotor *proU*. A enzima sintetizada irá se ligar ao promotor T7 do plasmídeo pET28a(+) e transcrever o gene de interesse. Esta cepa se presta para indução de proteínas recombinantes clonadas tanto em vetores dirigidos pelo promotor T7, como é o caso do pET utilizando-se NaCl como agente indutor, como para vetores dirigidos pelo promotor *lac/tac* como o pMAL, induzindo com IPTG (DONAHUE & BEBEE, 1999).

Além destas também foram utilizadas BL21(DE3)CodonPlus, CodonPlus-RP, Rosetta(DE3) e ArcticExpress (DE3). A Rosetta(DE3) e BL21(DE3)CodonPlus, possuem cópias extras dos genes de tRNA que são raros em *E. coli*, mas freqüentemente utilizados em outros organismos. O subtipo RP é recomendado para genes ricos em GC, como é o caso do gene que codifica para a proteína Duffy bovina que tem 31,02% de C e 27,29% de G, pois esta contém cópias extras do tRNA *argU* e *proL*, referente aos códons AGG/AGA para arginina e CCC para prolina, ambos presentes na sequência *Duffy* bovina. A cepa ArcticExpress possui um plasmídeo extra que carrega os genes Cpn10 e Cpn60 das chaperoninas de *Oleispira antarctica*, os quais são expressos constitutivamente e tem atividade de *re-folding* mesmo em baixas temperaturas. A utilização de cepas capazes de co-expressar chaperoninas é uma

estratégia adotada para prevenir a formação de corpos de inclusão (SORENSEN & MORTENSEN, 2005).

O resultado do seqüenciamento dos clones HisFL1 e HisNt1 obtidos em pET28a(+) revelou que estes vetores apresentavam uma seqüência própria de *Xylella fastidiosa* (Figura 8 A e B), na posição 5' ao sítio *NdeI* do vetor, onde estavam clonadas as seqüências de cDNA codificantes da proteína Duffy e Duffy₍₁₋₅₇₎ bovinas (Anexo 8.2). Esta modificação não foi detectada pelas análises de digestão enzimática em gel de agarose, uma vez que as bandas geradas não diferiram daquelas de tamanho esperado. Isto ocorreu em função da presença de um sítio *NdeI* dentro da seqüência de *Xylella fastidiosa*, e o sítio *XhoI* do plasmídeo estar intacto, de modo que foi possível clonar os fragmentos desejados entre estes dois sítios. Estes clones foram descartados e novos fragmentos FL1 e Nt1 foram clonados em outro pET28a(+). Entretanto não foram obtidos clones positivos (HisNt1) para a inserção do cDNA correspondente a seqüência da proteína Duffy₍₁₋₅₇₎, e os clones HisFL1 provenientes da inserção do cDNA correspondente a seqüência da proteína Duffy foram conferidos por seqüenciamento e estavam íntegros.

Para a obtenção da expressão das proteínas Duffy e Duffy₍₁₋₅₇₎, foram testados vários protocolos de expressão que variaram as temperaturas de cultivo (13; 30 e 37°C), o tempo de cultivo após a indução (2,5; 3 e 24h), adição do agente indutor em vários valores de absorbância da cultura (A_{600} 0,5; 0,6; 0,8 e 1,0nm) e a concentração de IPTG (0,4; 0,7 e 1,0mM), além de utilização de várias cepas de bactéria hospedeira *E. coli*. No entanto não foi observada expressão alguma tanto dos clones obtidos em pET como em pMAL.

De acordo com Shaw & Miroux (2003) a expressão de proteínas de membrana em sistema heterólogo é difícil e frequentemente a proteína expressa é tóxica para a célula, o que diminui o crescimento da célula hospedeira e limita a produção da proteína recombinante.

Dado os problemas encontrados na expressão da proteína Duffy bovina, foi decidido utilizar um peptídeo sintético para a produção do anticorpo policlonal anti-Duffy bovino. O desenho foi feito com base no modelo 2D da proteína (GenBank: AAX09096.1) construído pelo servidor SOSUI (Anexo 8.5). A região da proteína foi selecionada, baseando-se em alguns critérios que permitissem a solubilidade e a estabilidade do peptídeo, assim foram escolhidas regiões mais solúveis com predomínio de aminoácidos hidrofílicos e/ou com carga e, para garantir a estabilidade era interessante a ausência de cisteínas e prolínas (a fim de evitar reações como pontes dissulfeto e alterações estruturais provocadas por prolínas). Com base nesses critérios e no modelo construído, foi selecionada dentro da região extracelular N-terminal a

seqüência de 10 resíduos de aminoácidos (YNETDVEAAA), correspondentes a região da tirosina 34 até a alanina 43 da proteína Duffy de *Bos taurus taurus*. É nessa região (aminoácidos 37 a 47) que está localizado o epítopo Fya/b em humanos (WASNOWSKA, *et al.*, 2004).

Este peptídeo foi injetado em fêmeas de camundongos e a análise da titulação do anticorpo policlonal anti-Duffy bovino foi feita por ELISA e revelou que o título do anticorpo produzido está ao redor de 1:800.

Com o objetivo de verificar a especificidade deste anticorpo e sua capacidade de reconhecer a proteína Duffy, um ensaio de *Western blotting* foi realizado utilizando membranas de eritrócitos bovinos como amostra. Entretanto não foi possível a detecção da proteína Duffy por este método, fato que pode ter ocorrido devido a baixa concentração da proteína nestas amostras.

Em vista disto, para verificar a especificidade do anticorpo produzido foram feitos ensaios de ELISA competitivo onde diluições seriadas de peptídeo competiram pelo anticorpo anti-Duffy bovino (1:100) com uma concentração fixa de membrana que foi utilizada para a sensibilização das placas. Neste experimento, foram utilizadas membranas de animais das duas subespécies, obtidas separadamente e aquelas oriundas de um *pool* de membranas de *Bos taurus taurus* e um *pool* de *Bos taurus indicus*. Foi possível observar que ao se adicionar o peptídeo a absorbância era menor que aquela lida nos poços contendo só membrana (considerada 100%) e assim que a concentração de peptídeo diminuía, os valores de absorbância aumentavam, indicando a especificidade do anticorpo. O anticorpo reconheceu tanto a membrana dos eritrócitos de *Bos taurus taurus* como de *Bos taurus indicus*, sugerindo que o mesmo, por ser específico para o antígeno Duffy bovino, poderia ser utilizado para a detecção deste antígeno em eritrócitos destes animais. Este resultado é relevante uma vez que não é possível detectá-los por meio dos anticorpos anti-Fya e anti-Fyb humanos, uma vez que os bovinos diferem completamente dos humanos nesta região da proteína Duffy que corresponde aos aminoácidos 41 ao 46 (Anexo 8.1), justamente onde residem os epítomos Fya e Fyb (TOURNAMILLE, *et al.*, 2004).

Para quantificar a proteína Duffy nas membranas das hemácias das duas subespécies bovinas, foram feitos ensaios de ELISA em placas sensibilizadas com diluições seriadas de membranas eritrocitárias das duas subespécies e incubadas com anticorpo primário numa concentração fixa de 1:200. Foi observado que anticorpo reconhece a proteína Duffy presente na membrana dos eritrócitos tanto de *Bos taurus taurus* como de *Bos taurus indicus* e que a quantidade deste antígeno na membrana dos eritrócitos é equivalente nas duas subespécies, sugerindo que não há expressão diferencial deste antígeno na superfície das hemácias das duas subespécies.

Ao caracterizar a região 5' flanqueadora do gene *Duffy* bovino, Carvalho (2007) encontrou em sua região promotora frequências diferentes de haplótipos formados por quatro SNPs entre animais indianos e taurinos. Estes SNPs poderiam ser fonte de alterações nos sítios de interação do DNA com fatores de transcrição, o que poderia abolir ou diminuir a transcrição deste gene nas hemácias do animal portador da variação, a exemplo do que acontece em humanos, onde a transição (-33 T>C) é responsável por suprimir a expressão do antígeno Duffy apenas nos eritrócitos (TOURNAMILLE *et al.*, 1995; IWAMOTO *et al.*, 1996b). No entanto, ao realizar análises por PCR em tempo real, Carvalho (2007), observou que não havia expressão diferencial do gene *Duffy* entre os animais estudados, indicando que os SNPs encontrados não influenciaram no processo de transcrição.

Contudo, trabalhos têm demonstrado que o conteúdo de uma proteína na célula nem sempre é reflexo direto da abundância do seu RNA mensageiro específico (GYGI *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2002). Pela PCR em tempo real, Carvalho (2007), não pode analisar se havia diferença na expressão do antígeno Duffy devido ao polimorfismo de um SNP localizado na região 5'UTR do mRNA do gene *Duffy* em *Bos taurus indicus*. Este SNP poderia atuar como um fator de controle pós-transcricional, uma vez que é sabido que além da regulação transcricional, pode haver controles pós-transcricionais, mediados por elementos de ação cis localizados nas regiões 5'e 3'UTR do RNA mensageiro (MIGNONE *et al.*, 2002). Entretanto os resultados obtidos neste trabalho indicaram que o antígeno Duffy está presente em quantidades iguais na membrana das hemácias das duas subespécies.

A fim de avaliar se haviam alterações na sequência da proteína expressa, que pudessem explicar a maior resistência dos zebuínos à babesiose, os éxons e íntrons do gene *Duffy* de *B. taurus taurus* e *B. taurus indicus* depositadas no GenBank, foram alinhadas, e o resultado mostrou 99,6% de identidade. As alterações encontradas foram as mesmas encontradas por Marteline (2003): duas transversões (572 C>G e 647 T>G); uma inversão de dinucleotídeo (1030-1031 GA>AG) e uma transição (1343 A>G). A alteração 572 C>G localizada na região intrônica, não afeta a sequência da proteína. A alteração 647 T>G substitui na posição 22 o aminoácido fenilalanina, encontrado em *B.taurus taurus*, por leucina em *B. taurus indicus*. A inversão 1030-1031 GA>AG resulta na alteração 150 arginina (R) para glutamina (Q). A transição 1343 A>G é relatada como substituição silenciosa por Marteline (2003) que comparou a sequência de *Bos taurus indicus* (AY275716.1) por ele isolada, com a sequência de *B. taurus taurus* (AF109158). No entanto quando se utiliza para comparação sequências de *Bos taurus taurus* depositadas mais recentemente (como a do número de acesso BT021079.1), pode-se observar que tal SNP, modifica o aminoácido 328 de glicina (G) para serina (S).

