

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE DOUTORADO

CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES  
Bm86-CG E RmLTI DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*  
EXPRESSAS POR *Pichia pastoris* COMO IMUNÓGENOS

Rodrigo Casquero Cunha

CAMPO GRANDE, MS  
2013

|      |  |                                                                                                                                                                      |  |       |
|------|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------|
| 2013 |  | CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES BM86-CG E<br>RMILT DE <i>RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS</i> EXPRESSAS<br>POR <i>PICCHIA PASTORIS</i> COMO IMUNÓGENOS |  | CUNHA |
|------|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------|

*Lombada*

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**  
**CURSO DE DOUTORADO**

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES**  
**Bm86-CG E RmLTI DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***  
**EXPRESSAS POR *Pichia pastoris* COMO IMUNÓGENOS**

Characterization of Bm86-CG and RmLTI recombinant proteins from  
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expressed by *Pichia pastoris* as  
immunogens

**Rodrigo Casquero Cunha**

**Orientador: Dr. Renato Andreotti e Silva**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Mato Grosso do Sul, como  
requisito à obtenção do título de Doutor  
em Ciência Animal.  
Área concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2013

**RODRIGO CASQUERO CUNHA**

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Bm86-CG  
E RmLTI DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* EXPRESSAS POR  
*Pichia pastoris* COMO IMUNÓGENOS**

Characterization of Bm86-CG and RmLTI recombinant proteins from *Rhipicephalus*  
(*Boophilus*) *microplus* expressed by *Pichia pastoris* as immunogens

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Mato Grosso do Sul, como requisito à  
obtenção do título de Doutor em Ciência  
Animal.

Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado (a) em: 06/11/2013

**EXAMINADOR**

Prof Dr. Renato Andreotti e Silva

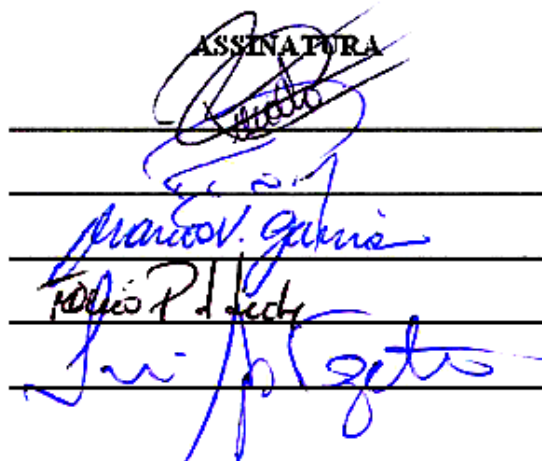
Prof Dr. Fernando Paiva

Prof Dr. Marcos Valério Garcia

Prof Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Prof. Dra. Ines Aparecida Tozetti

ASSINATURA



The block contains four horizontal lines, each with a handwritten signature in blue ink. The signatures are: 1. A signature that appears to be 'Rodrigo Casquero Cunha'. 2. A signature that appears to be 'Renato Andreotti e Silva'. 3. A signature that appears to be 'Fábio Pereira Leivas Leite'. 4. A signature that appears to be 'Ines Aparecida Tozetti'.

À minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo, agradeço a Deus por tudo o que tem proporcionado em minha vida.

Agradeço à minha esposa por ter me acompanhado todos estes anos de estudo, me dando forças e abdicando de muitas coisas para estar ao meu lado. Desde quando éramos graduandos até este momento que é tão importante para nossas vidas.

Agradeço aos meus pais por terem me ensinado a ser um homem digno e ético e por terem sempre me apoiado em minhas escolhas.

Aos meus irmãos, fontes da minha energia, em especial ao Mário Rogério (Bebê), pelo tempo que estivemos juntos. Jamais te esquecerei meu irmão.

Ao meu tio Zeferino Sampáio Gomes, quem me “ensinou a ler” e sempre acreditou em mim. Você foi o avô que eu não tive. Obrigado pelos conselhos. Estás sempre em meus pensamentos.

Ao meu primeiro orientador, Prof. Dr. Carlos Gil-Turnes, aquele que disse “prestem atenção neste guri... ele vai longe”. Obrigado professor.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Bacteriologia do CENBIOT, onde tive minha iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Fábio Leivas Leite, quem me adotou e como um pai me deixou seguir meu rumo. Obrigado pela amizade e cumplicidade.

Ao meu orientador Dr. Renato Andreotti, por ter me recebido, orientado e dado suporte estes quase cinco anos de pós-graduação. Obrigado pela sua dedicação.

Ao meu amigo, Dr. Alexandre Leitão, quem tenho certeza que está muito feliz por esta minha conquista. Muito obrigado por seus ensinamentos.

Ao Dr. Afonso Basto pela sua paciência e por tudo o que me ensinou.

Ao Eduardo Marcelino e à Rita Cardoso pelos bons momentos de descontração. Também aprendi muito com vocês.

Aos meus colegas de laboratório, Tayra Sato, Mariana Soares, Bruno Grecco, Alceu Gonçalves, André Aguirre, Leandra Oshiro, Marlon Cominetti, Robson Almeida, Bárbara Csordas e Jacqueline Barros, pela ajuda e por tornarem meu trabalho mais divertido.

E por último, mas não menos importante, ao Dr. Marcos Garcia, por toda a sua paciência e seus ensinamentos. Obrigado pelo seu companheirismo e pela sua alegria.

Obrigado.

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

*Albert Einstein.*

## Resumo

CUNHA, R.C. Caracterização das proteínas recombinantes Bm86-CG e RmLTI de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expressas por *Pichia pastoris* como imunógenos. 2013. 115 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o ectoparasita economicamente mais importante para o gado a nível mundial. Vacinas contra o carrapato representam uma tecnologia que pode ser combinada aos acaricidas em programas de controle integrado para diminuir o impacto de *R. (B.) microplus*. Para se estimar uma imunoproteção das vacinas contra este ectoparasita, um cálculo bastante utilizado é o de porcentagem de eficácia (%E). Este trabalho teve o objetivo de desenvolver imunógenos eficazes para o controle deste ectoparasita e discutir qual a melhor forma de se estabelecer o cálculo de %E. Para isso, as proteínas Bm86-CG e RmLTI, assim como porções conservadas destas associadas entre si e com um peptídeo estimulador de linfócitos Th, foram clonadas e expressas por *Pichia pastoris*. As %E das proteínas rBm86-CG e rRmLTI foram testadas em bovinos estabulados. Para a discussão de qual a melhor forma de se calcular a %E das vacinas contra carrapatos que infestam bovinos, 25 trabalhos tiveram suas variáveis analisadas, sendo que 16 consideraram os efeitos da vacina no número de teleóginas (CRT), na postura (CRO) e na fertilidade (CRF), 7 desconsideraram CRO e um considerou apenas CRO para o cálculo. Quanto a vacinação com rBm86-CG, a %E alcançada foi de 31%. Valor semelhante, de 32%, também foi encontrado para a %E da vacinação com rRmLTI. Após a revisão, assume-se que a fórmula de %E que melhor representa a imunoproteção de uma vacina é a mais completa:  $\%E = 100[1-(CRT \times CRO \times CRF)]$ . As proteínas quiméricas rBmCG-Th, rRmLTI-Th e rRmLTI-CG-Th, desenvolvidas para aumentarem a imunidade humoral adquirida contra estes antígenos, foram caracterizadas apenas por *Western blotting*, porém mostraram que são imunogênicas. Pelos resultados obtidos, conclui-se que, apesar das %E encontradas para ambos os antígenos serem baixas, pesquisas para melhorar esta ferramenta de controle estão no rumo certo e isso não exclui a possibilidade destes imunógenos serem utilizados na composição de uma vacina polivalente, como parte de um programa integrado para o controle de *R. (B.) microplus*.

Palavras-Chave: vacina, carrapatos, bovinos, Bm86-CG e RmLTI.



## Abstract

CUNHA, R.C. Characterization of Bm86-CG and RmLTI recombinant proteins from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expressed by *Pichia pastoris* as immunogens. 2013. 115 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is the most economically important ectoparasite for cattle worldwide. Tick vaccines represent a technology that can be combined to acaricides in integrated control programs to reduce the impact of *R. (B.) microplus*. To esteem the immunoprotection of vaccines against this ectoparasite, a calculation commonly used is the percentage of efficacy (%E). This study aimed to develop effective immunogens for the control of this ectoparasite and discuss which is the best way to determine the %E. For this proposal, proteins BmCG and RmLTI, as well as conserved portions of these proteins associated among themselves and with a Th-cells stimulator peptide, were cloned and expressed by *Pichia pastoris*. The %E of rBm86-CG and rRmLTI were tested in a cattle stall test. For discussion of how to best calculate the %E of vaccines against ticks infesting cattle, 25 papers were analysed, and 16 considered the effects of the vaccine in the number of ticks (CRT), posture (CRO) and fertility (CRF), 7 did not consider CRO and only 1 considered CRO to calculation. The vaccination with rBm86-GC achieved 31% of %E. Similar value of 32% was also found for the %E of the vaccination with rRmLTI. After review, we assumed that the formula of %E that best represents the immunoprotection of a vaccine is the most complete one:  $\%E = 100[1-(CRT \times CRO \times CRF)]$ . The chimeric proteins rBmCG-Th, rRmLTI-Th and rRmLTI-CG-Th, developed to increase the acquired humoral immunity against these antigens, were characterized under Western blotting only, but shown that these proteins are immunogenic. From the results obtained, we can conclude that, despite the low %E found for both antigens, research to improve this control tool is in the right direction and this does not exclude the possibility that these immunogens may be used in the composition of a polyvalent vaccine as part of an integrated program for the control of *R. (B.) microplus*.

