

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Obtenção da Proteína Viral 2 do Mogiana Tick Virus Expressa em Sistema Bacteriano para
Desenvolvimento de Ensaio Imunoenzimático para Detecção da Infecção em Bovinos

Larissa Mendes Barroso

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Março – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Obtenção da Proteína Viral 2 do Mogiana Tick Virus Expressa em Sistema Bacteriano para
Desenvolvimento de Ensaio Imunoenzimático para Detecção da Infecção em Bovinos

Larissa Mendes Barroso

Orientador Jonny Yokosawa

Co-orientadora Mayara Garcia Polli

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Março – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Obtenção da Proteína Viral 2 do Mogiana Tick Virus Expressa em Sistema Bacteriano para
Desenvolvimento de Ensaio Imunoenzimático para Detecção da Infecção em Bovinos

Larissa Mendes Barroso

Orientador Jonny Yokosawa

Co-orientadora Mayara Garcia Polli

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior
Coordenador do Curso

Uberlândia - MG
Março - 2022

RESUMO

Carrapatos são ectoparasitas hematófagos pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acari e subordem Ixodida. Apresentam grande longevidade e carregam vírus, protozoários e bactérias por um longo período de tempo. Este trabalho teve como objetivo obter a Proteína Viral 2 (VP2) do Mogiana tick virus (MGTV), em sistema bacteriano, para utilização como antígeno no desenvolvimento de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), para detecção da infecção causada por este vírus em bovinos. A metodologia aplicada visou clonar o gene que codifica a VP2 truncada de MGTV e expressá-la em bactérias. Após sua expressão proteica, utilizou por meios de ensaios analíticos a presença da proteína recombinante, quantificação do preparado proteico e sua avaliação na detecção de anticorpos em amostras de soro bovino, para indicar que o animal esteve em contato com este vírus. Os resultados indicaram reatividade das amostras em ELISA. Porém, as amostras também mostraram reatividade com preparado proteico de um clone bacteriano que não expressava a VP2 do MGTV. Assim, experimentos futuros, tal como o Western Blotting, deverão ser realizados para uma melhor análise da utilização da VP2.

Palavras-chave: carrapatos, vírus, ELISA, MGTV.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1. Carrapatos.....	1
1.2. Vírus transmitidos por carrapatos.....	2
1.3. Testes imunológicos para diagnóstico de doenças infectocontagiosas.....	3
1.4. Expressão de proteínas em bactérias.....	4
1.5. Justificativas.....	4
2.OBJETIVO	5
2.1. Objetivo geral.....	5
2.2. Objetivos Específicos.....	5
3.METODOLOGIA	5
3.1. Clonagem do gene que codifica a Proteína Viral 2 truncada de MGTV.....	5
3.2. Expressão bacteriana da VP2 de MGTV.....	6
3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	6
3.4. Amostra de soro bovino de fazendas do Triângulo Mineiro.....	7
3.5. Ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA).....	7
4.RESULTADOS E DISCUSSÕES	8
4.1. Resultados do SDS-PAGE.....	8
4.2. Resultados ELISA.....	9
5.CONCLUSÕES	12

6.REFERÊNCIAS	12
---------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carrapatos

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Ixodida, que por sua vez compreende três famílias: Argasidae, Nuttalliellidae e Ixodidae (DANTAS-TORRES, 2018). Os carrapatos de todas as espécies requerem o sangue de vertebrados, possuindo significativo grau de especificidade e podendo utilizar uma variedade de hospedeiros, incluindo humanos (MASSARD *et al.*, 2004).

O ciclo de vida dos carrapatos apresenta quatro estágios: ovo, larva, ninfa e adultos, os quais podem ocorrer em um único hospedeiro, como no caso das espécies monoxenas ou em mais de um, as espécies heteroxenas, que se alimentam em hospedeiros diferentes em cada uma das fases do seu desenvolvimento (DENARDI, 2004, OLIVEIRA, 2003, SONENSHINE, 2014). Além disso, durante o seu ciclo biológico, os carrapatos podem sobreviver por longos períodos fora dos hospedeiros, quando ficam expostos as condições ambientais, abrigados, por exemplo entre a vegetação e as fendas no solo (WALKER, 1994).