Além disso também encontra-se glutamina (Q) para o aminoácido 150 em *Bos taurus taurus* (Anexo 8.6).

Em vista disto, a única alteração na seqüência da proteína exclusiva de *Bos taurus indicus* em relação às seqüências de proteína Duffy de *Bos taurus taurus* disponíveis no GenBank é a substituição da fenilalanina de *Bos taurus taurus* por leucina na posição 22. De acordo com o modelo 2D (Anexo 8.5) do antígeno Duffy bovino construído pelo servidor SOSUI, o aminoácido 22 está localizado na região N-terminal e, embora sua troca F>L ocorra entre dois aminoácidos apolares, a fenilalanina possui um anel aromático que pode influenciar na sua interação com outras proteínas, sendo que desta forma em *Bos taurus indicus* esta interação poderia estar alterada.

Segundo Kimchi-Sarfaty *et al.* (2007) a seqüência de aminoácidos de uma proteína geralmente determina a expressão, o *folding* e sua função. Mutações que alterem a estrutura primária, mesmo que sinônimas, podem afetar essas propriedades. Isto ocorre provavelmente porque é afetada a cinética de co-tradução e o tempo que a proteína leva para se inserir na membrana, podendo causar alterações na exposição de seus sítios ativos. Ao introduzirem SNPs sinônimos em uma proteína de membrana de mamífero que tem função de transporte, estes autores observaram mutações capazes de alterar a especificidade da proteína pelo substrato.

Em humanos, o sítio de reconhecimento no antígeno Duffy pela região II da proteína de ligação ao Duffy do *P. vivax* (PvDBP-RII) está localizado entre os aminoácidos alanina 8 e tirosina 32 (TOURNAMILLE *et al.*, 2005). Deste modo, se o antígeno Duffy for receptor para parasitas de babesiose bovina, é possível que o sítio de reconhecimento do parasita também esteja localizado na região N-terminal do antígeno Duffy bovino e alterações nesta região poderiam influenciar a ligação do parasita ao receptor.

Entretanto, diferentemente do *P. vivax* cujo único receptor é o antígeno Duffy, o *Plasmodium falciparum* possui múltiplas vias de invasão do eritrócito (MICHON *et al.*, 2002). Entre os receptores identificados estão a glicoforina A (SIM *et al.*, 1994), glicoforina B (DOLAN *et al.*, 1994) e glicoforina C (MAIER *et al.*, 2003) bem como receptores não conhecidos denominados X (DOLAN *et al.*, 1994), Y (RAYNER *et al.*, 2001), Z (DURAISHINGH *et al.*, 2003) e E (GILBERGER *et al.*, 2003). Além disso, algumas linhagens utilizam predominantemente ligantes que interagem com receptores que contêm ácido siálico e outras que se ligam a receptores independentemente de ácido siálico (DURAISHINGH *et al.*, 2003).

Embora estudos para as babésias sejam menos numerosos em relação aos plasmódios, alguns potenciais receptores já foram descritos para estes parasitas (YOKOYAMA *et al.*, 2006). Alguns trabalhos indicaram os resíduos de ácido siálico de

eritrócitos bovinos como possíveis receptores para parasitas da babesiose bovina (*B. bovis*, *B. divergens*, *B. bigemina*) no processo de invasão eritrocitária pelos merozoítas (KANIA *et al.*, 1995; ZINTL *et al.*, 2002a, GAFFAR *et al.*, 2003, LOBO, 2005). Adicionalmente, foi mostrado que *B. bovis* e *B. divergens* podem invadir não só eritrócitos bovinos, mas também eritrócitos humanos e de outros animais por mecanismos dependentes de ácido siálico (GAFFAR *et al.*, 2003, ZINTL *et al.*, 2002a, b), sendo que Lobo (2005) identificou as glicoforinas A e B dos eritrócitos humanos como sendo os prováveis receptores para *B. divergens*.

Além disso, proteínas sensíveis à tripsina ou α -quimiotripsina também são potenciais receptores para as babésias (YOKOYAMA *et al.*, 2006). Kania *et al.* (1995) verificaram que o pré-tratamento *in vitro* de eritrócitos bovinos com tripsina diminui a invasão dos eritrócitos por *B. bigemina*, enquanto que a α -quimiotripsina teve pouco efeito na redução da invasão. Por outro lado, a invasão dos eritrócitos por *B. divergens* não foi afetada pelo tratamento com tripsina, enquanto que o pré-tratamento com α -quimiotripsina levou a redução do crescimento do parasita (ZINTL *et al.*, 2002a). Na mesma linha, Gaffar *et al.* (2003) demonstraram os efeitos inibitórios da tripsina e α -quimiotripsina na invasão dos eritrócitos bovinos por *B. bovis*. Okamura *et al.* (2007) e Takabatake, *et al.* (2007) observaram que as babésias bovinas necessitam de uma proteína de membrana sensível a tripsina (sialoglicoproteína) para a alta eficiência de invasão dos eritrócitos. Porém estes últimos sugerem que não pode ser descartada a possibilidade de que estes parasitas utilizem vias alternativas, além das sialoglicoproteínas para a invasão das hemácias bovinas e sugerem que uma detalhada caracterização não só destas, mas também de outros motivos podem oferecer informações importantes para um melhor entendimento da desconhecida interação parasita-eritrócito.

Outras proteínas eritrocitárias diferencialmente expressas entre *B. taurus taurus* e *B. taurus indicus* e sensíveis a algum desses tratamentos enzimáticos, podem ser potenciais receptores dos parasitas da babesiose e, conseqüentemente, um dos possíveis fatores que explique a resistência diferencial a esta infecção entre as duas subespécies de animais, uma vez que os resultados deste trabalho, levam a crer que o antígeno Duffy está presente em quantidades iguais na membrana das hemácias das duas subespécies, fato este, que vem adicionar dados aos resultados de Carvalho (2007) que não observou diferenças nos níveis de transcritos do gene *Duffy* entre animais das duas subespécies.

Outra hipótese seria de que a característica de resistência à babesiose não estaria relacionada aos níveis de infecção pelo parasita e, talvez em como o bovino

responderia imunologicamente à ele. Em estudo realizado por Regitano *et al.* (2006), as taxas de infecção por *Babesia bigemina* em animais puros Nelore e cruzados de Aberdeen Angus X Nelore, Simental X Nelore e Canchim X Nelore não diferiram. Dessa forma, segundo os autores, a resistência dos animais zebuínos às babesioses não deveria ser interpretada como capacidade de se manterem livres do parasita ou com baixo nível de infecção.

Apesar de a amostragem ter sido pequena e um número maior de animais fosse desejável para a confirmação da inexistência de variações no padrão de expressão gênica do antígeno Duffy dentro e entre as subespécies, pode-se sugerir, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, que o antígeno Duffy bovino é expresso tanto em eritrócitos de *B. taurus taurus* como em *B. taurus indicus* em quantidades semelhantes, apesar do SNP da região 5'UTR do mRNA encontrado no gene *Duffy* de *Bos taurus indicus*. Contudo, as alterações da seqüência de aminoácidos existentes entre a proteína produzida por animais taurinos e zebuínos podem ser fatores que influenciam na interação com outras proteínas. Dessa forma, considerando-se a hipótese da interação do parasita da babesia com o antígeno Duffy, estudos que relacionem a mudança de aminoácidos na cadeia polipeptídica desta glicoproteína, sua topologia e característica de resistência à babesiose em populações de *B. taurus indicus* assim como em populações cruzadas de *B. taurus indicus* com *B. taurus taurus* podem auxiliar a elucidar os mecanismos que levam a esta diferença de resistência.

6. CONCLUSÃO

Um anticorpo policlonal específico anti-Duffy bovino foi produzido, e por meio deste foi possível detectar a presença do antígeno Duffy nos eritrócitos de bovinos, bem como quantificá-lo, através de ensaios de ELISA.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o antígeno Duffy é expresso na superfície das hemácias tanto de *Bos taurus taurus* como de *Bos taurus indicus*, e em quantidades semelhantes. Então é provável que a resistência maior dos zebuínos à babesiose não se deva à ausência de expressão, ou à presença em menor quantidade do antígeno Duffy na superfície de suas hemácias. Portanto, a princípio, este antígeno não se apresenta promissor, como fator de seleção em programas de melhoramento genético bovino para a característica de resistência à babesiose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Controle da Expressão Gênica In: **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 376-466.
- AMANN, E., OCHS, B., ABEL, K.J. Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. **Gene**, v.69, n.2 p.301-15, 1988.
- ANUÁRIO da Pecuária Brasileira (Anualpec). São Paulo: Instituto FNP, 2007. p.5-218.
- ASSOCIAÇÃO Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (Abiec) Disponível em:<<http://www.abiec.com.br>>. Acesso em: 20 nov. 2007.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; BERBER, R.C.A.; VALENTIM, R.; CARVALHO FILHO, A.F.; COSTA NETO, W.P. Follicular dynamics and pregnancy rate in embryo recipient (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) treated with “Ovsynch” protocol for fixed-time embryo transfer. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 40 (supl. 2), p.96-106, 2003.
- BEATTIE, K.M. The Duffy blood group system: distribution, serology and genetics. In: PIERCE, S. R., MacPHERSON, C. (Eds) **Blood group systems**; Duffy, Kidd and Lutheran. Arlington: American of Blood Banks, 1988. p.1-25.
- BOCK, R.E., DE VOS, A.J., KINGSTON, T.G., McLELLAN, D.J. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Aust. Vet. J.**, v.75, p.337-40, 1997.
- BOCK, R.E., KINGSTON, T.G., STANDFAST, N.F., DE VOS, A.J. Effect of cattle breed on innate resistance to inoculations of *Babesia bigemina*. **Aust. Vet. J.**, v.77, p.465-6, 1999a.
- BOCK, R.E., KINGSTON, T.G., DE VOS, A.J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Aust. Vet. J.**, v.77, p.461-4, 1999b.