Keywords: vaccine, ticks, bovines, Bm86-CG and RmLTI.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                      | 10 |
| 1. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....                                                                                                   | 10 |
| 2. Vacinas contra o “carrapato do boi” .....                                                                                                          | 16 |
| 3. Bm86-CG .....                                                                                                                                      | 21 |
| 4. RmLTI.....                                                                                                                                         | 23 |
| 5. <i>Pichia pastoris</i> .....                                                                                                                       | 26 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                     | 28 |
| IMUNOPROTEÇÃO DE BOVINOS CONTRA <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> COM ANTÍGENO RECOMBINANTE BM86-CAMPO GRANDE .....                          | 38 |
| Resumo.....                                                                                                                                           | 38 |
| Introdução .....                                                                                                                                      | 39 |
| Material e métodos.....                                                                                                                               | 41 |
| Resultados .....                                                                                                                                      | 47 |
| Discussão.....                                                                                                                                        | 48 |
| Agradecimentos.....                                                                                                                                   | 51 |
| Referências.....                                                                                                                                      | 51 |
| FIGURAS E TABELAS .....                                                                                                                               | 54 |
| IMUNOPROTEÇÃO CONTRA A INFESTAÇÃO DE CARRAPATOS EM BOVINOS VACINADOS COM UM INIBIDOR DE TRIPSINA RECOMBINANTE DE <i>Rhipicephalus microplus</i> ..... | 57 |
| Resumo.....                                                                                                                                           | 57 |
| 1. Introdução .....                                                                                                                                   | 58 |
| 2. Material e métodos.....                                                                                                                            | 59 |
| 3. Resultados .....                                                                                                                                   | 62 |
| 4. Discussão.....                                                                                                                                     | 64 |
| Agradecimentos.....                                                                                                                                   | 67 |
| Referências.....                                                                                                                                      | 68 |
| FIGURAS E TABELAS .....                                                                                                                               | 73 |
| CÁLCULO DE EFICÁCIA DE VACINAS CONTRA A INFESTAÇÃO DE CARRAPATOS NOS BOVINOS.....                                                                     | 79 |
| Resumo.....                                                                                                                                           | 79 |
| Introdução .....                                                                                                                                      | 80 |

|                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Material e métodos.....                                                                                                             | 81  |
| Resultados .....                                                                                                                    | 82  |
| Discussão.....                                                                                                                      | 85  |
| Referências.....                                                                                                                    | 90  |
| TABELA .....                                                                                                                        | 94  |
| IMUNÓGENOS RECOMBINANTES DE <i>R. (B.) microplus</i> EXPRESSOS ASSOCIADOS A UM<br>EPÍTOPO ESTIMULADOR DE CÉLULAS T AUXILIARES ..... | 95  |
| Resumo.....                                                                                                                         | 95  |
| 1. Introdução .....                                                                                                                 | 96  |
| 2. Material e Métodos.....                                                                                                          | 97  |
| 3. Resultados e discussão .....                                                                                                     | 101 |
| Agradecimentos.....                                                                                                                 | 104 |
| Referências.....                                                                                                                    | 105 |
| FIGURAS.....                                                                                                                        | 107 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                                                                                           | 112 |

## INTRODUÇÃO

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um dos ectoparasitas que causam maior impacto econômico, levando a grandes perdas para a bovinocultura, seja de maneira direta, pelos efeitos da picada: irritabilidade, perda de sangue, perda de peso, diminuição na produção de leite, predisposição à miíases, danos no couro e transmissão de agentes parasitários e infecciosos; como de maneira indireta: custo com o controle químico e resíduos deixados nos subprodutos e no ambiente; gerando grandes prejuízos a pecuária no Brasil (HORN, 1983; GOMES, 1998; 2001).

Os rebanhos leiteiros no Brasil são, em sua maioria, estabelecidos em raças europeias ou mestiças, já os rebanhos de gado de corte, apesar da menor presença de raças europeias, têm tido um aumento no uso destas nos cruzamentos industriais ao longo do tempo (GOMES, 1995). Desta forma, considerando que estas raças são mais suscetíveis à infestação por carrapato, é clara a necessidade do estabelecimento de um método de controle sistemático do carrapato (GOMES, 1995) e, para isso, é imprescindível a busca e proposição de novas ferramentas de controle.

Há uma busca mundial por novas alternativas de controle do carrapato, sendo que, o controle por meio de vacinas, tem sido o foco principal de muitos grupos de pesquisa. No Brasil, o uso de vacinas para o controle do carrapato associado ao controle químico e rotação de pastagem poderia abrir possibilidades para o controle integrado mais efetivo, diminuindo o problema com resíduos no ambiente e o desenvolvimento do fenômeno de resistência.

### 1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

*R. (B.) microplus* ou “carrapato do boi” é um ácaro hematófago, presente em regiões tropicais e subtropicais (WILLADSEN; JONGEJAN, 1999). Primeiramente foi classificado dentro do gênero *Boophilus* (do grego: “amigo do boi”), designação introduzida em 1891 por Curtice, que hoje é aceita como subgênero. Apresenta-se como um importante vetor de arboviroses, rickettsioses, espiroquetoses e protozooses para o homem e animais domésticos (KAUFMAN, 1989; PATARROYO, 1994). Para a pecuária bovina brasileira, os agentes transmitidos por este carrapato que causam maior impacto são rickettsias do gênero *Anaplasma* e protozoários do gênero *Babesia*, responsáveis pelo complexo conhecido como “tristeza parasitária bovina” (TPB) (KAUFMAN, 1989; PATARROYO, 1994).

Segundo a classificação do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – ID: 6941), *R. (Boophilus) microplus* pertence ao Reino Metazoa, Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Superordem Parasitiformes, Orden Ixodida, Superfamília Ixodoidea, Família Ixodidae, Subfamília Rhipicephalinae, Gênero *Rhipicephalus*, Subgênero *Boophilus*, Espécie *R. (B.) microplus*.

*R. (B.) microplus* teve origem asiática, mais precisamente na Índia e Ilha de Java, e sua introdução nas regiões tropicais e subtropicais, como, por exemplo, Austrália, México, América Central, América do Sul e África, ocorreu em função das históricas expedições exploratórias, que movimentavam animais e mercadorias, contribuindo para o estabelecimento desta espécie dentro da região demarcada pelos paralelos 32° Norte e 32° Sul, com alguns focos no 35° Sul (NUÑES et al., 1982). No estado do Mato Grosso do Sul, a provável causa de sua introdução seria pela vinda de animais comprados do Chile, no início do século XVIII, via estado do Rio Grande do Sul (KESSLER; SHENK, 1998).

*R. (B.) microplus* é um parasita monoxeno, ou seja, depende de apenas um hospedeiro em seu ciclo de vida. Tem predileção pelos bovinos, porém, outras espécies também podem servir como hospedeiros, como por exemplo: búfalos, cavalos, asininos, ovinos, caprinos, caninos, felinos, suínos, coelhos, cervídeos, onças, preguiças, cangurus e outros animais selvagens (ARTHUR, 1960). O carrapato do boi tem seu ciclo de vida dividido em duas fases dependentes: a fase de vida parasitária, que ocorre no hospedeiro; e a fase não parasitária ou de vida livre, que ocorre no solo (FURLONG, 2005).

A fase parasitária do *R. (B.) microplus* acontece sobre o hospedeiro e tem início na subida e fixação da larva, terminando com a queda da teleógina ingurgitada. Durante este período, os carrapatos estão protegidos das variações climáticas (RIEK, 1965), localizando-se nas regiões da pele onde a temperatura é de 31°C a 38°C (DOUBLE; KEMP, 1979). As larvas infestantes, ao entrarem em contato com o bovino, fixam-se em regiões do corpo do hospedeiro que favorecem seu desenvolvimento, tais como: úbere, mamas e regiões perineal, perianal, vulvar e entrepernas. Essas localizações preferenciais de fixação são determinadas em função da espessura, vascularização e temperatura da pele, bem como pela dificuldade de acesso do grooming do hospedeiro (WAGLAND, 1978). Apesar disso, as larvas sofrem com o grooming, que ocorre em consequência da irritação causada pelas picadas, e com a resposta inflamatória ao redor do local de fixação, com infiltração de células inflamatórias, diminuindo a eficiência da alimentação (FURLONG, 2005). Em função disso e, também, da resistência

genética do bovino, grande parte das larvas pode ser eliminada, contribuindo significativamente para a diminuição de carrapatos no ambiente (FURLONG, 2005).

A principal fonte de alimentação para as larvas de *R. (B.) microplus* é o plasma. Após a alimentação, a larva muda duas vezes, tornando-se ninfa e adulto. O sangue torna-se o principal constituinte alimentar logo antes do rápido ingurgitamento das ninfas e das fêmeas (BENNETT, 1974). Os carrapatos adultos machos atingem a maturidade sexual após a alimentação e, a partir do 17º dia após a infestação, fêmeas e machos acasalam sobre o bovino. Imediatamente ocorre o rápido ingurgitamento das fêmeas com sangue, o que precede a queda da teleógina (LONDT; ARTHUR, 1975). Estas fêmeas são consideradas “máquinas de condensar sangue”, uma vez que, tendo ingerido o sangue, separam a parte sólida – células vermelhas, células brancas e plaquetas; da parte líquida (plasma), que é devolvida no local da fixação na forma de saliva (FURLONG, 2005). A ingestão nos seis primeiros dias de fixação da fêmea é tão pouco como aproximadamente 3,8 µL de sangue, porém, 12h a 24h antes da sua queda, esta ingestão atinge valores de 300–500 µL (TATCHELL et al., 1972), chegando a aumentar o seu peso em até 200 vezes (KEMP et al., 1982). Toda esta matéria-prima será utilizada na formação dos ovos. Uma vez repletas, as teleóginas se desprendem, o que ocorre, preferencialmente, nas primeiras horas da manhã (FURLONG, 2005). O peso das teleóginas, assim como, o tempo de duração do ciclo de vida do carrapato, é influenciado diretamente pelo grau de resistência do hospedeiro (ROBERTS, 1968; HEWETSON, 1972; GUARAGNA et al., 1992).