Características básicas da classe são a ausência de antenas e asas e presença de quelíceras, palpos, quatro pares de pernas e corpo dividido em cefalotórax e abdome. As larvas de carrapatos se diferenciam por apresentarem três pares de pernas, já as ninfas, com quatro pares de pernas, não possuem abertura genital. Os adultos, por sua vez, possuem quatro pares de pernas e abertura genital, apresentando nessa fase dimorfismo sexual. Os ixodídeos possuem escudo dorsal de quitina, por isso são considerados carrapatos de corpo duro, e peças bucais projetadas à frente, diferenciando-os das outras famílias (ANDREOTTI *et al.*, 2016).

Para completar o desenvolvimento e garantir seu sucesso reprodutivo, os carrapatos desenvolveram, ao longo da evolução, estratégias para detectar parâmetros essenciais de estímulos como odor, vibração, aparência visual e temperaturas radiadas (SONENSHINE,

2014). A seleção do local de fixação no hospedeiro, por exemplo, é realizada pelos quimiorreceptores presentes nos palpos e nas quelíceras, estes últimos utilizados para “provar” o hospedeiro. Após perfurar a epiderme e a derme do mesmo com as quelíceras, o hipostômio é introduzido na pele e permanece fixando o carrapato, por meio também da produção e secreção de uma substância proteica denominada cemento, sintetizada pelas glândulas salivares e que tem como função auxiliar na fixação do aparelho bucal. Instalado esse canal de alimentação, começa a ser liberada a saliva do carrapato para o hospedeiro, bem como os fluidos sanguíneos do hospedeiro para os carrapatos (ANDERSON *et al.*, 2008).

O carrapato deste estudo se chama *Rhipicephalus microplus* e apresenta ampla distribuição geográfica e é conhecido popularmente como o carrapato-do-boi. É um carrapato monoxeno e tem os bovinos como principal hospedeiro. Este carrapato proporciona grandes perdas na pecuária mundial, além de ser transmissor dos agentes etiológicos da “tristeza parasitária bovina”, doença causada por bactérias do gênero *Anaplasma* e protozoários do gênero *Babesia*.

1.2. Vírus transmitidos por carrapatos

Os vírus são considerados os agentes infecciosos mais abundantes em todos os domínios da vida, enquanto os invertebrados compreendem a maior parte do reino Animalia. Estudos metagenômicos mostraram que os invertebrados apresentam maior diversidade viral que os vertebrados, e os artrópodes são enormemente afetados (SOUZA, 2019).

Os vírus transmitidos por carrapatos formam um grupo variado, de duas ordens, nove famílias e pelo menos 12 gêneros (PAROLA *et al.*, 2001), sendo que os membros da família *Flaviviridae* estão entre os mais comuns (MARUYAMA *et al.*, 2014). Como exemplos desta família estão os vírus da dengue e da febre amarela.

No Brasil, poucos são os relatos sobre a identificação de vírus em carrapatos. Figueiredo et al. (2017) isolaram o vírus Cacipacoré (CPCV), pertencente ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*, do carrapato da espécie *Amblyomma sculptum* (citada como *Amblyomma cajennense*) coletado de uma capivara doente em Matão, cidade do interior do estado de São Paulo, em 1997. E Maruyama et al. (2014) isolaram outro vírus, denominado Mogiana tick virus (MGTV), de carrapatos *Rhipicephalus microplus* coletados de bovinos das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Posteriormente, o MGTV foi identificado como sendo membro de um grupo de vírus chamado Jingmenvírus geneticamente relacionado com vírus da família *Flaviviridae* (VILLA et al., 2017), que foi descrito em 2014, e detectado em carrapatos da mesma espécie em fazenda da região do Triângulo Mineiro (PASCOAL et al., 2019; QIN, 2014). O grupo Jingmenvírus, dentro da família *Flaviviridae*, foi proposto para esse grupo de vírus (LADNER et al., 2016).

O Jingmen tick virus (JMTV) é um vírus recém descoberto e identificado também em *R. microplus* (QIN, 2014). Sua organização viral é composta por quatro segmentos de RNA, dois deles similares aos genes que codificam proteínas não estruturais de *Flavivirus*. O MGTV compartilha com o JMTV cerca de 97% a 99% de identidade de seus nucleotídeos em todos os segmentos, sugerindo que podem ser da mesma espécie viral (VILLA et al., 2017). A presença do vírus relatada em amostras de carrapato bovinos no Brasil foi de 14%, enquanto na China os primeiros relatos foram de apenas 3,44% (MARUYAMA et al., 2014; QIN, 2014).

1.3. Testes imunológicos para diagnóstico de doenças infectocontagiosas

Existem diversos tipos de testes imunológicos para diagnóstico de doenças infectocontagiosas, alguns deles são os exames de aglutinação, fixação de complemento, ensaios imunoenzimáticos, exames de precipitação, western blotting, entre outros.