- BOYLAND, I.P., MUFTI, G.J., HAMBLIN, T.J. Delayed hemolytic transfusion reaction caused by anti- Fy^b in a splenectomized patient (letter). **Transfusion**, v.2, p.402, 1982.
- BRADLEY, D.G., MACHUGH, D.E., CUNNINGHAM, P., LOFTUS, R.T. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.5131-5, 1996.
- BREVERN, A.G. DE, WONG, H., TOURNAMILLE, C., COLIN, Y., LE VAN KIM, C., ETCHEBEST, C. A structural model of a seven-transmembrane helix receptor: The Duffy antigen/receptor for chemokine (DARC). **Biochim. Biophys. Acta.(BBA)-General Subjects**, v.1724, n.3, p.288-306, 2005.
- CARVALHO, T.L. **Isolamento e Caracterização da Região 5' Flanqueadora do Gene Duffy em *Bos Indicus* e *Bos Taurus***. Botucatu, 2007. 81p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- CHAUDHURI, A., POLYAKOVA, J., ZBRZEZNA, V., WILLIAMS, K., GULATI, S., POGO, A.O. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the subunit of the Duffy blood group system and the receptor for *Plasmodium vivax* malarial parasite. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.10793-7, 1993.
- CHAUDHURI, A., ZBRZEZNA, V., POLYAKOVA, J., POGO, A.O., HESSELGESSER J., HORUK, R. Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.7835-8, 1994.
- CHAUDHURI, A., ZBRZEZNA, V., POLYAKOVA, J., POGO, A.O. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: Restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in non erythroid tissues in Duffy-negative individuals. **Blood**, v.85, p.615-21, 1995.
- CHAUDHURI, A., NIELSEN, S., ELKJAER, M.L., ZBRZEZNA, V., FANG F., POGO A.O. Detection of Duffy antigen in the plasma membranes and caveolae of vascular endothelial and epithelial cells of nonerythroid organs. **Blood**, v.89, p.701-2, 1997.

- CHEN, G., GHARIB, T.G., HUANG, C.C., TAYLOR, J.M., MISEK, D.E., KARDIA, S.L., GIORDANO, T.J., IANNETONI, M.D., ORRINGER, M.B., HANASHI, S.M., BEER, D.G. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. **Mol. Cell. Proteomics**, v.1, p.304-13, 2002.
- CHITNIS, C.E., CHAUDHURI, A., HORUK, R., POGO, A.O., MILLER, L.H. The domain on the Duffy blood group antigen for binding Plasmodium vivax and P. knowlesi malarial parasites to erythrocytes. **J. Exp. Med.**, v.184, p.1531-6, 1996.
- CHOWN, B., LEWIS, M., KAITA, H. The Duffy blood group system in caucasians: evidence for a new allele. **Am. J. Hum. Genet.**, v.17, p.384-9, 1965.
- CONFEDERAÇÃO da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA). Agropecuária Brasileira: balanço 2006, perspectivas 2007. Disponível em <<http://cna.org.br>>. Acesso em: 15 jan. 2007 e 20 out. 2007.
- COOKE, B.M., MOHANDAS, N., COWMAN, A.F., COPPEL, R.L. Cellular adhesive phenomena in apicomplexan parasites of red blood cells. **Vet. Parasitol.**, v.132, p.273-95, 2005.
- CUNNINGHAM, E.P. Livestock Production in the Mediterranean Area. In **Selected Issues in Livestock Industry Development**. Washington: EDI/World Bank, 1992. p. 1-12.
- CUTBUSH, M., MOLLISON, P.L., PARKIN, D.M. A new human blood group. **Nature**, v.165, p.188-9, 1950.
- CZERWINSKI, M., KERN, J., GRODECKA, M., PAPROCKA, M., KROP-WATOREK, A., WASNIEWSKA, K. Mutational analysis of the N-glycosylation sites of Duffy antigen/receptor for chemokines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.356, n.3, p.816-21, 2007.
- DALGLIESH, R.J. Babesiosis. In: WARREN, S.K. (Ed.) **Immunology and molecular biology of parasites infection**. Oxford: Blackwell, 1993. p.352-83
- DARBONNE, W.C., RICE, G.C., MOHLER, M.A., APPLE, T., HÉBERT, C.A., VALENTE, A.J., BAKER J.B. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. **J. Clin. Invest.**, v.88, p.1362-9, 1991.

- DEL LAMA, S.N. **Caracterização genética das raças zebuínas criadas no Brasil através de polimorfismos protéicos e grupos sanguíneos.** Ribeirão Preto, 1991. 207p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- DOLAN, S.A., PROCTOR, J.L., ALLING, D.W., OKUBO, Y, WELLEMS, T.E., Glycophorin B as an EBA-175 independent *Plasmodium falciparum* receptor of human erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.64, p.55-63, 1994.
- DONAHUE JR., R.A. & BEBEE, R.L. BL21-SI Competent cells for protein expression in *E. coli* . **Focus**, v.21, n.2, p.49-51, 1999.
- DONAHUE, R.P., BIAS, W.B., REWICK, J.K., McKUSICK, V.A. Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.61, p.949-55, 1968.
- DUBENDORFF, J.W., STUDIER, F.W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. **J. Mol. Biol.** v.219, n.1, p.45-59, 1991.
- DUBREMETZ, J.F. Host invasion by *Toxoplasma gondii*. **Trends Microbiol.**, v.6, p.27-30, 1998.
- DURASINGH, M.T., MAIER, A.G., TRIGLIA, T., COWMAN, A.F. Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilising sialic acid-dependent and independent pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, p.4796-801, 2003.
- EPSTEIN, H. **The origin of the domestic animals of Africa.** 1v. New York: Africana Publishing Cooperation, 1971. 537p.
- EPSTEIN H., MASON, I.L. Cattle. In: MASON, I.L. (Ed). **Evolution of domesticated animals.** London: Longman, 1984. p.6-27.

- FERREIRA, J.J.; BRONDANI, I.V.; LEITE, D.T.; RESTLE, J.; ALVES FILHO, D.C.; MISSIO, R.L.; HECK, I.; SEGABINAZZI, L.R. Característica da carcaça de tourinhos charolês e mestiços charolês X nelore terminados em confinamento **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.191-6, 2006.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPALIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FRIES, R., RUVINSKY, A. **The genetics of cattle**. Wallingford: CABI Publising, 1999. 710p.
- GABERC-POREKAR, V. & MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **J. Biochem Biophys. Methods** v.49, p.335-60, 2001.
- GAFFAR, F.R., FRANSSSEN, F.F., DE VRIES, E. *Babesia bovis* merozoites invade human, ovine, equine, porcine, and caprine erythrocytes by a sialic acid-dependent mechanism followed by developmental arrest after a single round of cell fission. **Int. J. Parasitol.**, v.33, p.1595-603, 2003.
- GARCIA, J. F. **Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) de embriões bovinos**. São Paulo, 1995. 76p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- GILBERGER, T.W., THOMPSON, J.K., TRIGLIA, T., GOOD, R.T., DURASINGH, M.T., COWMAN, A.F. A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.14480-6, 2003.
- GIRARD, J.P., BAEKKEVOLD E.S., YAMANAKA, T., HARALDSEN G., BRANDTZAEG, P., AMALRIC, F. Heterogeneity of endothelial cells: the specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. **Am. J. Pathol.**, v.155, p.2043-55, 1999.
- GOMES, A. Carrapato-De-Boi:Prejuízos e Controle. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000. (Circular técnica n.42)

- GONÇALVES, P.M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciênc. Rural**, v.30, p.187-94, 2000.
- GRIFFITHS, A.J.F., WESLLER, S.R., LEWONTIN, R.C., GELBART, W.M., SUZUKI, D.T. MILLER, J.H., Mutação, reparo e combinação. In: **Introdução à Genética**. 8 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.432-60.
- GUIMARÃES, P.E.M., COSTA, M.C.R. SNPs: Sutis diferenças de um código. **Biotechnolog. Ciênc. Desenvolv.**, n.26, 2002.
- GYGI, S.P., ROCHON, Y., FRANZA, B.R., AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol. Cel. Biol.**, v.19, p.1720-30, 1999.
- HADLEY, T.J., DAVID, P.H., MCGINNISS, M.H., MILLER, L.H. Identification of an erythrocyte component carrying the Duffy blood group Fya antigen. **Science**, v.223, p.597–9, 1984.
- HADLEY, T.J., LU, Z.H., WASNIOWSKA, K., MARTIN, A.W., PEIPER, S.C., HESSELGESSER, J., HORUK, R. Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen. **J. Clin. Invest.**, v.94, p.985-91, 1994.
- HADLEY, T.J., PEIPER, S.C. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. **Blood**, v.89, p. 3077-91, 1997.
- HARTL, D.L.; JONES, E.W. Mutation, DNA Repair, and Recombination. In: **Genetics: Principles and Analysis**. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1998. p.555-97.
- HENDERSON, C.R. Use of an average numerator relationship matrix for multiple sires joining. **J. Anim. Sci.**, v. 66, p.1614-21, 1988.
- HENKES, L. E.; SILVA JR., W. A.;MORAES, J.C.F.; WEIMER, T.A. Mitochondrial control region genetic diversity and maternal ancestry of a Brangus-Ibague cattle populations. **Genet. Mol. Biol.**, v.28, n.1, p.60-6, 2005.