A fase de vida livre do *R. (B.) microplus*, na qual este carrapato não depende da presença do hospedeiro, inicia quando a teleógina se desprende do bovino e cai ao solo, terminando quando a larva sobe no hospedeiro. Em condições favoráveis, esta fase dura aproximadamente 32 dias (GONZALES, 1995). Durante este período, o carrapato alimenta-se exclusivamente de suas reservas (FARIAS, 1995). Uma vez no chão, a teleógina procura por umidade e abrigo do sol, começando, então, a digerir os componentes do sangue para produzir energia e matéria-prima para a produção dos ovos (FURLONG, 2005). A teleógina inicia a postura aproximadamente três dias após sua queda ao solo, com período de postura em torno de 15 dias, morrendo logo após. Normalmente, esses ovos são colocados em fendas ou detritos, ou sob pedras. O peso total dos ovos após o término da postura equivale a 52% do peso vivo da teleógina, sendo que, cada fêmea coloca cerca de 3.000 ovos (SONENSHIME, 1993).

Na região do Brasil-Central, estes ovos podem permanecer no solo desenvolvendo-se e originando larvas durante 60 dias (nos meses quentes e úmidos) até 120 dias (nos meses frios e secos). Estas larvas, conhecidas popularmente como “micuins”, permanecem próximo das cascas por até seis dias após a eclosão esperando pelo endurecimento da cutícula (FURLONG, 2005). Após este período, a larva está pronta para subir nas pastagens por geotropismo negativo, estimulada por odor, vibrações, sombreamento, estímulo visual e diferenças no gradiente de concentração de CO<sub>2</sub> do hospedeiro (SONENSHIME, 1993). As larvas de *R. (B.) microplus* são vulneráveis a baixas temperaturas, no entanto, em presença de alta umidade relativa, as larvas podem sobreviver por até oito meses (HITCHCOCK, 1955).

O carrapato *R. (B.) microplus* causa prejuízos diretos e indiretos à produção de bovinos. Os prejuízos diretos são determinados por vários motivos, dentre os principais, citam-se: a ingestão de sangue durante sua alimentação comprometendo a produção de carne e leite em diferentes níveis; a inoculação de toxinas no hospedeiro promovendo diversas alterações e consequências fisiológicas, como inapetência; a transmissão de agentes patogênicos como espécies dos gêneros *Anaplasma* e *Babesia*, responsáveis pela TPB; e a redução da qualidade do couro do animal, devido às cicatrizes irreversíveis ocasionadas durante o repasto do artrópode, que são verificadas por ocasião de seu beneficiamento no curtume (GOMES, 1998; 2001). Os prejuízos indiretos são resultantes dos custos da mão-de-obra necessária para o seu controle, assim como, das demais despesas com construção e manutenção de banheiros, compra de equipamentos, aquisição de carrapaticidas, entre outros gastos (GOMES, 2001), além dos danos causados pelos resíduos deixados nos produtos de origem animal e os danos ambientais decorrentes do uso desses produtos (HORN, 1983; GOMES, 2001). Foi estimado que uma infestação média de 40 carrapatos *Amblyomma americanum* pode causar perda na produção de \$ 40,00 por bovino (ERVIN et al., 1987). Um estudo realizado no Brasil estimou que o prejuízo causado pelo *R. (B.) microplus* à pecuária brasileira superava dois bilhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2002). Há quase duas décadas, a nível mundial, a estimativa era que estes valores pudessem alcançar sete bilhões de dólares anualmente (DE CASTRO, 1997). O custo operacional efetivo (COE) do banho carrapaticida para diferentes técnicas – usual, pulverizador costal manual, câmara atomizadora e pulverizador estacionário motorizado; obtido pela soma de custos com mão de obra e produto carrapaticida, pode ter apresentado aumento real em mais de 100% nas últimas 3 décadas (RODRIGUES et al., 2013).

Há mais de duas décadas que o controle do “carrapato do boi” com produtos químicos vem se tornando cada vez mais difícil pela seleção de populações de carrapatos resistentes às diversas gerações de acaricidas. As consequências diretas do desenvolvimento destes carrapatos decorrem na utilização mais frequente e de carrapaticidas cada vez mais concentrados, agravando cada vez mais a contaminação do ambiente e dos produtos alimentícios derivados de bovinos e elevando os custos do controle e, conseqüentemente, da produção pecuária (NOLAN et al., 1989).

Hoje, o controle de *R. (B.) microplus*, principal espécie de carrapato que compromete a produtividade da pecuária bovina, ainda é um grande problema para o sistema produtivo de bovinos no Brasil, principalmente, devido ao surgimento da resistência aos diferentes princípios, limitando o sucesso do seu principal método de controle, o químico (OLIVEIRA et al., 2013).

O controle alternativo do carrapato vem sendo estimulado apesar de sua resposta ainda pouco expressiva. Os métodos são os mais variados: seleção de bovinos resistentes aos carrapatos (TEODORO et al., 2004); rotação de pastagens (ELDER et al., 1980); cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das larvas (SUTHERST et al., 1982); manejo de predadores naturais, como *Egretta ibis* – ou garça-vaqueira (ALVES-BRANCO et al., 1983), e formigas (GONZALES, 1995); utilização de patógenos como o fungo *Beauveria bassiana* (CORDOVÉS, 1997) e a bactéria *Cedecea lapagei* (BRUM, 1988); e fitoterápicos (ANDREOTTI et al. 2013).

O controle químico é o mais amplamente utilizado no combate ao carrapato do boi. Os carrapaticidas podem ser aplicados por aspersão, por banho em solução aquosa, no dorso (*pour on*), por injeção ou por bolos gástricos (ANDREOTTI et al., 2002). Os princípios ativos mais utilizados têm sido os derivados de piretróides, ivermectinas e benzoil fenil uréia (VAZ JÚNIOR, 1997), sendo que para todos já existem registros de populações de carrapatos resistentes (OLIVEIRA et al., 2013). Os piretróides apresentam registro de resistência desde 1989 (ALVES-BRANCO et al., 1992).

A utilização de carrapaticidas de maneira extensiva e sem orientação técnica, além de elevar o custo da produção, promove a seleção de linhagens de carrapatos geneticamente resistentes, que torna mais difícil o controle do parasita, aumentando o custo do tratamento. A resistência dos carrapatos aos princípios ativos vem sendo desenvolvida de forma intensa, comprometendo o uso de certas moléculas no manejo do controle de carrapato em determinadas regiões (ANDREOTTI et al. 2002).



No Brasil, nas áreas mais favoráveis, a população de *R. (B.) microplus* produz quatro gerações a cada ano, enquanto que, em regiões como o Rio Grande do Sul, produz apenas três gerações. Apesar disso, ainda não existe uma política oficial de controle deste parasita, levando os produtores a adotarem práticas de controle individuais, promovendo uma prática diversificada de medidas de controle e contribuindo substancialmente para o desenvolvimento de populações de carrapatos do boi resistentes aos poucos grupos ou famílias de produtos carrapaticidas existentes (NOLAN, 1994; MARTINS et al., 1995).

É cada vez mais comum encontrar situações no campo em que não há mais base química capaz de controlar as populações de carrapatos dentro dos limiares econômicos preconizados. Uma vez instalada a resistência a um grupo químico ou família de carrapaticidas numa população de carrapatos, pouco se pode fazer para contorná-la (FURLONG, et al., 2007).

A observação de que o número de carrapatos que se desenvolvem em raças zebuínas é menor do que em raças europeias indicou ser possível desenvolver raças resistentes. Esta resistência está associada ao sistema imunológico dos hospedeiros, já que, em uma primeira infestação, o número de carrapatos que completa o ciclo é semelhante em todas as raças (HEWETSON, 1972; MATTIOLI et al., 1993; GHOSH et al., 1999). A principal dificuldade para estes avanços é a enorme dificuldade em selecionar animais resistentes sem que haja perda de características de produção, fazendo com que esta abordagem para o controle do *R. (B.) microplus* não seja alcançada a curto ou médio prazo (FURLONG, 2005). Esta resistência manifesta-se por diminuição no número e no tamanho dos carrapatos e pode ser transmitida de um animal para outro pela transferência de soro e linfócitos (ROBERTS; KERR, 1976; WIKEL et al., 1996). A demonstração de que drogas imunossupressoras eliminam esta resistência reafirmou a natureza imune desta resposta (BERGMAN et al., 2000).

As vacinas surgem neste contexto como uma ferramenta alternativa para o controle do carrapato, podendo ser utilizadas em associação com o controle químico, diminuindo o número de aplicações dos acaricidas e, dessa forma, diminuindo o custo de produção. Em meio a grande procura por formas alternativas de controle do carrapato, o controle por meio de vacinas, com a indução da resposta imune em bovinos contra os carrapatos, tem mostrado resultados promissores (ANDREOTTI et al., 2002). As principais vantagens de uma vacina recombinante em relação aos acaricidas são: a vacina não é um agente químico, tem menor custo de produção e o desenvolvimento de resistência é mais lento (WILLADSEN, 1997).

## 2. Vacinas contra o “carrapato do boi”

Em meados de 1980, na Austrália, pesquisadores começaram a estudar a resposta imune dos bovinos contra *R. (B.) microplus*. Os primeiros estudos científicos com formulações vacinais contra este ectoparasita a serem publicados são datados de 1986 (AGBEDE; KEMP, 1986; JOHNSTON; KEMP; PEARSON, 1986; KEMP, 1986). Estes estudos foram encorajados por pesquisa feita na década anterior com vacina contra *Dermacentor andersoni*, na qual os autores conseguiram mostrar uma imunoproteção ao testarem duas formulações vacinais: a primeira composta de antígenos derivados de intestino e ovário; e a segunda composta de extrato de todos os órgãos internos – ambas de teleóginas semi-ingurgitadas de *D. andersoni*. Naquele trabalho, os autores ainda relataram que a utilização de glândulas salivares como imunógenos em bovinos não foi capaz de induzir imunidade contra o carrapato e, ainda, que antígenos derivados de fêmeas adultas não ingurgitadas foram ineficazes como imunógenos, sugerindo uma mudança nos padrões de expressão de antígenos em fêmeas alimentadas em relação às não alimentadas (ALLEN e HUMPHREYS, 1979).