Neste trabalho focamos no teste imunológico de ensaios imunoabsorção enzimática (ELISA), cuja metodologia se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. O ELISA é um método imunoenzimático alternativo, cuja técnica permite a análise de amostras de proteínas imobilizadas em poços de microplacas, usando anticorpos específicos e enzimas como marcadores.

1.4. Expressão de proteínas em bactérias

A maioria das proteínas de grande interesse farmacológico é produzida pelos organismos em quantidade limitada. Diante disso e com o advento da engenharia genética, muitas dessas moléculas têm sido expressas em sistemas de cultura celular, para obtê-las em quantidades maiores e assim desenvolver melhores estudos e sua utilização como produto biológico (CARMO, 2010).

Dentre os sistemas de expressão existentes, o que utiliza a bactéria *Escherichia coli* para produção de proteínas heterólogas é um dos mais utilizados, devido ao fato de possuir um genoma bem caracterizado, assim como o seu sistema transcricional e traducional. Além disso, é de fácil manipulação genética, possui rápida taxa de multiplicação e requer baixo custo. Apesar de não realizar algumas modificações pós-traducionais, que muitas vezes são requeridas por proteínas eucarióticas (POROWINSKA, 2013), a *E. coli* é bastante utilizada para expressão e avaliação de antígenos no desenvolvimento de testes imunológicos.

1.5. Justificativa

Apesar de o MGTV e o JMTV terem sido detectados em *R. microplus* e em amostras de soro bovino, pouco se sabe sobre a infecção que causa nesses hospedeiros vertebrados. Neste sentido, a presente pesquisa teve como objetivo realizar a expressão da proteína viral 2 do MGTV com a finalidade de se desenvolver um ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos produzidos pela infecção do MGTV em bovinos. Para a obtenção da VP2, o sistema bacteriano foi escolhido como sistema de expressão por oferecer alto rendimento proteico. O

ensaio possibilitará, inicialmente, realizar o estudo de prevalência da infecção causada pelo MGTV em bovinos e poderá ser estendido, futuramente, para a investigação em outros animais vertebrados, inclusive humanos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Obter a proteína viral 2 (VP2) do Mogiana tick virus (MGTV), em sistema bacteriano, para utilização como antígeno no desenvolvimento de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), para detecção da infecção causada por este vírus em bovinos.

2.2. Objetivo específicos

- Realizar a expressão da VP2 do MGTV em sistema bacteriano
- Analisar a expressão da VP2 por SDS-PAGE
- Avaliar a VP2 recombinante obtida por ELISA utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis
- Avaliar a VP2 recombinante obtida por ELISA utilizando amostras de soro de bovinos de fazendas de Uberlândia – MG e Itumbiara – GO.

3. METODOLOGIA

3.1. Clonagem do gene que codifica a Proteína Viral 2 truncada de MGTV

Removida a região de transmembrana da VP2, a sequência codificante do segmento restante foi sintetizada, inserindo-se a sequência codificante de 6xHis em sua extremidade C-terminal, e clonada em vetor pGEX-4T2, para expressão em sistema bacteriano na forma fusionada com glutathione S-transferase (GST) (GenScript, Piscataway, EUA), formando a proteína GST-VP2. O plasmídeo construído foi utilizado na transformação de *E. coli* cepa BL21

e as células transformadas foram cultivadas em placas com meio LB contendo ampicilina 100 µg/ml. Algumas colônias foram selecionadas para confirmação da presença do DNA plasmidial por meio de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase).

3.2. Expressão bacteriana da VP2 de MGTV

Colônias que se mostraram positivas por PCR foram inoculadas individualmente em 30 mL de meio 2xYT contendo ampicilina 100 µg/mL e incubadas à 37 °C *overnight* (O/N) sob agitação. No dia seguinte, as suspensões foram transferidas para 300 mL de meio 2xYT sem antibióticos, seguindo-se de incubação por 3 h à 37 °C sob agitação. Em seguida, foi adicionado IPTG para concentração final de 1 mM, para induzir a expressão da VP2, e as culturas foram incubadas por mais 3 h à 37 °C sob agitação. As suspensões foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o precipitado armazenado a -20 °C.