- HOMMER, M.J.; DELFIN, I.A.; TELFORD III, S.R.; KRAUSE, P.J. & PERSING, D.H. Babesiosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.13, p.451-469, 2000.
- HORUK, R., MARTIN, A.W., WANG, Z., SCHWEITZER, L., GERASSIMIDES, A., GUO, H., LU, Z., HESSELGESSER, J., PEREZ, H.D., KIM, J., PARKER, J., HADLEY T.J., PEIPER S.C. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. **J. Immunol.**, v.158, p.2882-90, 1997.
- HUTCHINGS, C.L.; LI, A.; FERNANDEZ, K.M.; FLETCHER, T.; JACKSON, L.A.; MOLLOY, J.B.; JORGENSEN, W.K.; LIM, C.T.; COOK, B.M. New insights into the altered adhesive and mechanical properties of rede blood cells parasited by *Babesia bovis*. **Mol. Microb.**, v.65, n.4, p.1092-105, 2007.
- IBANEZ, O.M.; MOUTON, D.; OLIVEIRA, S.L.; RIBEIRO FILHO, O.G.; PIATTI, R.M.; SANTÁNNA, O.A.; MASSA, S.; BIOZZI, G. & SIQUEIRA, M. Polygenic control of quantitative antibody responsiveness: restrictions of the multispecific effect related to the selection antigen. **Immunogenetics**, v.28, n.1, p. 6-12, 1988.
- IKIN, E.W., MOURANT, A.E., PETTENKOFER, H.J., BLUMENTHAL, G. Discovery of the expected hemagglutinin, anti Fy^b. **Nature**, v.168, p.1077, 1951.
- IWAMOTO, S., LI, J., OMI, T., IKEMOTO, S., KAJII, E. Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium. **Blood**, v.87, p.378-85, 1996a.
- IWAMOTO, S., LI, J., SUGIMOTO, N., OKUDA, H., KAJII, E. Caraceterization of the Duffy gene promotor: evidence for tissue-specific abolishment of expression in Fy(a-b-) of black individuals. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.222, p.852-9, 1996b.
- KANIA, S.A., ALLRED, D.R., BARBET, A.F. *Babesia bigemina*: host factors affecting the invasion of erythrocytes. **Exp. Parasitol.**, v.80, p.76-84, 1995.
- KIEFFER, N.M., CARTWRIGTH, T.C. Sex chromosome polymorphism in domestic cattle. **J. Hered.**, v.59, p.34-6, 1968.

- KIMCHI-SARFATY, C., OH, J.M., KIM, I.W., SAUNA, Z.E., CALCAGNO, A.M., AMBUDKAR, S.V., GOTTESMANT, M.M. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. **Science**, v.315, p.525-8, 2007.
- LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the phage T4 assembly of the head of bacteria. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-85, 1970.
- LEBENSOHN, A.M. Protein Purification and Analysis. (Modified by Nathan Lord) Disponível em: <http://isites.harvard.edu/fs/docs/icb.topic161348.files/lab/Proteins_Protocol.pdf>. Acesso em: 3 fev. 2008.
- LEE, J.S., FREVERT, C.W., WURFEL, M.M., PEIPER, S.C., WONG, V.A., BALLMAN, K.K., RUZINSKI, J.T., RHIM, J.S., MARTIN, T.R., GOODMAN, R.B. Duffy antigen facilitates movement of chemokine across the endothelium in vitro and promotes neutrophil transmigration in vitro and in vivo. **J. Immunol.**, v.170, p.5244-51, 2003.
- LENTSH, A.B. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) and prostate cancer. A role as clear as black and white? **Faseb J.**, v.16, p.1093-5, 2002.
- LOBO, C.A. *Babesia divergens* and *Plasmodium falciparum* use common receptors, glycoporphins A and B to invade the human red blood cell. **Infect. Immun.**, v.73, p.649-51, 2005.
- LOFTUS, R.T., MACHUGH, D.E., BRADLEY, D.G., SHARP, P.M., CUNNINGHAM, P. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.2757-61, 1994.
- MACHUGH, D.E., SHRIVER, M.D., LOFTUS, R.T., CUNNINGHAM, P., BRADLEY, D.G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of Taurine and Zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, v.146, p.1071-86, 1997.
- MAIER A.G., DURAISINGH, M.T., REEDER, J.C., PATEL, S.S., KAZURA, J.W., ZIMMERMAN, P.A., COWMAN, A.F. *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycoporphin C and selection for Gerbich negativity in human populations. **Nat. Med.**, v.9, p.87-92, 2003.

- MANWELL, C., BAKER, C.M.A. Chemical classification of cattle two phylogenetic tree and specific status of zebu. **Anim. Blood Groups Biochem. Genet.**, v.11, p.151-62, 1980.
- MARTELINE, M.A. **Identificação e seqüenciamento do gene Duffy em *Bos indicus***. Botucatu, 2003. 47p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- MASON, S.J., MILLER, L.H., SHIROISHI, T., DVORAK, J.A., MCGINNISS, M.H. The Duffy blood group determinants: their role in the susceptibility of human and animal erythrocytes to *Plasmodium knowlesi* malaria. **Br. J. Haematol.**, v.36, p.327-35, 1977.
- MATHEW, S., CHAUDHURI, A., MURTY, V.V., POGO, A.O. Confirmation of Duffy blood group antigen locus (Fy) at 1q22-23 by fluorescence in situ hybridization. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.67, p.68, 1994.
- McCOSKER, P.J. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M., KRIER, J.P. (Eds). **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p.1-24.
- MEADOW, R.H. Animal domestication in the Middle East: a view from the Eastern: a revised view from the eastern margin. In: POSSEHL, G.L. (Ed). **Harappan Civilization**. 2 ed. New Delhi: Oxford and IBH, 1993, p.295-320.
- MENARD, R. Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the Plasmodium sporozoite. **Cell. Microbiol.**, v.3, p.63-73, 2001.
- MICHON, P., STEVENS, J.R., KANEKO, O., ADAMS, J.H. Evolutionary relationships of conserved cysteine-rich motifs in adhesive molecules of malaria parasites. **Mol. Biol. Evol.**, v.19, p.1128-42, 2002.
- MIGNONE, F., GISSI, C., LIUNI, S., PESOLE, G. Untranslated regions of mRNAs. **Genome Biol.**, v.3, p.1-10, 2002.
- MILLER, L.H., MASON, S.J., DVORAK, J.A., MCGINNISS, M.H., ROTHMAN, I.K. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinant. **Science**, v.189, p.561-3, 1975.

- MILLER, L.H., HAYNES, J.D., McCAULIFFE, I.M. SHIROISHI, T., DUROCHER, J.R., McGINNISS, M.H. Evidence for difference in erythrocyte surface receptors for malarial parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi*. **J. Exp. Med.**, v.146, p.277-81, 1976.
- MONTENEGRO, J. Prevalence and control of babesiosis in the Americas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.87, p.327-36, 1992.
- MOORE, B.B., ARENBERG, D.A., STOY, K. MORGAN, T., ADDISON, C.L., MORRIS, S.B., GLASS, M., WILKE, C., XUE, Y.Y., SITTERDING, S., KUNKEL, S.L., BURDICK, M.D., STRIETER, R.M. Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. **Am. J. Pathol.**, v.154, p.1503-12, 1999.
- MORDACQ, J.C., ELLINGTON, R.W. Poliacrylamide gel eletrophoresis (PAGE) of blood proteins. In: Tested studies for laboratory teaching. WORKSHOP CONFERENCE OF THE ASSOCIATION FOR BIOLOGY LABORATORY EDUCATION (ABLE),15,1993,Toronto. **Proceedings...** Toronto: C. A. Goldman, 1994. p.15-44.
- MURPHY, M.T. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v.12, p.593-633, 1994.
- NEOTE, K., MAK, J.Y., KOLAKOWSKI, L.F., SCHALL, T.J. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. **Blood**, v.84, p.44-52, 1994.
- NOVAGEN. **pET System Manual**, 11 ed., USA , 2005. 80p.
- OKAMURA, M.,YOKOYAMA, N., TAKABATAKE, N., OKUBO, K., IKEHARA, Y., IGARASHI, I. Modification of host erythrocyte membranes by trypsin and chymotrypsin treatments and effects on the in vitro growth of bovine and equine *Babesia* parasites. **J. Parasitol.** v.93, n.1, 2007.
- OLSON, M.L., SMYTHE, J.S., HANSSON, C., POOLE, J., MALLINSON, G., JONES, J., AVENT, N.D., DANIELS, G. The Fy^x phenotype is associated with a missense mutation in the Fy^b allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. **Br. J. Haematol.**, v.103, p.1184-91, 1998.

- PAIVA-NETO. Estudo da incidência e localização de carrapato (*Boophilus microplus*) em bovinos nelore, holandês e curraleiro no Distrito Federal. **Circular técnica Embrapa**, v.34, p.10-35, 2004.
- PARASOL, N., REID, M., RIOS, M., CASTILHO, L., HARARI, I., KOSOWER, N.S. A novel mutation in the coding sequence of the FY*B allele of the Duffy chemokine receptor gene is associated with an altered erythrocyte phenotype. **Blood**, v.92, p.2237-43, 1998.
- PAYNE, W.J.A. Domestication: a forward step in civilization. In HICKMAN, C.G. (Ed.). **Cattle Genetic Resources**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.51-72.
- PEIPER, S.C., WANG, Z.X., NEOTE, K., MARTIN, A.W., SHOWELL, H.J., CONKLYN, M.J., OGBORNE, K., HADLEY, T.J., LU Z.H., HESSELGESSER, J. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. **J. Exp. Med.**, v.181, p.1311-17, 1995.
- RAYNER, J.C., VARGAS-SERRATO, E., HUBER, C.S., GALINSKI, M.R., BARNWELL, J.W. A *Plasmodium falciparum* homologue of *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein (PvRBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway. **J. Exp. Med.**, v.194, p.1571-81, 2001.
- REGE, J.E.O. The state of African cattle genetic resources I. Classification framework and identification of threatened and extinct breeds. **Anim. Genet. Res. Inform.**, n.25, p.1-25, 1999.
- REGITANO, L.C.A., OLIVEIRA, M.C.S., ALENCAR, M.M., CARVALHO, M.E., ANDRÉO, R., MOREIRA, I.C., NEO, T.A., BARIONI JR., W., SILVA, A.M. Avaliação da resistência de bovinos de diferentes grupos genéticos ao carrapato e à babesiose. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. **Bol. Pesq. Desenv.** n.9, p.1-48, 2006.
- REED, C.A. The beginnings of the animal domestication. In: MASON, I.L. (Ed). **Evolution of domesticated animals**. London: Longman, 1984. p.1-6.