Bovinos *Bos taurus* da raça Hereford, com 12 meses de idade, vacinados com extratos de fêmeas adultas de *R. (B.) microplus*, demonstraram um perfil diferente de resistência ao carrapato quando comparado aqueles que adquiriram resistência ao serem expostos a sucessivas infestações. Observou-se que, nesses últimos, os mecanismos da resistência atuavam na fase larval do carrapato, enquanto nos animais vacinados estes atuavam na fase adulta, provocando lesões no intestino com consequente extravasamento de hemácias para a linfa ou então a diluição da mesma. Neste mesmo experimento, até 60% das teleóginas sofreram algum tipo de dano no intestino e, para que as lesões ocorressem, demonstrou-se que a presença das proteínas do sistema complemento era necessária, sugerindo que ocorreria a lise das células intestinais pelo sistema complemento (KEMP et al., 1986).

Após a constatação de que a inoculação de extratos de fêmeas adultas de *R. (B.) microplus* em bovinos produziu uma resposta imune mediada por anticorpos contra o tecido intestinal do carrapato (AGBEDE et al., 1986; KEMP et al., 1986), investigações subsequentes identificaram uma glicoproteína presente no intestino destes carrapatos capaz de induzir imunoproteção (WILLADSEN et al., 1988; RAND et al., 1989). Diferentes protocolos foram utilizados para isolar e purificar este antígeno protetor. Pesquisadores australianos isolaram uma glicoproteína de 89 kDa, denominada Bm86 (WILLADSEN et al., 1989),

expressa em células do intestino de *R. (B.) microplus* (GOUGH e KEMP, 1993). O gene desta proteína foi isolado e clonado em um vetor para a subsequente expressão em *Escherichia coli*. Após a purificação, a proteína recombinante Bm86 foi utilizada para vacinar bovinos, o que resultou em 77% de redução no peso de ovos dos carrapatos do grupo vacinado (RAND et al., 1989). Quando expressa em sistema eucariótico (sistema baculovírus), este imunógeno proporcionou proteção de 88% (RICHARDSON et al, 1993). Porém, quando a Bm86 foi expressa em leveduras, níveis distintos de eficácia foram obtidos (RODRIGUEZ et al., 1994; DE LA FUENTE et al., 1998; 1999).

No Brasil, em testes com bovinos submetidos à infestação natural de *R. (B.) microplus*, foi demonstrado que a vacinação com Bm86, na formulação da vacina Gavac<sup>®</sup>, reduziu em torno de 47% o índice de infestação dos bovinos vacinados (RODRIGUEZ et al., 1995a). Porém, a eficácia das vacinas que já estiveram disponíveis comercialmente variou entre 51% e 91% dependendo da população de carrapatos e da condição nutricional dos bovinos utilizados nos testes, sem considerar qual foi o cálculo utilizado para esta estimativa (PARIZI et al., 2009).

Foi sugerido que a variação na eficácia observada entre diferentes regiões do mundo era devido às variações nas sequências de aminoácidos das Bm86 entre as diferentes populações de carrapatos (GARCÍA-GARCÍA et al., 2000). De fato, análises de populações de carrapatos da Argentina mostraram polimorfismos no gene homólogo ao da Bm86, que resulta em uma proteína solúvel em vez da proteína ligada à membrana, como as detectadas em carrapatos da Austrália e Cuba, o que explicaria porque os carrapatos argentinos são resistentes a vacinação com Bm86. Para superar esta resistência, uma nova vacina recombinante foi produzida a partir do gene da Bm95 – alelo ao gene da Bm86. Este novo antígeno foi eficiente para proteger bovinos contra infestações de carrapatos da Argentina e Cuba (GARCÍA-GARCÍA et al., 2000).

Variações nas sequências de aminoácidos superiores a 2,8% seriam suficientes para diminuir a eficiência da vacinação quando antígenos recombinantes são utilizados (GARCÍA-GARCÍA et al., 1999). Isolados de várias regiões do Brasil, Argentina, Uruguai, Venezuela e Colômbia foram analisadas e mostraram que os genes das Bm86 e Bm95 apresentam variações que vão de 3,4% a 6,8% e de 1,14% a 4,56% nas sequências de aminoácidos, respectivamente (SOSSAI et al., 2005). Um estudo de variabilidade da Bm86-CG, uma proteína homóloga a Bm86, isolada de uma cepa de Campo Grande - Mato Grosso do Sul,

mostrou variações de 3,5% e 3,7% na sequência de aminoácidos quando comparada as Bm86 e Bm95, respectivamente (ANDREOTTI et al., 2008).

Além disso, os bovinos vacinados com Bm86 mostraram níveis variáveis de resistência contra espécies filogeneticamente próximas de *R. (B.) microplus* (DE VOS et al., 2001; FRAGOSO et al., 1998; ODONGO et al., 2007). Estes níveis de proteção refletem não só a variação entre isolados de *R. (B.) microplus*, mas também as relações filogenéticas entre diferentes espécies de carrapatos, indicando que os epítomos imunologicamente importantes são, pelo menos, parcialmente conservados (ANDREOTTI et al., 2008; ODONGO et al., 2007; SOSSAI et al., 2005). Na Austrália, a vacina baseada na proteína Bm86 foi comercializada com o nome de TickGARD<sup>®</sup> e, em Cuba, Brasil e México, com o nome de GAVAC<sup>®</sup>.

A proteína Bm91, isolada de *R. (B.) microplus* da Austrália, também foi testada como antígeno vacinal, porém em associação com a Bm86, aumentando a eficácia parcial da vacina australiana (WILLADSEN et al., 1996). A Bm91 também é um antígeno “oculto” e foi caracterizada como tendo atividades carboxipeptidase (JARMEY et al., 1995).

Além do antígeno Bm86, que compõem as vacinas já existentes, outras proteínas também conferem algum grau de imunoproteção ou induzem a produção de anticorpos que interferem no sucesso reprodutivo do carrapato, como por exemplo: um precursor de protease aspártica acumulado no ovo (BYC- *Boophilus*Yolk pro-Cathepsin) (LOGULLO et al., 1998) e inibidores de tripsina (BmTIs) provenientes de larvas de carrapato (ANDREOTTI et al., 2002).

Já foi demonstrado que anticorpos funcionais podem ser encontrados na hemolinfa de carrapatos quando os carrapatos se alimentam em um bovino imunizado (DA SILVA VAZ et al., 1996). Esta observação permitiu a produção de antígenos de outros órgãos do carrapato e não somente do intestino e da saliva. A vacinação de bovinos com a BYC nativa e recombinante foi capaz de estimular uma resposta humoral dos bovinos (DA SILVA VAZ et al., 1998). A capacidade da BYC de induzir uma resposta imunitária protetora contra *R. (B.) microplus* em bovinos foi testada por ensaios de vacinação e por inoculação de anticorpo monoclonal (MAb) anti-BYC em teleóginas totalmente ingurgitadas. Nas experiências de imunização, as medições de vários parâmetros biológicos demonstraram uma proteção parcial contra *R. (B.) microplus*, variando de 14% a 36%. A inoculação de MAb produziu uma diminuição dose dependente na oviposição e sobrevivência do ectoparasita (DA SILVA VAZ et al., 1998).

A imunização de bovinos com uma associação de BmTIs nativas, purificadas em coluna de tripsina sepharose, apresentou 72,8% de eficiência na proteção contra o “carrapato do boi” (ANDREOTTI et al., 2002). Um peptídeo sintético foi desenhado com base em uma sequência conservada de aminoácidos dessas BmTIs, porém, quando testado em *stall test*, apresentou 18,4% de proteção contra o carrapato (ANDREOTTI et al., 2007).

Foi demonstrado que um peptídeo quimérico recombinante, desenhado a partir das sequências de BmTI e carrapatin, induziu resposta imune em camundongos Balb/C, mas, quando utilizado em bovinos com adjuvante completo de Freund não induziu resposta protetora (SASAKI et al., 2006).

Um destes BmTIs foi descrito pela Embrapa Gado de Corte em associação com a Escola Paulista de Medicina, denominado BmTI-A (TANAKA et al., 1999). Pesquisadores da Embrapa Gado de corte criaram uma sequência de DNA sintética deste gene e a clonaram em um plasmídeo de expressão em *Pichia pastoris* para a expressão do gene sintético. A proteína recombinante expressa por este sistema foi denominada rRmLTI e, após ser utilizada para a vacinação, conferiu proteção de 32% em bovinos após a infestação com *R. (B.) microplus* (ANDREOTTI et al., 2012).

Glutathione-S-transferases (GSTs) é uma família de enzimas envolvidas na desintoxicação metabólica de xenobióticos e compostos endógenos (AGIANIAN et al., 2003). A imunização de bovinos com uma GST recombinante de *Haemaphysalis longicornis* (rGCT-HL) induziu uma proteção parcial em bovinos, indicada pela diminuição do número de teleóginas que sobreviveram nos animais vacinados, chegando a 57% de eficácia média (PARIZI et al., 2011).

A enzima VTDCE (*Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase*) é um tipo de Catepsina L encontrado em ovos de *R. (B.) microplus* (SEIXAS et al., 2003) caracterizada como a proteína mais ativa na hidrólise da vitelina. Quando utilizada em ensaios de vacinação, animais que receberam quatro doses de 100 µg de VTDCE produziram anticorpos específicos contra VTDCE gerando uma resposta imune com proteção parcial ao desafio com larvas de *R. (B.) microplus*. Os pesos de ovos férteis de teleóginas de animais vacinados diminuíram aproximadamente 17,6% e a porcentagem de eficácia observada foi de 21% (SEIXAS et al., 2008).