Os precipitados foram ressuspensos com 1,6 mL de Tris-HCl 0,065M pH 8 e à suspensão foram adicionados 15 µL fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM e 30 µL de lisozima 10 mg/mL, seguidos de incubação por 10 min à 4 °C. Em seguida, foram realizados quatro ciclos de congelamento, por 5 min à -20 °C, em banho com álcool absoluto, seguido de descongelamento à temperatura ambiente. Após os ciclos de congelamento e descongelamento foram adicionados aos lisados 15 µL de DNase I 2U/ µL e 5 µL de MgCl₂ 0,6 mM, e as misturas foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 min. Os lisados foram centrifugados à 15000 x g por 20 min e tanto o sobrenadante foi transferido para outro microtubo. O precipitado foi lavado com ureia 3 M e, em seguida, solubilizado com ureia 8 M. Após nova centrifugação, o sobrenadante deste solubilizado foi transferido para novo microtubo. Esta etapa foi repetida dez vezes, com os sobrenadantes inicialmente mantidos em tubos diferentes e, após análise, aqueles com a concentração proteica semelhantes, misturadas em um único tubo. Tanto o

sobrenadante do lisado como os sobrenadantes dos solubilizados com ureia 8 M foram submetidos à análise por SDS-PAGE e Bradford.

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteína foi realizada por SDS-PAGE seguindo as instruções de Sambrook and Russel (2001). O SDS-PAGE consistiu em gel de separação 12% acrilamida/bis-acrilamida e de empilhamento 5% acrilamida/bis-acrilamida. Feito isso, 7,5 µL do preparado proteico foram misturados com 2,5 µL de tampão de corrida SS4X (SS4X incompleto e β-mercaptoethanol 1%). A amostra foi incubada à 95 °C por 10 min e, em seguida, 2,5 µL de cada amostra foram colocados em seus respectivos poços do gel. Após a eletroforese, o gel foi corado com Coomassie Blue R-250, em ácido acético: metanol (50:10, v/v) e/ou com nitrato de prata (Thermo SCIENTIFIC, Pierce, Rockford, IL, EUA). A concentração proteica dos preparados foi medida por Bradford (AMRESCO, VWR Life Science, Fountain Parkway, Solon, OH, EUA).

3.4. Amostras de soro bovino de fazendas de Uberlândia-MG e Itumbiara-GO

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia com protocolo nº 001/21.

Foram disponibilizadas 12 amostras de soro bovino da Fazenda Experimental do Glória pertencente a Universidade Federal de Uberlândia, situada no município de Uberlândia, MG e outras 12 amostras de soro bovino da Fazenda Privada Lago Verde, localizada em Itumbiara, GO.

3.5. Ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA)

O teste foi realizado em placa Costar de 96 poços (Corning Inc. Corning, NY, EUA). Os poços foram sensibilizados com 50 µL contendo 0,2 µg do *pool* do preparado proteico contendo GST-VP2 em tampão fosfato/ureia 8 M e incubados por 1 h à 37 °C. Após isso, os poços foram lavados uma vez com PBS-T 0,05% (PBS contendo Tween 20 0,05%) e bloqueados com 75 µL PBS contendo BSA 1% por 1 h à 37 °C. Os poços foram lavados uma vez com PBS-T 0,05% e incubados com 50 µL de amostras de soro bovino diluídas em PBS-T 0,05% + BSA 1% por 1 h à 37 °C. Anticorpo monoclonal anti-6xHis 250 ng/mL, no caso da sensibilização com preparado proteico da GST-VP2, foi utilizado como controle positivo. Em seguida, os poços foram lavados cinco vezes e incubados com 50 µL de anticorpo anti-IgG bovino conjugado com peroxidase diluído em PBS-T 0,05% + BSA 1% por 1 h à 37 °C. No caso do uso de anticorpo monoclonal anti-6xHis, anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase foi utilizado. Os poços foram lavados cinco vezes e incubados com 50 µL de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (1-Step Ultra TMB-ELISA. Pierce Biotechnology) à temperatura ambiente. A reação foi parada com 50 µL de H₂SO₄ 0,18 M e a absorbância foi medida a 450 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados do SDS-PAGE

Após fazer a expressão da VP2 do MGTV, obtida na forma fusionada GST-VP2, realização da lise das células bacterianas e centrifugação do lisado, obtivemos 7 *pellets*. Cada *pellet* foi ressuspenso com ureia 3 M, com o objetivo de remover possíveis proteínas bacterianas presentes no sedimento. Após nova centrifugação, os *pellets* foram solubilizados com ureia 8 M, seguidos de nova centrifugação. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e repetiu-se o passo de solubilização do novo *pellet* formado por mais 9 vezes. Para analisar a expressão da VP2, os sobrenadantes de algumas das repetições da solubilização foram

submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) individualmente (Fig. 1) ou após a realização de *pools* (Fig. 2).