- RISTIC, M., LEVY, M.G. A new era of research toward solution of bovine babesiosis. In: RISTIC, M., KREIER, J.P. (Eds.) **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p.509-49.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Preparation of plasmid DNA by Alkaline lysis with SDS: Miniprep. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p.1-32.
- SANGER. R., RACE, R.R., JACK, J. The Duffy blood group of New York Negroes: the phenotype Fy(a-b-). **Br. J. Haematol.**, v.1, p.370-4, 1955.
- SANTIAGO, A.A. **O Zebu na Índia, no Brasil e no Mundo**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1985. 774p.
- SANTOS, R. **Nelore: a vitória brasileira**. Uberaba: Agropecuária Tropical, 1995. 392p.
- SANTOS, I.K.F.M. Polimorfismo do sistema imunológico e sua aplicação no melhoramento animal para resistência a doenças infecciosas e parasitárias. In: REGITANO, L.C.A., COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.41-60
- SCHMITT, B.M., BIEMESDERFER, D., ROMERO, M.F., BOULPAEP, E.L., BORON, W.F. Immunolocalization of the electrogenic $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ cotransporter in mammalian and amphibian kidney. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** v.276, p.27-38, 1999.
- SCHWERIN, M., BROCKMANN, G., VANSELOW, J., SEYFERT, H.M. Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvement- An overview. **Anim. Res. Dev.**, v.42, p.14-26, 1995.
- SHAW, A.Z. & MIROUX, B. A general approach for heterologous membrane protein expression in *Escherichia coli*. In: SELINSKY, B.S. (Ed.). **Membrane Protein Protocols: Expression, purification and characterization**. Methods in Molecular Biology, v.228. Totowa: Humana Press, 2003. p.23-35.

- SHEN, H., SCHUSTER, R., STRINGER, K.F., WALTZ, S.E., LENTSCH, A.B. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growth. **Faseb J.**, v.20, p.59-64, 2006.
- SIM, B.K., CHITNIS, C.E., WASNIOKA, K., HADLEY, T.J., MILLER, L.H. Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. **Science**, v.264, p.1941-4, 1994.
- SORENSEN, H.P., MORTENSEN, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, v.115, n.2, p.113-28, 2005.
- STANFORD, J. L., STEPHENSON, R. A., COYLE, L. M., CERHAN, J., CORREA, R., ELEY, J. W., GILLILAND, F., HANKEY, B., KOLONEL, L. N., KOSARY, C., ROSS, R., SEVERSON, R., WEST, D. Prostate Cancer Trends 1973–1995 SEER Program, National Cancer Institute Bethesda, MD. NIH Pub. No. 99-4543, 1999.
- STUDIER, F.W., ROSENBERG, A.H., DUNN, J.J., DUBENDORFF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol.**, n.185, p.60-89, 1990.
- TAKABATAKE, N., OKAMURA, M., YOKOYAMA, N., OKUBO, K., IKEHARA, Y. IGARASHI, I. Involvement of a host erythrocyte sialic acid content in *Babesia bovis* infection. **J. Vet. Med. Sci.**, v.69, n.10, p. 999-1004, 2007.
- TAYLOR, D.W., EVANS, C.B., ALEY, S.B., BARTA, J.R., DANFORTH, H.D. Identification of an apically located antigen that is conserved in sporozoan parasites. **J. Protozool.**, v.37, p.540-5, 1990.
- TOLIA, N.H. & JOSHUA-TOR, L. Strategies for protein co-expression in *Escherichia coli*. **Nat. Methods**, v.3, n.1, p.55-64, 2006.
- TOURNAMILLE, C., COLIN, Y., CARTRON, J.P., LE VAN KIM, C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. **Nat. Genet.**, v.10, p.224-8, 1995.

- TOURNAMILLE, C., LE VAN LIM, C, FILIPE, GANE, P., A., BLANCHARD, D., PROUDFOOT, A.E., CARTRON, J.P., COLIN, Y. Close association of the first and fourth extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines by a disulfide bond is required for ligand binding. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.26, p.16274-80, 1997.
- TOURNAMILLE, C., LE VAN LIM, C, FILIPE, GANE, P., LE PENNEC, P.Y., ROUBINET, F., J. BABINET, CARTRON, J.P., COLIN, Y. Arg89Cys Substitution Results in Very Low Membrane Expression of the Duffy Antigen/Receptor for Chemokines in Fy^x Individuals. **Blood**, v.92, n.6, p.2147-56, 1998.
- TOURNAMILLE, C., FILIPE, A., WASNIOOWSKA, K., GANE, P., LISOWSKA, B., CARTRON, J.P., COLIN, Y., LE VAN LIM, C. Structure-function analyses of the extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines: characterization of antibody and chemokine binding sites. **Br. J. Haematol.**, v.122, p.1014-23, 2003.
- TOURNAMILLE, C., BLANCHER, A., LE VAN KIM, C., GANE, P., APOIL, P.A., NAKAMOTO, W., CARTRON, J.P., COLIN, Y. Sequence, evolution and ligand binding properties of mammalian Duffy antigen/receptor for chemokines. **Immunogenetics**. v.55, p.682-94, 2004.
- TOURNAMILLE, C., FILIPE, A., BAUDAT, C., RIOTTOT, M.M., LONGACRE, S., CARTRON, J.P., LE VAN LIM, C, COLIN, Y. Fine mapping of the Duffy antigen binding site for *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.144, p.100-3, 2005.
- TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.76, n.9, p.4350-4, 1979.
- UTECH, K.B.W., WHARTON, R.H., KEER, J.D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. **Aust. J. Agric. Res.**, v.29, p.885-95, 1978.
- VESCIO, L.A., FARINA, D., ROGIDO, M. Hemolytic disease of the newborn caused by anti-Fy^b (letter). **Transfusion**, v.27, p.366, 1987.

- VIGNAL, A., MILAN, D., SAN CRISTOBAL, M., EGGEN, A. A review on SNP and others types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genet. Sel. Evol.**, v.34, p. 275-305, 2002.
- VILLARES, J.B. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. **Bol. Ind. Anim.**, v.4, p.60-86, 1941.
- WANG Z., MOULT, J. SNPs, Protein Structure, and Disease. **Human Mutation**, v.17, p.263-70, 2001
- WASNIOWSKA, K., CZERWINSKI, M, JACHYMEK, W., LISOWSKA, E. Expression and binding properties of a soluble chimeric protein containing the N-terminal domain of the Duffy antigen. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.273, p.705-11, 2000.
- WASNIOWSKA, K., LISOWSKA, E., HALVERSON, G.R., CHAUDHURI, A., REID, M.E. The Fya, Fy6 and Fy3 epitopes of the Duffy blood group system recognized by new monoclonal antibodies: identification of a linear Fy3 epitope. **Br. J. Haematol.** v.124, p.118-22, 2004.
- WILKIE, G.S., DICKSON, K.S., GRAY, N.K. Regulation of mRNA translation by 5'-and 3'-UTR- binding factors. **Trnd. Biochem. Sci.** v.28, n.4, p. 182-8, 2003
- WOESTENENK, E.A.; HAMMARSTRÖM, M.; VAN DEN BERG, S.; HÄRD, T.; Berglund, H. His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. **J. Struct. Func. Genom.**, v.5, p.217-29, 2004.
- YAZDANBAKHSH, K., RIOS, M., STORRY, J.R., KOSOWER, N.S., PARASOL, N., CHAUDHURI, A. REID., M. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. **Transfusion**, v.40, p.310-20, 2000.
- 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. **Vet. Parasitol.**, v.138, p.22-32, 2006.

- ZIMMERMAN, P.A., WOOLEY, I., MASINDE, G.L., MILLER, S.M., McNAMARA, D.T., HAZLETT, F., MGONE, C.S., ALPERS, M.P., GENTON, B., BOATIN, B.A., KAZURA, J.W. Emergence of FY*A null in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.96, p.13973-7, 1999.
- ZINTL, A., WESTBROOK, C., MULCAHY, G., SKERRETT, H.E., GRAY, J.S. Invasion, and short and long-term survival of *Babesia divergens* (phylum Apicomplexa) cultures in non-bovine sera and erythrocytes. **Parasitology**, v.124, p.583–8, 2002a.
- ZINTL, A., WESTBROOK, C., SKERRETT, H.E., GRAY, J.S., MULCAHY, G. Chymotrypsin and neuraminidase treatment inhibits host cell invasion by *Babesia divergens* (phylum Apicomplexa). **Parasitology**, v.125, p.45-50, 2002b.
- ZWART, D., BROCKLESBY, D.W. Babesiosis: non specific resistance immunological factors and pathogenesis. **Adv. Parasitol.**, v.17, p.49-112, 1979.

Anexo 8.1. Comparação da porção codificadora do gene *Duffy* (A) e da proteína (B) *Duffy* de *Bos taurus taurus* com as seqüências correspondentes de *Homo sapiens*. A. Alinhamento das seqüências codificantes do Gene *Duffy* de *Bos taurus taurus* (GenBank: BT021079.1) e *Homo sapiens* (GenBank: BC017817). B. Alinhamento da seqüência de aminoácido da proteína *Duffy* de *Bos taurus taurus* (GenBank: AAX09096.1) com a isoforma maior da proteína *Duffy* de *Homo sapiens* (GenBank: AAH17817.1). Destacado em cinza região correspondente ao epítipo Fy6 (aa. 19 ao 26) e ao epítipo Fyb (aa 41ao 46). Destacado pelo traço região correspondente ao peptídeo sintético (aa. 39 ao 49).