Outras proteínas também têm sido isoladas e expressas de forma recombinante, porém, ainda não foram testadas em desafios com *R. (B.) microplus*. A enzima THAP (Tick Heme-binding Aspartic Proteinase), segundo o grupo de pesquisa que a isolou, considerando-se que

está envolvida na hidrólise da vitelina, pode ser outro alvo promissor em busca de controle imunológico do carrapato (SEIXAS et al., 2012).

O gene de uma proteína *calreticulin* de *R. (B.) microplus* (BmCRT) foi amplificado e expresso em *E. coli*. A BmCRT é inoculada pelo carrapato em seu hospedeiro junto com a saliva. Conhecida como sendo ligante de cálcio, e por estar presente na saliva do carrapato, provavelmente auxilia na alimentação, atuando como agente imunossupressor e anticoagulante. Ensaio de inoculação mostraram que a BmCRT é imunogênica, porém, nenhum teste de proteção foi realizado (PARIZI et al., 2009).

No Brasil, o uso do peptídeo sintético (SBm7462), desenhado a partir da Bm86, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa, mostrou resultados positivos em testes preliminares de imunoproteção de bovinos e posterior desafio com larvas, alcançando 81,05% de eficácia (PATARROYO et al., 2002). Quando o peptídeo SBm7462 foi utilizado para comparar a saponina e microesferas de PGLA 50:50 como adjuvantes, o imunógeno encapsulado, embora viáveis após encapsulação, induziu níveis de anticorpos significativamente mais baixos do que os detectados com o peptídeo emulsionado em saponina (SALES-JUNIOR et al., 2005).

Na tentativa de prolongar o título de anticorpos contra a Bm86 ou, até mesmo, eliminar a necessidade de reforço vacinal periódico, outra estratégia utilizada foi o desenvolvimento de vacinas de DNA. Ovinos, murinos e bovinos foram vacinados com plasmídeo codificando para o gene da Bm86 obtiveram uma resposta imune humoral, com produção de imunoglobulinas, especialmente do tipo IgG, contra o antígeno Bm86. Após a vacinação, os ovinos mostraram uma pequena redução de 14% na média de peso das teleóginas e 53% de redução do peso dos ovos (DE ROSE et al., 1999).

Anticorpos purificados também foram utilizados na tentativa de se identificar potenciais antígenos vacinais. MAb's contra membranas intestinais de carrapatos foram utilizados para precipitarem, a partir de extratos de carrapatos, antígenos solúveis a serem utilizados como antígenos vacinais. A vacinação de bovinos com antígenos, obtidos com esta técnica, isolados a partir do MAb QU13 provocou redução de 94% na oviposição, após as primeiras três doses. Quando estes animais receberam reforço vacinal de 500 µg, divididos em outras 5 doses, o efeito na redução na oviposição foi > 99% (LEE; OPDEBEECK, 1991). Um experimento similar também foi realizado com a inoculação de MAb produzido contra extratos não purificados de intestino e embrião em teleóginas totalmente ingurgitadas de *R. (B.) microplus* (TORO-ORTIZ et al., 1997). Um anticorpo policlonal anti-N-

*acetilhexosaminidase* (anti-HEX), produzido a partir da proteína nativa purificada de extrato de larvas e inoculada em camundongos, foi purificado e inoculado em teleóginas totalmente ingurgitadas e, como resultado, observou-se 26% de diminuição da oviposição (DEL PINO et al., 1998).

### 3. Bm86-CG

A Bm86 é uma proteína presente na superfície apical de células do intestino do *R. (B.) microplus* (GOUGH; KEMP, 1993). Apesar de não ser abundante, possui um papel fisiológico importante, pois, quando carrapatos ingerem o sangue do bovino imunizado com este antígeno ocorre a inibição da endocitose das células do tubo digestivo a partir da fixação dos anticorpos do hospedeiro. Como a endocitose é responsável pela produção de energia para a formação dos ovos, sua inibição leva a redução no número e no peso de teleóginas. Desta maneira, após a vacinação, há uma diminuição na eficiência reprodutiva de teleóginas (KEMP et al., 1989; WILLADSEN et al., 1989).

O gene da Bm86 foi isolado, clonado e expresso em *E. coli*. Após, a Bm86 recombinante foi utilizada em experimento de vacinação, no qual promoveu uma proteção menor que a proteína nativa, sugerindo que a ausência de glicosilação na proteína expressa por *E. coli* fosse a responsável por este resultado (RAND et al., 1989). A proteína Bm86 foi então clonada e expressa em *P. pastoris*, apresentando, em teste com bovinos, reduções de 50,5% de peso, 31% de número e 70% de habilidade reprodutiva de *R. (B.) microplus* que se desenvolveram no hospedeiro (RODRIGUEZ et al., 1994).

A proteína Bm86 apresentou resposta imune contra o carrapato e por estar presente no tubo digestivo do carrapato, não entrando em contato com o sistema imunológico do hospedeiro, foi classificada como antígeno “oculto” (WILLADSEN; KEMP, 1988). Sua localização foi descoberta utilizando-se anticorpo marcado com ouro coloidal, que demonstrou sua presença na superfície apical de células do intestino do carrapato, com maior concentração nas microvilosidades das células digestivas (GOUGH; KEMP, 1993).

Há duas vacinas comerciais contra *R. (B.) microplus* – a Gavac<sup>TM</sup> e a TickGard<sup>PLUS</sup>, baseadas na proteína recombinante Bm86. Estas vacinas demonstraram certa eficiência em alguns experimentos, porém, as duas formulações eliminam apenas parcialmente o número de aplicações de acaricidas (WILLADSEN; KEMP, 1988; MASSARD et al., 1995;

RODRIGUEZ et al., 1995b; WILLADSEN et al., 1995; TELLAM et al., 1997; DE LA FUENTE et al., 1998; DE LA FUENTE et al., 1999).

Em um experimento com a vacina Gavac<sup>TM</sup> realizado em Cuba, no Brasil, na Argentina e no México, foi demonstrado eficácia de 55%-100% no controle de infestações de *R. (B.) microplus* em bovinos a campo após 12-36 semanas da primeira vacinação (DE LA FUENTE et al., 1999). Em estudos realizados no Brasil, a imunização de bovinos com Bm86, submetidos à infestação natural de *R. (B.) microplus*, reduziu entre 45% e 60% o índice de infestação dos vacinados (RODRIGUEZ et al., 1995a).

Em Mato Grosso do Sul – Brasil, um estudo com animais vacinados com o antígeno Bm86 nas formulações Gavac<sup>TM</sup> (Heber Biotec S.A., P.O. Box 6162, Havana, Cuba) (DE LA FUENTE et al., 1998) e TickGard<sup>PLUS</sup> (Intervet Australia Pty. Ltd., 91-105 Harpin Street Bendigo, East Vic.) (WILLADSEN, 1997), mostrou que estas apresentaram resposta imune, considerando os níveis de IgG, com eficácia de proteção de 49,2% para Gavac<sup>TM</sup> e 46,4% para TickGard<sup>PLUS</sup> (ANDREOTTI, 2006).

Posteriormente, a análise da sequência do gene Bm86-Campo Grande (Bm86-CG) comparando com a Bm86 e Bm95 no alinhamento *par-wise*, revelou que a similaridade entre Bm86-CG e Bm86 é de 0,2% maior que a identidade entre Bm86-CG e Bm95, apresentando identidades de 96,5% e 96,3%, respectivamente. Com relação a hidrofobicidade, o método de cálculo de *Hoop e Woods* sugere que a maior diferença entre as sequências são em duas regiões. A primeira é em torno do resíduo Asp20, onde a amostra Bm86 é hidrofílica comparada com a Bm95 e a Bm86-CG. O segundo comportamento de hidrofiliabilidade é próximo do resíduo Asn85 onde a Bm86 também mostra um padrão exclusivo. A Bm86-CG tem um perfil hidrofóbico mais próximo da Bm95 na região N-terminal, mas mostra um comportamento similar a Bm86 na região C-terminal (ANDREOTTI et al., 2008).

Os estudos para calcular a porcentagem de eficácia das vacinas baseadas em Bm86 em bovinos no Brasil, os quais mostram uma eficácia abaixo da encontrada em outros países, assim como as análises das sequências das proteínas homólogas a Bm86, que mostram diferenças nas sequências aminoacídicas, dão suporte para a necessidade de um estudo das populações regionais de carrapatos. Esta avaliação é importante para a verificação da eficiência do antígeno em questão e a sua posterior utilização no controle do carrapato.



#### 4. RmLTI

Os primeiros estudos com isolamento de inibidores de tripsina de *R. (B.) microplus* (BmTI) foram realizados na Austrália, na década de 70. Foi purificado um inibidor de tripsina em colunas de troca iônica e gel filtração com aproximadamente 18,5 kDa. Sua atividade foi confirmada demonstrando-se a inibição de tripsina e quimotripsina. Também foi demonstrado que este BmTI possuía sítios de ligação distintos para as duas enzimas (inibidor com “duas cabeças”). Além disso, foi demonstrado que este inibidor provocava uma reação de hipersensibilidade imediata quando injetado intradérmico em bovinos e que esta reação era uma resposta imunológica específica (WILLADSEN; RIDING, 1979). Naquela época já se acreditava que esta reação imune poderia ser um fator de resistência dos bovinos ao “carrapato do boi”.