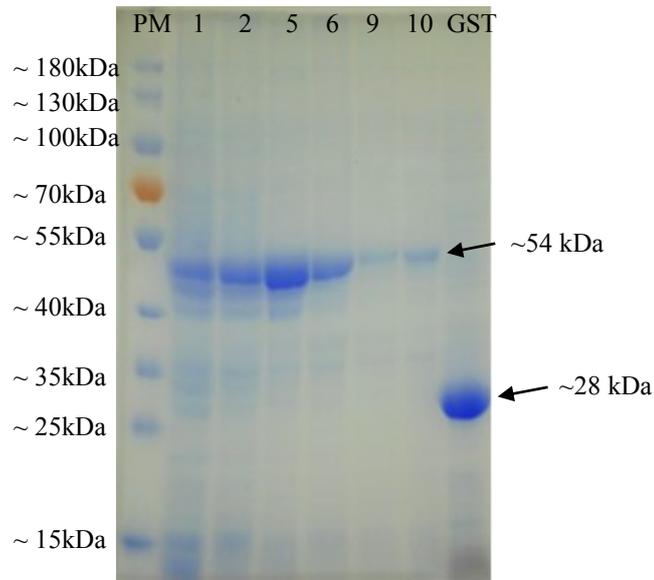


Figura 1: SDS-PAGE utilizando as frações 1, 2, 5, 6, 9 e 10 da solubilização do *pellet* formado após a lise das células bacterianas. As setas superior e inferior indicam, respectivamente, a GST-VP2 e a GST e sua massa molecular.

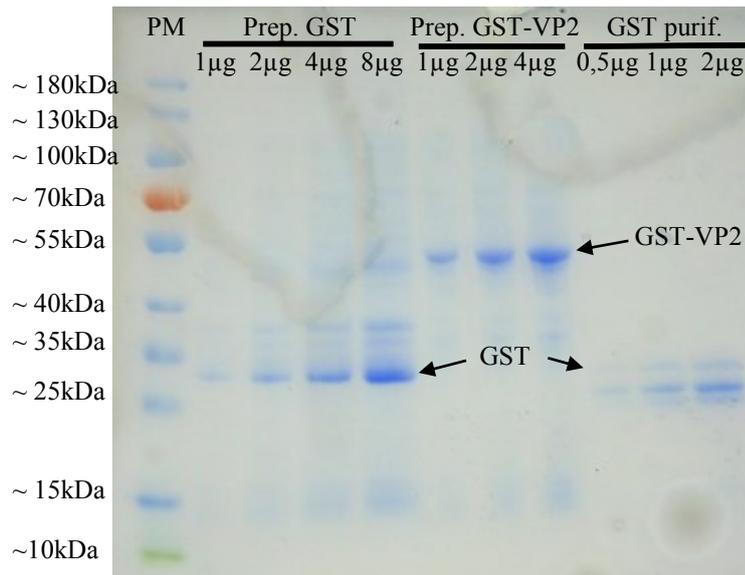


Figura 2: SDS-PAGE utilizando *pools* dos preparados proteicos de GST, GST-VP2 e do purificado de GST nas quantidades indicadas.

4.2 Resultados pré-ELISA

Para analisar a concentração de proteínas de cada solubilização foi utilizado o ensaio de proteína Bradford, o qual é um procedimento analítico espectroscópico rápido e preciso usado para medir a concentração de proteína em uma solução. Ao fazer esse ensaio foi obtido uma média da concentração proteica do *pool* do preparado da GST-VP2 de 4,1 ug/uL.

Em seguida, foi feito um ELISA para testar a sensibilização dos poços da placa com diferentes quantidades de proteína do preparado GST-VP2 utilizando o anticorpo monoclonal anti-6xHis e, assim, obter a melhor quantidade para usarmos na sensibilização. Observando a Fig. 3, houve pouca diferença entre as diferentes quantidades do *pool* do preparado GST-VP2 por poço, assim, optou-se por adotar 0,5 µg/poço para a sensibilização, que é a quantidade recomendada pela fabricante da placa de ELISA.