Score =564 bits(293), Expect=4e-157I Identities = 683/878(77%),
Gaps = 0/878 (0%) Strand=Plus/Plus

A	<i>B. taurus</i>	116	TGGAAGCAGCTGCACCCCTGCCACTCCTGCTCACTGCTCAACTACTCCTCACTGCCCTTCT	175
	<i>H. sapiens</i>	134	C.....TAC.....GG.TG.....TG.....	193
		176	TCATCCTTGTCAGCATCCTGGGCATCCTGGCTAGTGGGACCATCCTCTATGCGCTTCTCA	235
		194	CAC.....TG.....T.....A.....CA.C.....TG.....TCAT.....T...	253
		236	GACCTTTGTTCCGCTGGCAGCTCTACCAGGACAGGTCTACCCTGGTGCAACTGGCCGTGG	295
		254	C.C.....G.....CT.G.T.....GT.....CA..G.....T.....	313
		296	GCAGTGCCCTCTTCAGCATCGTGGTGGCCATCCTGGCACGGGGCCTCAGTGGGGCTCTCA	355
		314	T.....G.....T.....C.CA..G..AG..A.CA..G..	373
	<i>B. taurus</i>	356	TCACCTCCCTGTGCCACCTGGCTCACTTGGTCGCCTATGGCTCAGCCTTTGCTCAAGCTC	415
	<i>H. sapiens</i>	374	G.T.TG.....TNG.....GCT.....GT.....TGG.....C..G.....T	433
		416	TGCTAATAGGTACCATGCTGCTGGGCCCCAGCTGGGTGCAGGCCAAGTCCCAGGCC	475
		434	GC.....G.....C.....A.AGA.....G.....	493
		476	TCAGGCTGGGGTCACTGTGGGACTTTGGGGAGTGGCTGCCCTCCTGTCACTGCCAGTCG	535
		494	CC.....C.....R.....R.....R.....T...A	553
	<i>B. taurus</i>	536	TGCTGGGCAGTGACACTTCCCAAGGACTCTGCACCGTGACCTTAGCGGGAGTGGGAAA	595
	<i>H. sapiens</i>	554	CC....C.....GTG.....TGGT.....C.....TA.AC....AC....CT.A.GG	613
		596	CATTGCGGTACATACAGCTGCGAGCCTGCTTTGCCATATTTGTCTTGTGCCACTGGGTT	655
		614	.T....A.GC..C.....R...T.....TC.....C.....T.....	673
		656	TGTTGGGAACCAAGGGCTGAAGACGGTGTGGGCAGGGCACCCTGCCCATGGGTTGATG	715
		674	T.....G.....R.....CAT.....T.T..GG..AG....C...A.GA.CA	733
	<i>B. taurus</i>	716	TCCTGTGGGTCTGGTTCAATTTCTGGTGGCCTCAGGGCATGACTCTGGGATTGGACTCCC	775
	<i>H. sapiens</i>	734	C.....T.....T.....GG..GT...R...C.....T.T..	793
		776	TAGTGAGGTCCAAAGGCATAGTGGTGTCAACATGTCCAGCCAGCAGGCCCTGGACATGC	835
		794	.G.....CTGT.GC..T.....TG.....T.....C.....	853
		836	TGCTGGATGTGGCAGAAGCCCTGGCAATATTGCACTGCTGGGTACACCCCTGCTCCTTG	895
		854	A.CC.....T.....T.....G.....C.....	913
		896	CCTGGTCTGTCTACCAGGCCACTCACACCTCCCAACCCTCCCTGCCTGTGCCTACAACAC	955
		914	..CTAT.....C.....C.G.....CT.TTG.....T.....C...GA.GG.T	973
	<i>B. taurus</i>	956	AGACTTCTCATCTGGACACCCCTGGAGGCAAATCCTAG	993
	<i>H. sapiens</i>	974	G.TT.....A.....	1011

= 345 bits (886), Expect = 3e-93
ities = 210/336 (62%), Positives = 249/336 (74%), Gaps = 6/336 (1%)

B	<i>B. taurus</i>	1	HGNCLYPVADDNSTKLAIKEDFLIDFPEDY-----YPDYNE-TDVEAAAPCHSCSLNYS	54
	<i>H. sapiens</i>	1	HRAELSP..ENSSQL..EDVWNSS.GVNDSE..GDYGAHL.....N..DD.	60
		55	SLPFFILVSILGILASGTILYALLRPLFRWQLYQDRSTLVQLAVGSALFSIVVPILARGL	114
		61	A.....T.V.....S.V.FH.F.....CPGWPV.A.....V..P..	120
	<i>B. taurus</i>	115	SGALITSLCHLAHLVAYGSAFAQALLIGYHACLGPQLGAGQVPLRLGVTVGLWGVAAALL	174
	<i>H. sapiens</i>	121	GSTRSSA..S.GYC.W.....L.C..S..HR.....T..L...I.....	180
		175	SLPVVLGSDTSQGLCTVTFSGEMETLRYIHAAACFAIFVLLPLGLLGTKLKTVLGRAPC	234
		181	T...T.A.GA.G....LIY.T.LKA.QAT.TV..L.....F.A....KA..MG.G	240
		235	PNVDVLWVNFIFWNPQGNHTLGLDSLVRSKAIVVSTCPAQQALDMLLDVAEALAILHC VAT	294
		241	..MNI..A.....H.VV....F.....LLLL..L.....L..NL.....	300
	<i>B. taurus</i>	295	PLLLAWVCYQATHTSPPSLPLPTTQTSHLDTLGGKS	330
	<i>H. sapiens</i>	301	LF.H....R.LL.....EGWF.....S..	336

Anexo 8.2. Análise do sequenciamento de um clone HisNt1 e um HisFL1 em pET28a(+)

A.1. Sequência destacada em rosa: sequência complementar ao oligonucleotídeo T7promoter, Sequência destacada em verde: região do pET28a(+) íntegra, Regiões destacadas em azul e sublinhadas: sítios de restrição *Nco* I (CCATGG), *Nde* I (CATATG) e *Xho* I (CTCGAG), Região preenchida em amarelo: região não correspondente ao pET28a(+) e submetida a comparação no GenBank, Região preenchida em cinza: sequência Nt1 clonada e submetida a comparação no GenBank. **A.2.** Sequência destacada em verde: região do pET28a(+) íntegra, Regiões destacadas em azul e sublinhadas: sítios de restrição *Nco* I (CCATGG), *Nde* I (CATATG), Região preenchida em amarelo: região não correspondente ao pET28a(+) e submetida a comparação no GenBank, Região preenchida em cinza: sequência FL1 clonada e submetida a comparação no GenBank. **B.1.** Resultado da comparação da sequência de nucleotídeos desconhecida entre os sítios das enzimas *Nco* I e *Nde* I do pET28a(+) com as sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank (BLASTN). **B.2.** Resultado da comparação da mesma sequência traduzida em aminoácidos com as sequências de aminoácidos depositadas no GenBank (BLASTP). **C.1.** Resultado da comparação da sequência de nucleotídeos Nt1 clonada no pET28a(+) com as sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank (BLASTN). **C.2.** Resultado da comparação da sequência de nucleotídeos FL1 clonada no pET28a(+) com as sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank (BLASTN).

A.1

TTTTTCCCGGGTTTTNGCAGAAACGTGGGNTGGCNTGGTTACCCNCGNCGGAAAACGTTTGATAAG
AGACACCGGCATANTNTGNGNCATCGTATAACCGTTACTGGTTTCACNTTCACCCACCCTGAATTNGA
CTNTNTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTTCGATGGTGTCCGGGATCT
CGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGC
ACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCC
TGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGCGGAGCCCGATCTTCCCCATC
GGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGC
GTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGA
GCGGATAACAATTCCTCTAGAAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGTGAACGA
AATGCGAGATGACACGCGTCCCCATATGGGGAACTGTCTTTACCCGGTGGCTGATGACAACTCCACC
AAGTTGGCCATTAAAGAGGACTTTTTGATTGACTTTCCGGAGGACTACTATCCAGACTATAATGAGAC
CGACGTGGAAGCAGCTGCACCCTGCCACTCCTGCTCACTGCTCAACTACTCCTCACTGCTCGAG

A.2.

ATGGACGNTCAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGTGAACG
AAATGCGAGATGACACGCGTCCCCATATGGGGAACTGTCTTTACCCGGTGGCTGATGACAACTCCACCA
AGTTGGCCATTAAAGAGGACTTTTTGATTGACTTTCCGGAGGACTACTATCCAGACTATAATGAGACCG
ACGTGGAAGCAGCTGCACCCTGCCACTCCTGCTCACTGCTCAACTACTCCTCACTGCCCTTCTTCATCCT
TGTCAGCATCCTGGGCATCCTGGCTAGTGGGACCATCCTCTATGCGCTTCTCAGACCTTTGTTCCGCTGG
CAGCTCTACCAGGACAGGTCTACCCTGGTGAACCTGGCCGTGGGCAGTGCCCTCTTCAGCATCGTGGTG
CCCATCCTGGCACGGGGCCTCAGTGGGGCTCTCATCACCTCCCTGTGCCACCTGGCTCACTTGGTTCGCCT
ATGGCTCAGCCTTTGCTCAAGCTCTGCTAATAGGGTACCATGCCTGCCTGGGCCCCCAGCTGGGTGCAG
GCCAAGTCCCAGGCCTCAGGCTGGGGGTCACTGTGGGACTTTGGGGAGTGGCTGCCCTCCTGCTCACTGC

B.1.

BLAST N:

>  [gb|AE003849.1|](#)  [Xylella fastidiosa 9a5c, complete genome](#)
Length=2679306

Features in this part of subject sequence:

[transcriptional regulator \(ArsR family\)](#)[conserved hypothetical protein](#)

Score = 58.0 bits (29), Expect = 8e-07
Identities = 29/29 (100%), Gaps = 0/29 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query_1	TGAACGAAATGCGAGATGACACGCGTCCC	29
Subject_719247	TGAACGAAATGCGAGATGACACGCGTCCC	719219

B.2.