Foram identificados, pelo menos, dois inibidores de proteases que inibem tripsina e quimotripsina nas fases de ovo e de larva de *R. (B.) microplus* (VERMEULEN et al., 1988; WILLADSEN; RIDING, 1980). Em um estudo subsequente, foi demonstrado que os inibidores de proteases presentes em ovos e larvas desta espécie de carrapato estão intimamente relacionados, porém, são distintos. Múltiplas formas de tais inibidores eram frequentemente observadas e, neste caso, cada forma parecia ser específica de uma fase de vida deste carrapato (WILLADSEN; MCKENNA, 1983). A quantidade de inibidores presentes nas larvas tem uma queda rápida logo após o início do estágio parasitário, sugerindo que estes poderiam ser secretados no hospedeiro (WILLADSEN; RIDING, 1980). Estas constatações corroboram com a ideia de que estes inibidores devem ser importantes para o início de uma alimentação bem-sucedida de larvas de *R. (B.) microplus* (WILLADSEN; MCKENNA, 1983).

Após o desenvolvimento de vacinas com o antígeno Bm86, que não apresentavam 100% de eficácia contra *R. (B.) microplus*, surgiu a ideia de que a utilização de mais de um antígeno em uma formulação vacinal contra este ectoparasita poderia provocar um efeito de cooperação em matéria de imunoproteção de bovinos (WILLADSEN, 1990).

Seguindo esta ideia, pesquisas foram realizadas para identificar e caracterizar diferentes moléculas com potencial imunogênico em bovinos. Uma pesquisa realizada por Tanaka et al. (1999) buscou identificar inibidores de calicreína e elastase, as quais interferem

na coagulação sanguínea. A calicreína plasmática é uma serina protease que participa na via intrínseca de coagulação sanguínea e também produz bradicinina a partir de quinínogênio. A bradicinina é uma substância promotora de edema, que, por sua vez, pode ser um componente significativo na rejeição de carrapatos pelos bovinos (TANAKA et al., 1999).

Um BmTI, denominado BmTI-A, foi descrito como sendo inibidor de tripsina, de elastase de neutrófilo e de calicreína plasmática, sugerindo uma possível participação no bloqueio da coagulação sanguínea durante a fixação larval em bovinos. Esta possível ação é justificada, principalmente, pela inibição de calicreína plasmática, responsável pela geração de fatores de coagulação que mantêm a formação de coágulo. Uma vez que esta enzima é inibida, o tempo de coagulação é prolongado, fato que poderia conferir vantagem a larva de *R. (B.) microplus* no estágio inicial de alimentação (TANAKA et al., 1999). A inibição da calicreína plasmática também pode ajudar o carrapato evitando a formação de edema pela inibição da bradicinina lançada no local de fixação deste parasita (RIBEIRO, 1989). Desta maneira, o processo inflamatório que seria originado pela lesão no local de fixação da larva, com a migração de fatores como imunoglobulinas e sistema complemento, induzido pelas substâncias vasoativas, assim como fagócitos por quimiotaxia, é diminuído (ANDREOTTI et al., 1999).

Foi demonstrado que a BmTI-A apresenta alta homologia com inibidores de serina proteases da família de inibidores de tripsina pancreática bovina (ITPB) tipo Kunitz, sendo constituída por dois domínios, explicando a hipótese do inibidor com “duas cabeças” (WILLADISEN; RIDING, 1979). A sequência de aminoácidos da BmTI-A mostrou-se homóloga às sequências da ornithodorin (inibidor de trombina) (VAN DE LOCHT et al., 1996) e de um peptídeo anticoagulante (TAP; inibidor de fator Xa) (WAXMAN et al., 1990), dois inibidores anticoagulantes da mesma família, que também foram isolados de carrapato, *Ornithodoros moubata* (TANAKA et al., 1999). Tanaka et al. (1999) ainda sugerem que a presença deste inibidor com dupla ação, na coagulação sanguínea e nos mediadores de inflamação, poderia ser uma estratégia econômica ao processo de alimentação de larvas de *R. (B.) microplus*.

Estudos posteriores mostraram que larvas de *R. (B.) microplus* são uma fonte muito rica de diferentes inibidores de tripsinas. Como era de se esperar, todas inibiram tripsina,

porém nem todas inibiram calicreína sorológica humana (BmTI-3) e elastase de neutrófilos humana (BmTI-D) (ANDREOTTI et al., 1999; SASAKI et al., 2004).

A Embrapa Gado de Corte vem trabalhando há alguns anos na seleção de BmTIs candidatas a antígenos provenientes da fase de larva do carrapato *R. (B.) microplus* (ANDREOTTI et al., 1999; 2000; 2002; ANDREOTTI, 2007; ANDREOTTI et al., 2012). BmTIs nativas, com atividades inibitórias de tripsina, calicreína e elastase, foram utilizadas como imunógenos em bovinos, na tentativa de reverter a ação anticoagulante e imunossupressora destes inibidores secretados e lançados pelas larvas de *R. (B.) microplus* no local de sua fixação. Após a infestação, os bovinos imunizados apresentaram redução no número total de carrapatos (69,7%), no peso total de ovos (71,3%) e no peso das teleóginas (69,5%), comparados aos não imunizados. A eficácia alcançada com esta formulação foi de 72,8% (ANDREOTTI et al., 2002). Anos depois, um fragmento N-terminal de BmTI foi sintetizado e utilizado em ensaio de vacinação de bovinos. Apesar deste antígeno sintético ter estimulado a produção de anticorpos a nível similar ao observado pela vacinação com as BmTIs nativas, a imunoproteção não foi tão boa assim, apresentando uma eficácia de apenas 18,4% contra uma subsequente infestação por *R. (B.) microplus* (ANDREOTTI, 2007).

Os bovinos adquirem imunidade parcial a *R. (B.) microplus* após exposição natural extensa, devido, em grande parte, a uma reação de hipersensibilidade imediata ao carrapato (RODRÍGUEZ et al., 1994). Sabe-se que os mastócitos e a histamina contida no interior de seus grânulos citoplasmáticos são de importância fundamental para o mecanismo de auto-higiene dos bovinos, o qual, por sua vez, é crítico para a resistência dos animais ao carrapato *R. (B.) microplus* (VERÍSSIMO et al., 2008). Além disso, um estudo realizado por Veríssimo (2008) sobre os mecanismos de resistência dos bovinos a *R. (B.) microplus* conclui que o mecanismo de hipersensibilidade imediata é muito importante, uma vez que determina a resistência do hospedeiro a esta espécie de carrapato em particular.

Considerando o potencial imunogênico das BmTIs, que são capazes de reagir com o sistema imune e gerar uma hipersensibilidade imediata, a produção de uma vacina com a proteína recombinante BmTI, mesmo em um sistema onde o efeito da vacina seja parcial e integrado ao controle químico e outras práticas de manejo, os custos de produção na pecuária bovina diminuiriam, pois o custo adicional da vacina para imunizar todo o rebanho seria menor que a própria redução do custo de acaricidas químicos.

## 5. *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica que tem sido muito utilizada para expressão de proteínas heterólogas devido às suas grandes vantagens em relação aos outros sistemas de expressão. As técnicas requeridas para sua manipulação são semelhantes às descritas para *Saccharomyces cerevisiae*, um dos sistemas mais bem caracterizados geneticamente (CREGG; CEREGUINO, 2000). As suas características mais vantajosas são: ter *status* GRAS, ser de fácil manipulação genética, expressar proteínas heterólogas em altos níveis, ser um sistema eucariótico capaz de promover O- e N-glicosilação além de ser capaz de processar sequências sinais (HOHENBLUM et al., 2004). Além disso, comparado com outros sistemas baseados em eucariotos superiores, como as culturas de células de mamíferos, este sistema é considerado de uso rápido, fácil e mais econômico (GELLISSEN, 2000).

As leveduras metilotróficas têm a habilidade de utilizar metanol como única fonte de carbono, sendo que o primeiro passo no metabolismo do metanol é sua oxidação a formaldeído, catalisado pela enzima álcool oxidase (AOX), que utiliza o oxigênio molecular e gera peróxido de hidrogênio. As reações iniciais ocorrem nos peroxissomos, seguido por uma etapa metabólica subsequente no citoplasma. *P. pastoris* possui dois genes que codificam para a AOX – *AOX1* e *AOX2* –, sendo o primeiro responsável por 85% da atividade de álcool-oxidase na célula. A AOX tem baixa afinidade por O<sub>2</sub> e as leveduras metilotróficas compensam esta deficiência sintetizando grandes quantidades desta enzima (CREGG; CEREGUINO, 2000; GELLISSEN, 2000; JAHIC, 2003).

O promotor do gene *AOX1* é fortemente reprimido quando as células crescem em outras fontes de carbono. Contudo, a ausência de uma fonte de carbono repressora no meio, como a glicose, não resulta em uma transcrição substancial do *AOX1*, sendo, a presença de metanol como única fonte de carbono, essencial para a indução de altos níveis de expressão (TSCHOPP et al., 1987), podendo aumentar a concentração de AOX até esta constituir mais de 30% do total de proteínas solúveis (COUDEK; BARATTI, 1980; ROGGENKAMP et al., 1984).

O método de transformação mais utilizado em *P. pastoris* é por meio de integração cromossomal. Este método oferece vantagens como: estabilidade do cassete e expressão, geração de transformantes com múltiplas cópias, controle do sítio de integração e a capacidade de construir variados modos de integração. Vetores linearizados podem promover

a recombinação homóloga entre as sequências compartilhadas pelo vetor e pelo genoma e, desta maneira, a integração pode ocorrer via inserção por um simples evento de *crossover* ou por substituição gênica, por meio de duplo *crossover*. A integração por inserção ocorre mais frequentemente e pode resultar em múltiplas integrações *in tandem* do cassete de expressão a uma taxa de 1-10%, podendo aumentar a quantidade de proteína expressa. Por outro lado, apesar das transformações por substituição gênica geralmente resultarem em transformantes de cópia única, estas são geneticamente mais estáveis (SREEKRISHNA et al., 1997).