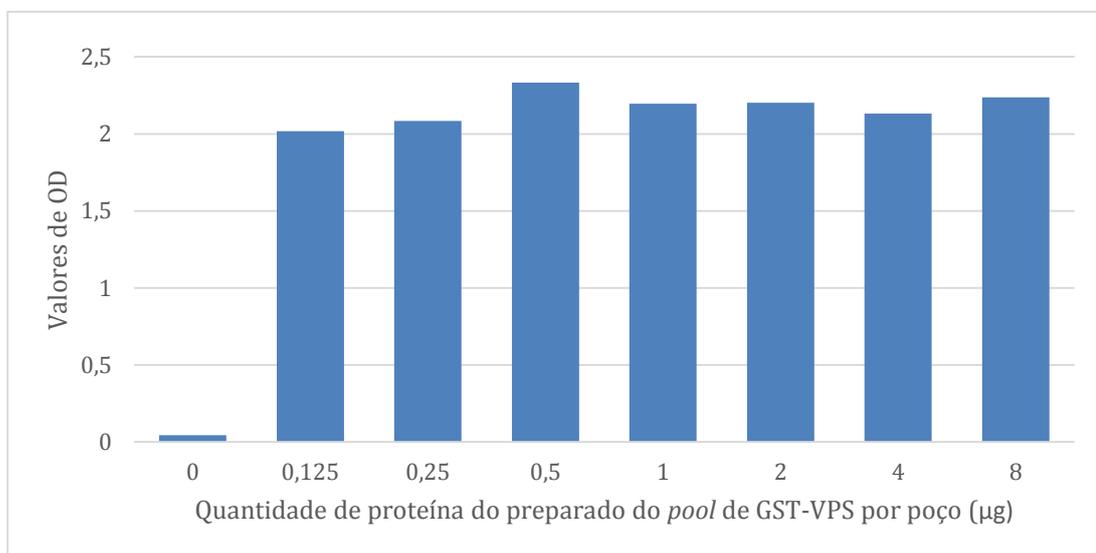


Figura 3: ELISA com diferentes quantidades do *pool* do preparado GST-VP2 utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis.

Determinada a quantidade de proteína do *pool* da GST-VP2 a ser utilizada na sensibilização de cada poço, fizemos um novo ELISA usando amostras de soro bovino das fazendas Glória e Lago Verde e o *pool* do preparado da GST como controle. Entretanto, como visto na Fig. 4, foi observada reatividade tanto para os poços sensibilizados com o preparado

da GST-VP2 quanto para o preparado da GST. É possível que a reatividade observada com o preparado da GST seja o resultado de reação cruzada de anticorpos presentes nas amostras de soro com proteínas bacterianas ainda presentes no preparado proteico e/ou com a própria GST, cuja sequência também está presente na GST-VP2.