BLAST P:

VNEMRDDTRP

>  [ref|NP_298057.1|](#)  [transcriptional regulator \(ArsR family\)](#) [\[Xylella fastidiosa 9a5c\]](#)
Length=114

Score = 37.5 bits (81), Expect = 0.065
Identities = 10/10 (100%), Positives = 10/10 (100%), Gaps = 0/10 (0%)

Query_1	VNEMRDDTRP	10
	VNEMRDDTRP	
Subject_2	VNEMRDDTRP	11

C.1

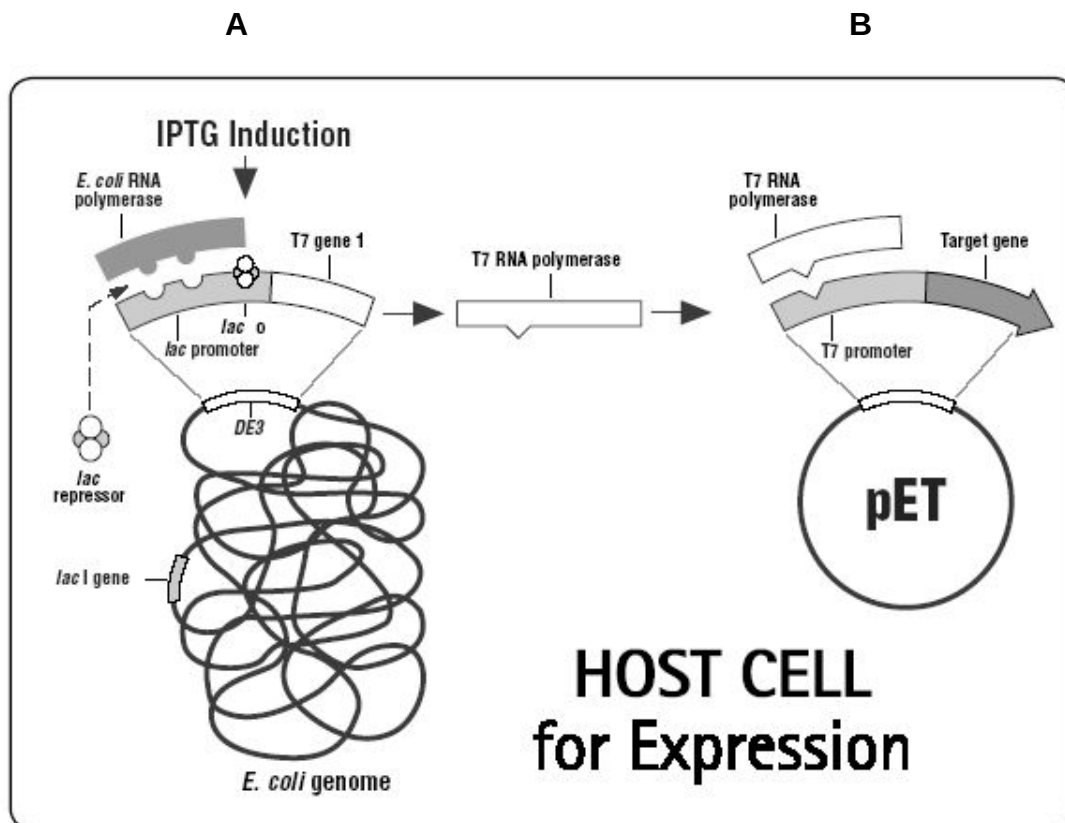
```
> gb|BC142464.1| UG Bos taurus Duffy blood group, chemokine receptor,  
mRNA (cDNA clone MGC:152612 IMAGE:8434441), complete cds  
Length=1216  
  
GENE ID: 528076 DARC |Duffy blood group, chemokine receptor [Bos taurus]  
(10 or fewer PubMed links)  
  
Score = 313 bits (169), Expect = 2e-82  
Identities = 169/169 (100%), Gaps = 0/169 (0%)  
Strand=Plus/Plus  
  
Query_1 ATGGGGA+ACTGTCTTTACCCGGTGGCTGATGACA+ACTCCACCAAGTTGGCCATTAAAGAG 60  
|||||  
Sbjct_44 ATGGGGA+ACTGTCTTTACCCGGTGGCTGATGACA+ACTCCACCAAGTTGGCCATTAAAGAG 103  
  
Query_61 GACTTTT+TGATTGACTTTCCGGAGGACTACTATCCAGACTATAATGAGACCGACGTGGAA 120  
|||||  
Sbjct_104 GACTTTT+TGATTGACTTTCCGGAGGACTACTATCCAGACTATAATGAGACCGACGTGGAA 163  
  
Query_121 GCAGCTGCACCCTGCCACTCCTGCTCACTGCTCA+ACTACTCCTCACTGC 169  
|||||  
Sbjct_164 GCAGCTGCACCCTGCCACTCCTGCTCACTGCTCA+ACTACTCCTCACTGC 212
```

> [gb|BT021079.1|](#) **UG** **Bos taurus Duffy blood group (FY), mRNA, complete cds** Length=1089 GENE ID: 528076
DARC | Duffy blood group, chemokine receptor [Bos taurus] Score=1197 bits(648),Expect=0.0 Identities=720/755(95%),
Gaps=20/755(2%)

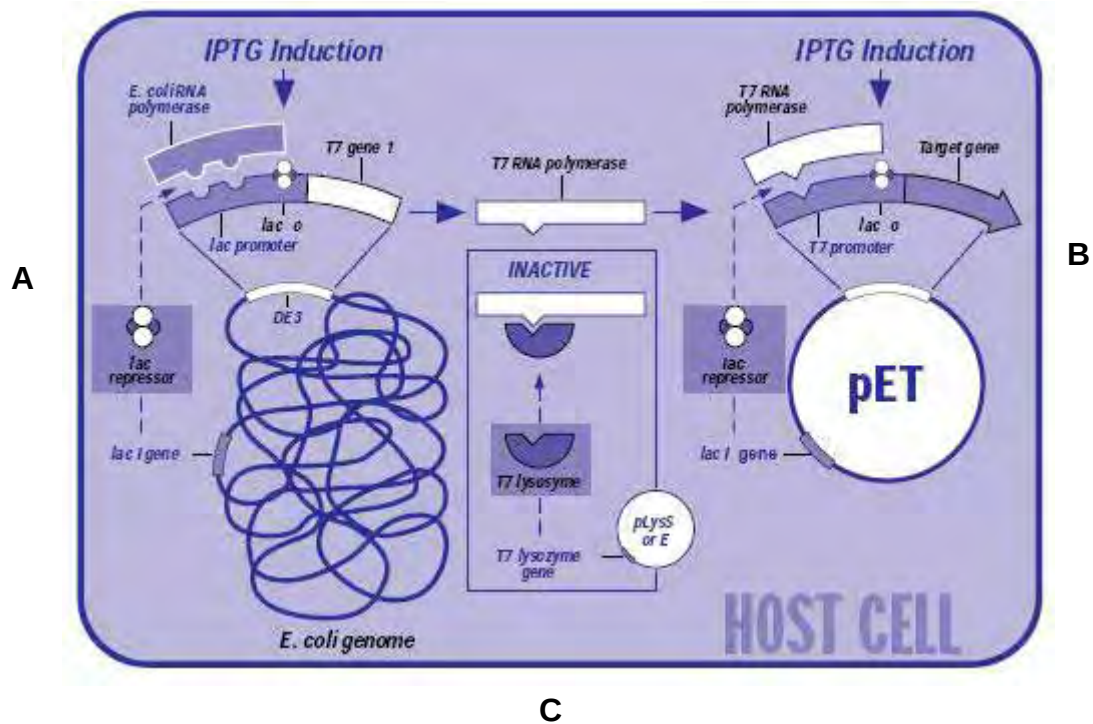
C.2.

```
Query_1 ATGGGGA+ACTGTCTTTACCCGGTGGCTGATGACA+ACTCCACCAAGTTGGCCATTAAAGAG 60  
|||||  
Sbjct_47 ATGGGGA+ACTGTCTTTACCCGGTGGCTGATGACA+ACTCCACCAAGTTGGCCATTAAAGAG 106  
  
Query_61 GACTTTT+TGATTGACTTTCCGGAGGACTACTATCCAGACTATAATGAGACCGACGTGGAA 120  
|||||  
Sbjct_107 GACTTTT+TGATTGACTTTCCGGAGGACTACTATCCAGACTATAATGAGACCGACGTGGAA 166  
  
Query_121 GCAGCTGCACCCTGCCACTCCTGCTCACTGCTCA+ACTACTCCTCACTGCCCTTCTTCATC 180  
|||||  
Sbjct_167 GCAGCTGCACCCTGCCACTCCTGCTCACTGCTCA+ACTACTCCTCACTGCCCTTCTTCATC 226  
  
Query_181 CTTGTCAGCATCCTGGGCATCCTGGCTAGTGGGACCATCCTCTATGCGCTTCTCAGACCT 240  
|||||  
Sbjct_227 CTTGTCAGCATCCTGGGCATCCTGGCTAGTGGGACCATCCTCTATGCGCTTCTCAGACCT 286  
  
Query_241 TTGTTCCGCTGGCAGCTCTACCAGGACAGGTCTACCCTGGTGCAACTGGCCGTGGGCAGT 300  
|||||  
Sbjct_287 TTGTTCCGCTGGCAGCTCTACCAGGACAGGTCTACCCTGGTGCAACTGGCCGTGGGCAGT 346  
  
Query_301 GCCCTCTTCAGCATCGTGGTGCCCATCCTGGCACGGGGCCTCAGTGGGGCTCTCATCACC 360  
|||||  
Sbjct_347 GCCCTCTTCAGCATCGTGGTGCCCATCCTGGCACGGGGCCTCAGTGGGGCTCTCATCACC 406  
  
Query_361 TCCCTGTGCCACCTGGCTCACTTGGTGCCTATGGCTCAGCCTTTGCTCAAGCTCTGCTA 420  
|||||  
Sbjct_407 TCCCTGTGCCACCTGGCTCACTTGGTGCCTATGGCTCAGCCTTTGCTCAAGCTCTGCTA 466  
  
Query_421 ATAGGGTACCATGCCTGCCTGGGCCCCAGCTGGGTGCAGGCCAAGTCCCAGGCCTCAGG 480  
|||||  
Sbjct_467 ATAGGGTACCATGCCTGCCTGGGCCCCAGCTGGGTGCAGGCCAAGTCCCAGGCCTCAGG 526
```