*P. pastoris* tem preferência por crescimento respiratório, com a utilização de O<sub>2</sub>, o que lhe permite o crescimento até altas densidades celulares (500 OD<sub>600</sub>) e, conseqüentemente, a obtenção de níveis superiores de proteínas expressas (CREGG; CEREGUINO, 2000). Além disso, esta levedura glicosila as proteínas de forma bem próxima aos metazoários (BRETTHAUER; CASTELLINO, 1999).

A expressão da proteína recombinante em *P. pastoris* pode ser intracelular ou extracelular. A vantagem desta última é que esta levedura secreta baixa quantidade de proteínas endógenas e seu meio de crescimento não contém proteínas adicionais, o que facilita as etapas seguintes de purificação (TSCHOPP et al., 1987; BARR et al., 1992; CREGG e CEREGUINO, 2000).

A secreção requer a presença de uma sequência sinal que direcionará a proteína para esta via. O sinal de secreção do fator- $\alpha$  de *S. cerevisiae* é o mais utilizado nos vetores de expressão para *P. pastoris* (CREGG; CEREGUINO, 2000). Durante a via de secreção, o peptídeo sinal do fator- $\alpha$  é clivado por uma peptidase-sinal presente na membrana do retículo endoplasmático. Após a proteína ganhar o lúmen do retículo endoplasmático, a protease Kex2p da levedura reconhece o sítio de clivagem Lys-Arg e libera a porção pró do fator- $\alpha$ . A presença de sequência Glu-Ala próxima ao sítio de clivagem da Kex2p, pode aumentar a atividade desta enzima, e ser posteriormente removida da proteína madura pela ação de uma diaminopeptidase, produto do gene STE13 (DALY; HEARN, 2005).

Em relação ao gene *AOX1*, dois tipos de cepas de *P. pastoris* podem ser obtidas, variando com relação à sua capacidade de utilizar o metanol. As cepas com mutações nos dois genes da AOX são por vezes melhores produtores de proteínas estranhas do que as do tipo selvagem (TSCHOPP et al., 1987; CHIRUVOLU et al., 1997). Além disso, estas cepas não exigem grandes quantidades de metanol e são rotineiramente utilizadas para fermentação em grande escala. A linhagem GS115 é capaz de gerar clones com fenótipo do tipo *Mut<sup>S</sup>*, que refere-se à baixa utilização de metanol, causado pela perda de atividade da álcool-oxidase

codificada pelo gene *AOX1*, e clones com fenótipo *Mut*<sup>+</sup>, que refere-se a alta utilização de metanol, justamente por manter os dois genes que codificam para AOX. A estirpe com um fenótipo *Mut*<sup>S</sup> tem o locus *aox1* mutante, mas é do tipo selvagem para *AOX2*. Isto resulta em um fenótipo de crescimento lento na presença de metanol. Ambos recombinantes, *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>, são úteis, pois um fenótipo pode favorecer a melhor expressão da proteína recombinante do que o outro. Como não há maneira de se prever qual fenótipo vai expressar melhor a proteína, o recomendado é analisar os diferentes tipos de recombinantes (CREGG; CEREGUINO, 2000).

Dentro da perspectiva de procurar novas estratégias para o controle do carrapato, o objetivo deste trabalho foi avaliar antígenos recombinantes presentes em um isolado regional de *R. (B.) microplus*, mantidos na Embrapa Gado de Corte, em busca de uma ferramenta alternativa que possa ser utilizada em associação com o controle químico e, também, discutir a forma como as avaliações de vacinas contra carrapatos estão sendo conduzidas.

## REFERÊNCIAS

- AGBEDE, R.I.; KEMP, D.H. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: histopathology of ticks feeding on vaccinated cattle. **International Journal for Parasitology**. v.14, n.1, p.35-4, 1986.
- AGIANIAN, B.; TUCKER, P. A.; SCHOUTEN, A.; LEONARD, K.; BULLARD, B.; GROS, P. Structure of a Drosophila Sigma Class Glutathione S-transferase Reveals a Novel Active Site Topography Suited for Lipid Peroxidation Products. **Journal of Molecular Biology**, v. 326, n. 1, p. 151–165, 2003.
- ALLEN, J. R.; HUMPHREYS, S. J. Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. **Nature**, v. 280, p. 491-493, 1979.
- ALVES-BRANCO, F. P. J.; ECHEVARRIA, F. A. M.; SIQUEIRA, A. S. Garça vaqueira (*Egretta ibis*) e o controle biológico do carrapato (*Boophilus microplus*). **EMBRAPA-UEPAE Bagé, Comunicado Técnico 1**, 1983, 4 p.
- ALVES-BRANCO, F. P. J.; SAPPER, M. F. M.; ARTILES, J. M. J. Diagnóstico de resistência de *Boophilus microplus* a piretróides. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11., 1992, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1992. 242 p.
- ANDREOTTI, R. A synthetic bmti n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 66–70, 2007.

ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; TORQUATO, R. J. S.; TANAKA, A. S. Partial purification of serineprotease inhibitor from *Boophilus microplus* larvae. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 8, n. 2, p. 93–8, 1999.

ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; TANAKA, A. S.; GRANDE, C. Immunoprotection induced in calves by a serine proteinase inhibitor from *Boophilus microplus* unfed larvae. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 85–9, 2000.

ANDREOTTI, R. et al. BmTI antigen induce as bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **Internantional Immunopharmacology**, v. 2, p. 557-563, 2002.

ANDREOTTI, R. Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. **Revista Brasileira de Parastiologia Veterinária**, v.15, n.3, p. 97-100, 2006.

ANDREOTTI, R. et al. Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants Bm86 Campo Grande strain, Bm86 and Bm95. **Revista Brasileira de Parastiologia Veterinária**, v. 17, p. 93-8, 2008.

ANDREOTTI, R.; CUNHA, R. C.; SOARES, M. A.; GUERRERO, F. D.; LEITE, F. P. L.; DE LEÓN, A. A. P. Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. **Vaccine**, v. 30, n. 47, p. 6678–6685, 2012.

ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; BARROS, J. C. Protective action of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial. **Veterinary Parasitology**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.045>.

ARTHUR, D. R. **Ticks. A monograph of the Ixodoidea. On the genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma*, *Boophilus* and *Margaropus***. London: Cambridge University Press, 1960. 374 p.

BARR, K. A.; HOPKINS, S. A.; SREEKRISHNA, K. Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. **Pharmaceutical Engineering**, v. 12, 48–51, 1992.

BENNET, G. F. Oviposiposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). II. Influences of temperature, humidity and light. **Acarologia**, Paris, v. 16, p. 250-257, 1974.

BERGMAN, D.K. et al. Isolation and molecular cloning of a secreted immunopressant protein from *Dermacentor andresoni* salivary gland. **Journal for Parasitology**, v. 86, n. 3, p. 516-525, 2000.

BRETTTHAUER, R. K.; CASTELLINO, F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.30, n. 3, p.193-200, Dec, 1999.

BRUM, J. G. W. **Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* (Grimont et al., 1981): etiopatogenia e sazonalidade**. 1988. 95 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1988.

CHIRUVOLU, V., CREGG, J. M. e MEAGHER, M. M. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fed-batch fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 277-283, 1997.

CORDOVÉS, C. O. **Carrapato: controle ou erradicação**. 2. ed. Guaíba: Agropecuária, 1997, 177 p.

COUDEEC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, p. 2279-2289, 1980.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23-52, Sep, 2000.

DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, n. 2, p. 119-38, Mar-Apr, 2005.

DA SILVA VAZ, I. et al. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 66, n. 3-4, p. 331-341, 1998.

DA SILVA VAZ, I. et al. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 1-2, p. 155-160, 1996.

DE CASTRO, J. J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. **Veterinary Parasitology** 1997;71:77-97.

DE LA FUENTE, J.L. et al. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with GAVAC against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 16, n. 4, p. 366-373, 1998.

DE LA FUENTE, J.L. et al. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.); the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Genetic Analysis**, v. 15, n. 3, p.143-148, 1999.

DEL PINO, F. A et al. Effect of antibodies against beta-N-acetylhexosaminidase on reproductive efficiency of the bovine tick *Boophilus microplus*. **Veterinary parasitology**, v. 79, n. 3, p. 247-55, 16 nov. 1998.

DE ROSE, R. et al. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 71, n. 3-4, p. 151-60, 30 nov. 1999.

DE VOS, S.; ZEINSTRA, L.; TAOUFIK, A.; WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. Evidence for the Utility of the Bm86 Antigen from *Boophilus microplus* in Vaccination Against Other Tick Species. **Experimental and applied acarology**, v. 25, n. 3, p. 245-261, 2001.

DOUBLE, B. M.; KEMP, D. H. The influence of temperature, relative humidity and host factors on the attachment and survival of *Boophilus microplus* (Canestrini) larvae to skin slices. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 9, p. 449-454, 1979.



ELDER, J. K. et al. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistance cattle and pasture spelling. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 56, p. 219-231, 1980.

ERVIN, R. T. et al. Estimation and economic implication of lone star tick (Acari, Ixodidae) infestation on weight-gain of cattle, *Bos taurus* and *Bos indicus* x *Bos taurus*. **Journal of Economic Entomology** 1987;80:443–45.

FARIAS, N. A. R. **Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina**. Guaíba: Agropecuária, 1995, 80 p.

FRAGOSO, H. et al. infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* BmS6-containing vaccine Gavac. **Vaccine**, v. 16, n. 20, p. 1990–1992, 1998.

FURLONG, J. **Carrapato: problemas e soluções**. Juiz de Fora-MG. EMBRAPA Gado de leite, 2005, 65p.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, p. 26-32, 2007.

GARCÍA-GARCÍA, J. C. et al. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Experimental and applied acarology**, v. 23, n. 11, p. 883–95, 1999.