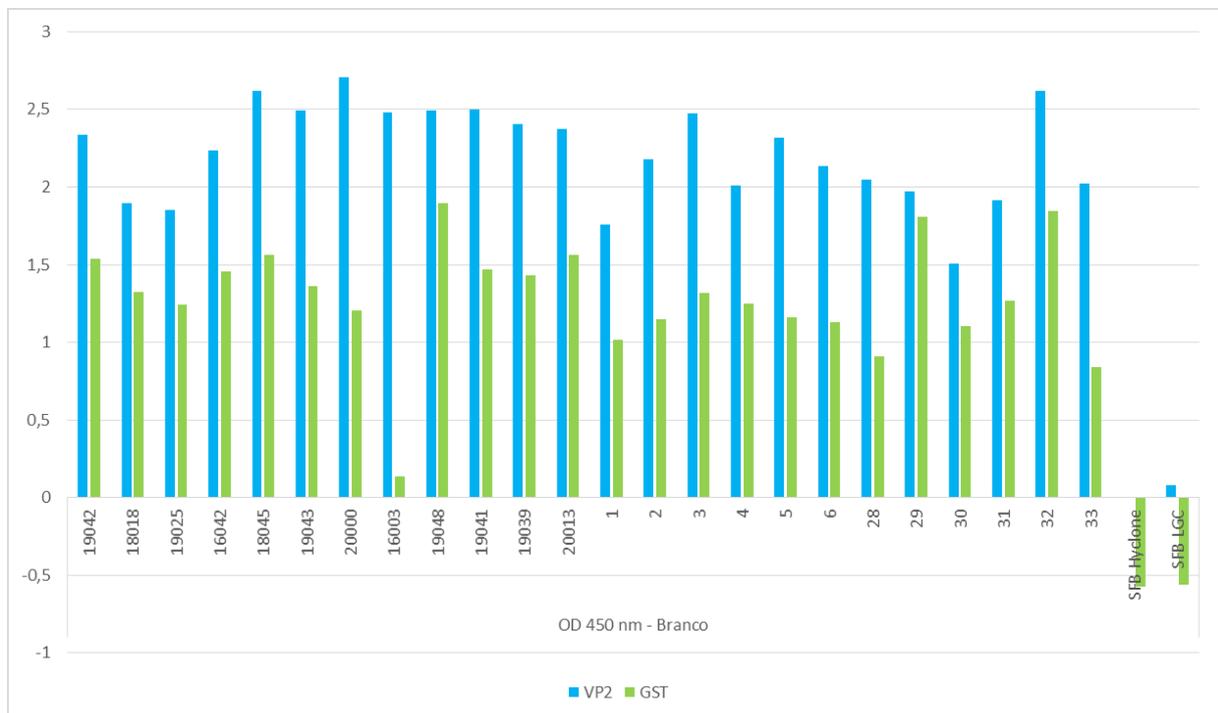


Figura 4: ELISA utilizando amostras de soro bovino da Fazenda Experimental do Glória e da Fazenda Privada Lago Verde. Os números do eixo X indicam as identificações das amostras de soro. Dois soros fetais bovinos obtidos comercialmente foram utilizados com controles negativos.

Lembrando que as amostras 19045, 18018, 19025, 16042, 18045, 19043, 20000, 16003, 19041, 19039 e 20013 pertencem a Fazenda Glória e as amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 28, 29, 30, 31, 32 e 33 pertencem a Fazenda

Com a presença de um fator de reatividade cruzada foi feito um novo ELISA com menos amostras, menor concentração do *pool* da VP2 e diferentes diluições. Mas, na Fig. 5 podemos observar que ainda há a reatividade cruzada entre os *pools* da VP2 e *pool* da GST.

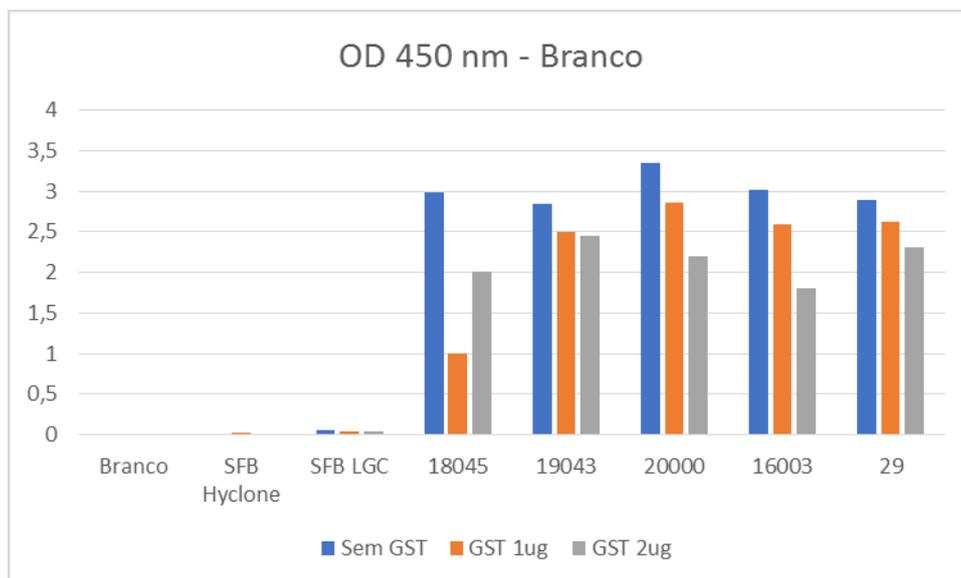


Figura 5: ELISA utilizando quatro amostras de soro bovino da Fazenda Experimental do Glória (18045, 19043, 20000 e 16003); uma amostra da Fazenda Privada Lago Verde.(29); dois soros fetais bovinos (SFB Hyclone e SFB LGC) para controle negativo.

Como foi visto nesse estudo, houve a presença da proteína recombinante VP2 na análise feita por SDS-PAGE, onde a banda dessa proteína possui o peso de 54 kDa. Entretanto, ao fazer o pré-ELISA com a finalidade de definir quais são as melhores concentrações e diluições para sensibilizar a placa, quantidade de bloqueio, conjugados e antígenos, houve complicações.

O ELISA feito com VP2 e GST apresentou reação cruzada, onde o anticorpo se liga em um antígeno para o qual não foi especificamente produzido, pois eles possuem epítomos similares. Assim, há a necessidade de técnicas mais específicas, como o Western Blotting, para entendermos o que houve e se estamos no caminho certo para detectar a infecção em soros bovinos por meio do ELISA.