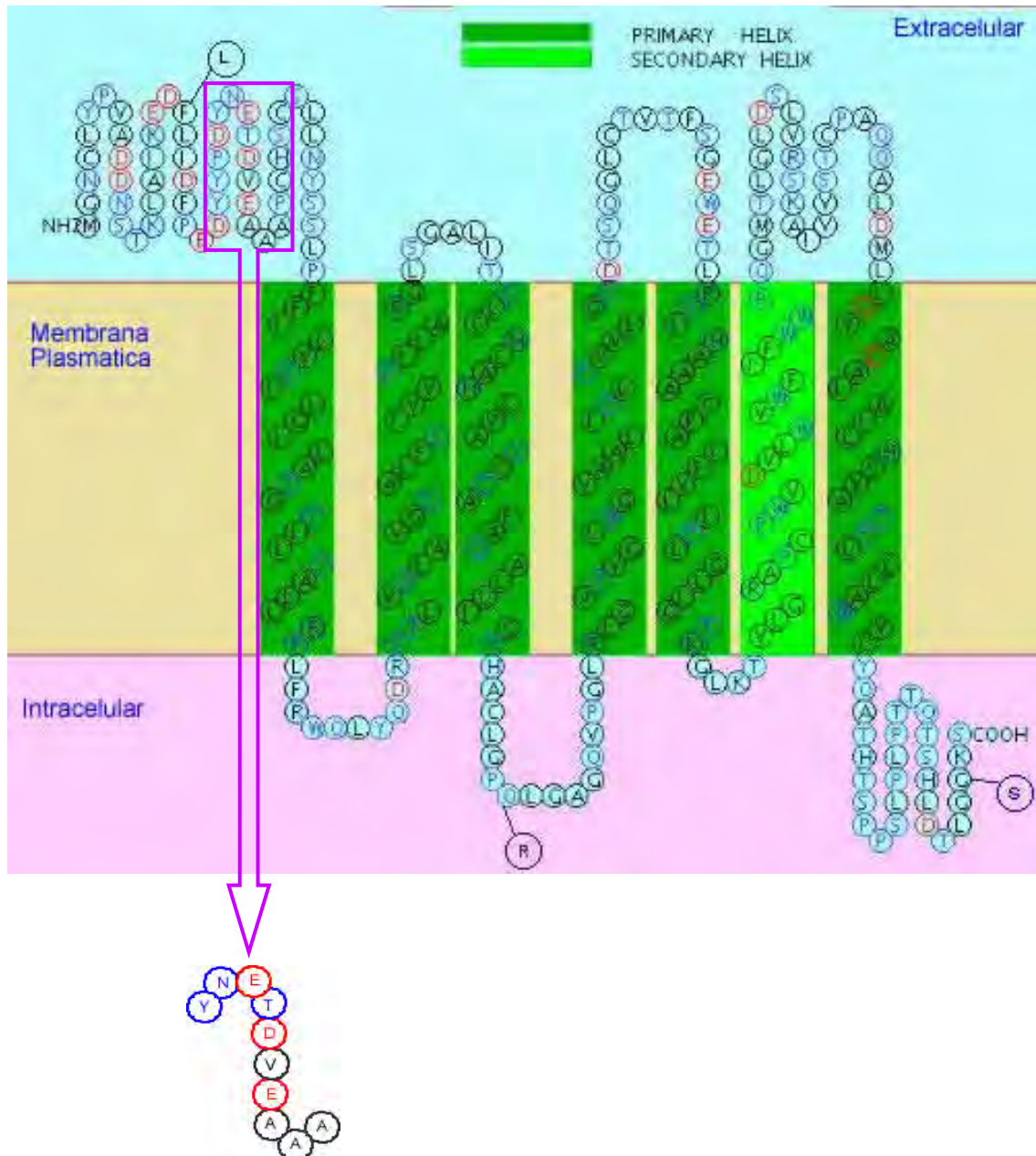
Anexo 8.3. Controle do plasmídeo pET pelo promotor T7/lac. **A.** Cromossomo da célula hospedeira: destacando local do promotor *lac* com o operador reprimido pela proteína repressora (codificada pelo gene *lacI*) e o gene (*T7 gene1*) que codifica a T7 RNA polimerase. Com a adição de IPTG a proteína repressora é liberada do operador *lac* e ocorre a transcrição da T7RNA polimerase pela RNA polimerase da bactéria. **B.** Vetor pET: promotor T7, região do *lac* operador (3' do promotor T7) o qual está reprimido pelo repressor *lac* que em resposta ao IPTG libera o operador *lac* e possibilita que a T7RNA polimerase se ligue ao promotor T7 e transcreva o gene de interesse clonado no múltiplo sítio de clonagem do plasmídeo (NOVAGEN, 2005).



Anexo 8.4. Célula *E. coli* BL21(DE3)pLysS. **A:** Cromossomo da *E. coli* BL21(DE3). De baixo para cima: *LacI* gene que codifica a proteína repressora do promotor *lac*, promotor *lac* com o operador reprimido pela proteína repressora, gene que codifica a T7 RNA polimerase que com a adição de IPTG libera a proteína repressora do operador *lac* e permite a transcrição da T7RNA polimerase. **B:** Vetor pET. De baixo para cima: Gene *lacI* que codifica para a proteína repressora do operador *lac*, T7 promotor da transcrição, região do *lac* operador 3' (*downstream*) do promotor T7, que com a adição de IPTG libera a proteína repressora do operador *lac* e possibilita que a T7RNA polimerase se ligue ao promotor T7 e transcreva o gene de interesse clonado no múltiplo sítio de clonagem do plasmídeo(NOVAGEM). **C:** Plasmídeo contendo gene da lisozima T7 que inativa a T7RNA polimerase impedindo escape de transcrição antes da indução.



Anexo 8.5. Modelo 2D da proteína Duffy de *Bos taurus taurus* (AAX09096.1) construído pelo servidor SOSUI. Destacado em roxo a localização da sequência de 10 aminoácidos (tirosina Y 34 a alanina A 43) correspondente ao peptídeo sintético. No detalhe a sequência do peptídeo sintético. Dentro dos círculos: L: substituição do aminoácido 22 Fenilalanina por Leucina exclusiva de *Bos taurus indicus*. R: substituição do aminoácido 150 Glutamina por Arginina; e S: substituição do aminoácido 328 de Glicina por Serina aminoácidos ocorridas em *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*.



Anexo 8.6. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína Duffy de *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. **A.** Alinhamento das seqüências de aminoácido da proteína Duffy de *Bos taurus taurus* (acesso GenBank: AAG31021.1) e *B.taurus indicus* (Genbank: AAP31577.1) destacando as mutações ocasionadas pelo SNP 647 T>G = Aminoácido 22 F>L e pelo SNP 1030-1031 (inversão) GA>AG= aminoácido 152 R>Q. **B.** Alinhamento das seqüências da proteína Duffy de *Bos taurus taurus* (acesso GenBank: AAX09096.1) e *B.taurus indicus* (Genbank: AAP31577.1) destacando as mutações ocasionadas pelo SNP 647 T>G = Aminoácido 22 F>L e pelo SNP 1343 A>G = aminoácido 328 G>S.

A

<i>B. taurus</i>	1	MGNCLYPVADDNSTKLAIKEDFLIDFPEDYYPDYNETDVEAAAPCHSCSLNYS	60
<i>B. indicus</i>	1	L.....	60
<i>B. taurus</i>	61	LVSILGILASGTILYALLRPLFRWQLYQDRSTLVQLAVGSALFSIVVPILARGLSGALIT	120
<i>B. indicus</i>	61		120
<i>B. taurus</i>	121	SLCHLAHLVAYGSFAQAALLIGYHACLGPRLGAGQVPGRLGVTVGLWGVAALLSLPVVL	180
<i>B. indicus</i>	121	Q.....	180
<i>B. taurus</i>	181	GSDTSQGLCTVTFTSGEWETLRYIHAAACFAIFVLLPLGLLGTKGLKTVLGRAPCPWVDVL	240
<i>B. indicus</i>	181		240
<i>B. taurus</i>	241	WVWFIFWVPQGMTLGLDSLVRSKAIVVSTCPAQQALDMLLDVAEALAILHCVATPLLLAW	300
<i>B. indicus</i>	241		300
<i>B. taurus</i>	301	VCYQATHTSPPSLPLPTTQTSHLDTLGSKS	330
<i>B. indicus</i>	301		330

B

<i>Bos taurus</i>	1	MGNCLYPVADDNSTKLAIKEDFLIDFPEDYYPDYNETDVEAAAPCHSCSLNYS	60
<i>Bos indicus</i>	1	L.....	60
<i>Bos taurus</i>	61	LVSILGILASGTILYALLRPLFRWQLYQDRSTLVQLAVGSALFSIVVPILARGLSGALIT	120
<i>Bos indicus</i>	61		120
<i>Bos taurus</i>	121	SLCHLAHLVAYGSFAQAALLIGYHACLGPRLGAGQVPGRLGVTVGLWGVAALLSLPVVL	180
<i>Bos indicus</i>	121		180
<i>Bos taurus</i>	181	GSDTSQGLCTVTFTSGEWETLRYIHAAACFAIFVLLPLGLLGTKGLKTVLGRAPCPWVDVL	240
<i>Bos indicus</i>	181		240
<i>Bos taurus</i>	241	WVWFIFWVPQGMTLGLDSLVRSKAIVVSTCPAQQALDMLLDVAEALAILHCVATPLLLAW	300
<i>Bos indicus</i>	241		300
<i>Bos taurus</i>	301	VCYQATHTSPPSLPLPTTQTSHLDTLGGKS	330
<i>Bos indicus</i>	301	S..	330