5. CONCLUSÃO

Com o sistema bacteriano de proteínas heterólogas, obtivemos a expressão da GST-VP2 em boa quantidade. O preparado proteico obtido foi utilizado em ELISA, mas os resultados parecem indicar reatividade cruzada tanto com as proteínas bacterianas presentes no preparado

quanto com a própria GST do vetor de expressão utilizado. Assim, outros experimentos deverão ser realizados para permitir a utilização da GST-VP2 no ensaio para a detecção da infecção por MGTV em bovinos, incluindo a purificação da GST-VP2, para eliminação de proteínas bacterianas do preparado, a remoção da sequência da GST por proteases e o incremento da quantidade do preparado de GST ao se diluir as amostras de soro no ensaio.

6. REFERÊNCIAS

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of ticks. **Infectious disease clinics of North America**, v. 22, n. 2, p. 195–215, v, jun. 2008.

ANDREOTTI, R. et.al. CARRAPATOS: **Protocolos e técnicas para estudo**. Brasília: Embrapa, 2016.

CARMO, E. J. **Clonagem e expressão regulada do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris***. 115p. 2010. Dissertação de Mestrado – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 2010.

DANTAS-TORRES, F. **Species concepts: What about ticks? Trends Parasitology**. DOI: 10.1016/j.pt.2018.09.009, 2018.

DENARDI, S. E. et al. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 379–395, 2004.

FIGUEIREDO, G. G. DE; AMARILLA, A. A.; SOUZA, W. M. DE; FUMAGALLI, M. J.; FIGUEIREDO, M. L. G. DE; SZABÓ, M. P. J.; BADRA, S. J.; SETOH, Y. X.; KHROMYKH, A. A.; AQUINO, V. H.; FIGUEIREDO, L. T. M. Genetic characterization of Cacipacoré virus from ticks collected in São Paulo State, Brazil. **Archives of Virology**, v. 162, n. 6, p. 1783–1786, 2017.

LADNER, J. T.; WILEY, M. R.; BEITZEL, B.; AUGUSTE, A. J.; et al. A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes. **Cell host & microbe**, 2016.

MARUYAMA, S.R.; CASTRO-JORGE, L.A.; RIBEIRO, J.M.C.; et al., 2014. Characterisation of divergent Flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in *Rhipicephalus microplus* ticks from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 109 (1):38-50.

MASSARD, C.; FONSECA, A., 2004. Carrapatos e doenças transmitidas, comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, 137:15-23.

OLIVEIRA, P. R. et al. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 4, p. 412–416, 2003.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 897–928, 2001.

PASCOAL, J. DE O.; SIQUEIRA, S. M. DE; MAIA, R. DA C.; JUAN SZABÓ, M. P.; YOKOSAWA, J. Detection and molecular characterization of Mogiana tick virus (MGTV) in *Rhipicephalus microplus* collected from cattle in a savannah area, Uberlândia, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 1, p. 162–165, 2019.

POROWINSKA, D. et al. Prokaryotic expression system. **Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (online)**, v. 67, p. 119-129, 2013.

QIN, X. C. et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 18, p. 6744–6749, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**. A laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SMITH, Donald B.; JOHNSON, Kevin S. **Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase**. Gene, 1988.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks (vol. 1 e 2)**. New York: Oxford University Press, 2014.

SOUZA, A. F. **Aplicação simultânea de macerado de carrapato em cultura de células, extração de DNA e RNA, para detecção de microrganismos**. Monografia. Universidade Federal de Uberlândia. 2019.

VIBANCO-PÉREZ, Noberto; JIMÉNEZ, Lucía; LANDA, Marie T. Merchant and Abraham. **Characterization of Glutathione S-Transferase of *Taenia solium***. The Journal of Parasitology, 1999.

VILLA, E. C.; MARUYAMA, S. R.; MIRANDA-SANTOS, I. K. F. DE; PALACIOS, G.; LADNER, J. T. **Complete coding genome Sequence for mogiana tick virus, a jingmenvirus isolated from ticks in Brazil**. Genome Announcements, v. 5, n. 18, p. 17–18, 2017.

WALKER, Alan R. **Arthropods of humans and domestic animals: a guide to preliminary identification**. Springer Science & Business Media, 1994.

WALKER, John; CROWLEY, Paul; MOREMAN, Alun D.; BARRET, John. **Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum***. Molecular and Biochemical Parasitology, 1993.