GARCÍA-GARCÍA, J. C. et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 18, n. 21, p. 2275–87, 2000.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 6, p.741-50, Dec, 2000.

GHOSH, S.; KHAN, M.H.; AHMED, N. Cross-bred cattle protected against *Hyalomma anatolicum anatolicum* by larval antigens purified by immunoaffinity chromatography. **Tropical Animal Health Production**, v.31, n.5, p.263-273, 1999.

GOMES, A. **Dinâmica populacional de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1987) (Acari: ixodidae) em bovinos nelore (*Bos indicus*) e cruzamentos em infestações experimentais**. 1995. 120 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.

GOMES, A. Controle do carrapato do boi: um problema para quem cria raças europeias. **Divulgação CNPGC EMBRAPA**, Campo Grande, MS, Agosto, 1998, n. 31. Disponível em <http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD31.html>.

GOMES, A. Aspectos da cadeia produtiva do couro bovino no Brasil e em Mato Grosso do Sul. **Divulgação CNPGC EMBRAPA**, Campo Grande, MS, Novembro, 2001(Documento 127). Disponível em <http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc127/08aspectos.html>

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995. 235 p.

GOTHE, R.; KUNZE, K.; HOOGSTRAAL, H. The mechanisms of pathogenicity in the tick paralysis. **Journal of Medical Entomology**, Lanhan, v. 16, p. 357-369, 1979.

GOUGH, J. M.; KEMP, D. H. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 79, p. 900-907, 1993.

GRISI, L. et al. Impacto das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 125, p. 8-10, 2002.

GUARAGNA, G. P.; CARVALHO, J. B. P.; GAMBINI, L. B.; BARBOSA, M. I. A. Efeito dos fatores genéticos e ambientes na infestação natural de carrapatos (*R. (B.) microplus*, Canestrini) em bovinos leiteiros. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo, v.49, n.2, p.73-82, 1992.

HEWETSON, R. W. The inheritance of resistance by cattle to cattle tick. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 5, p. 299-303, 1972.

HITCHCOCK, L. F. Studies on the parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). **Australian Journal of Zoology**, Victoria, v. 3, p. 145-155, 1955.

HOHENBLUM, H. et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 85, n. 4, p.367-75, Feb, 2004.

HORN, S. C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, Brasília, 1983. 29 p.

JAHIC, M. **Process techniques for production of recombinant proteins with *Pichia pastoris***. Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology. Ph.D. thesis, Stockholm, 2003.

JARMEY, J. M.; RIDING, G. A.; PEARSON, R. D.; MCKENNA, R. V.; WILLADSEN, P. Carboxydipeptidase from *Boophilus microplus*: A “concealed” antigen with similarity to angiotensin-converting enzyme. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 9, p. 969–974, 1995.

JOHNSTON, L. A. Y.; KEMP, D. H.; PEARSON, R. D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on tick populations. **International Journal for Parasitology**, v. 16, n. 1, p. 27–34, 1986.

KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, Oxford, v. 5, p. 47-56, 1989.

KEMP, D. H.; STONE, B. F.; BINNINGTON, K. C. Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions, and the host response. In: Obechain & Galun. **Physiology of ticks**. Oxford: Pergamon Press Ltd; 119-167 1982.

KEMP, D.H. et al. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 16, n. 2, p. 115-120, 1986.

KEMP, D. H. et al. Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. **Experimental and Applied Acarology**, v. 7, n. 1, p. 43–58, Jun, 1989.

KESSLER, R. H.; SHENK, M. A. M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1998, 157 p.

LANDIS, R. C.; ASIMAKOPOULOS, G.; POULLIS, M.; HASKARD, D. O.; TAYLOR, K. M. The antithrombotic and antiinflammatory mechanisms of action of aprotinin. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 72, p. 2169-2175, 2001.

LEE, R. P.; OPDEBEECK, J. P. Isolation of protective antigens from the gut of *Boophilus microplus* using monoclonal antibodies. **Immunology**, v. 72, n. 1, p. 121–6, 1991.

LOGULLO, C. et al. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 116, n. 6, p. 525-532, 1998.

LONDT, J. G. H.; ARTHUR, D. R. The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae). **Journal of the Entomological Society of South Africa**, Pretoria, v. 38, p. 321-340, 1975.

MANNUCCI, P.M. (1998) **Hemostatic drugs**. *N. Engl. J. Med.*, 339, 245-253.

MARTINS, J. R. S. et al. A situation report on resistance to acaricides by the cattle tick *Boophilus microplus* in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. Em: SEMINARIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, 3., 1995, Acapulco. **Anais... SAGAR, CANIFARMA, FAO, IICA, INIFAP**, p. 1-8, 1995.

MASSARD, C. L.; DA FONSECA, A. H.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm86 - GAVAC contra o carrapato *Boophilus microplus* no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 167-173, 1995.

MATTIOLI, R.C. et al. A comparison of field tick infestation on N'Dama, Zebu and N'Dama x Zebu crossbred cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 47, n. 1-2, p. 139-148, 1993.

NOLAN, J. et al. Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 66, p. 179-182, 1989.

NOLAN, J. Acaricide resistance in the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Report of Workshop Leader** - FAO/UN Consultant. Porto Alegre, RS, Brazil, p. 21-25, November, 1994. 23 p.

NUÑES, J. L.; MUÑOZ COBENAS, M. E.; MOLTEDO, H. L. **Boophilus microplus, la garrapata comun del ganado vacuno**. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1982. 19 p.

ODONGO, D. et al. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. **Vaccine**, v. 25, n. 7, p. 1287–96, 2007.

OLIVEIRA, F. P.; SPADA J. C. P., SILVA, T. S. D.; FERREIRA, L. C.; LUQUETTI, B. C.; Soutello, R. V. G. Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos diferentes grupos de acaricidas utilizados na região Noroeste do estado de São Paulo. **Revista Ciências Agrárias e da Saúde**, Andradina, v.9, p. 54–60, 2013.

PARIZI, L. F.; POHL, P. C.; MASUDA, A.; SILVA VAZ JUNIOR, I. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 2009.

PARIZI, L. F. et al. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 113–8, 2011.

PATARROYO, J. H. Babesiose bovina: controle de vetores com vacinas a base de peptídeos sintéticos. **Revista de patologia tropical**, v. 23, n. 2, p. 145-146, 1994.

PATARROYO, J. H. et al. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 88, n. 3-4, p. 163–72, 25 set. 2002.

RAND, K. N. et al. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. Proceedings of the National. **Academy of Science U. S. A.**, v. 86, n. 24, p. 9657-9661, 1989.

RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in tick host interactions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 7, p. 15–20, 1989.

RICHARDSON, M. A.; SMITH, D. R.; KEMP, D. H.; TELLAM, R. L. Native and baculovirus-expressed forms of the immuno-protective protein BM86 from *Boophilus microplus* are anchored to the cell membrane by a glycosyl-phosphatidyl inositol linkage. **Insect molecular biology**, v. 1, n. 3 p. 139–47, 1993.

RIEK, R. F. The cattle tick and fever. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 41, p. 211-215, 1965.

ROBERTS, J. A. Acquisition by the host of resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 54, p. 657-662, 1968.

ROBERTS, J. A.; KERR, J. D. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. **Journal of Parasitology**, v.62, n.3, p.485-488, 1976

RODRIGUES, D. S.; BISPOS, R. P.; MULLER, W.; BARROS, A. B.; LEITE, R. C. Custo operacional efetivo de quatro técnicas de banho carrapaticida por aspersão. International Symposium on Tick Control and Tick-borne Diseases. **Embrapa** (Documentos 202), p. 25-25, 2013. ISSN 1983-974X.

RODRIGUEZ, M. et al. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 33, p. 135-146, 1994.

RODRIGUEZ, M. et al. Effect of vaccination with recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine**, v. 13, p. 1804-1808, 1995a.

RODRIGUEZ, M. et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. **Veterinary Parasitology**, v.57, n.4, p.339-349, 1995b.

ROGGENKAMP, R. et al. Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 194, n. 3, p. 489–493, 1984.

SALES-JUNIOR, P. A. et al. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm7462. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 107, n. 3-4, p. 281–90, 15 set. 2005.

SASAKI, S. D.; AZZOLINI, S. S.; HIRATA, I. Y.; ANDREOTTI, R.; TANAKA, A. S. *Boophilus microplus* tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors. **Biochimie**, v. 86, n. 9-10, p. 643–649, 2004.

SASAKI, S. D.; COTRIN, S. S.; CARMONA, A. K.; TANAKA, A. S. An unexpected inhibitory activity of Kunitz-type serine proteinase inhibitor derived from *Boophilus microplus* trypsin inhibitor on cathepsin L. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 341, n. 1, p. 266–72, 2006.

SEIXAS, A. et al. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. **Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 155–163, 2003.

SEIXAS, A.; LEAL, A. T.; NASCIMENTO-SILVA, M. C. L.; MASUDA, A.; TERMIGNONI, C.; DA SILVA VAZ, I. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 124, n. 3-4, p. 332–340, 2008.

SEIXAS, A. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 148, n. 1-2, p. 149–56, 15 jul. 2012.

SONENSHIME, D. E. **Biologia of ticks**. New York: Oxford University Press, 1993. 316 p.

SORGINE, M. H. et al. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28.659-28.665, 2000.

SOSSAI, S. et al Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 37, n. 3-4, p. 199–214, 2005.

SREEKRISHNA, K., et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 190, n. 1, p.55-62, Apr, 1997.

SUTHERST, R. W.; JONES, R. J.; SCHNITZERLING, H. J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, London, v. 295, p. 320-321, 1982.

TANAKA, A. S.; ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; TORQUATO, R. J.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. A double headed serine proteinase inhibitor--human plasma kallikrein and elastase inhibitor--from *Boophilus microplus* larvae. **Immunopharmacology**, v. 45, n. 1-3, p. 171-177, 1999.

TATCHELL, R. J.; CARNELL, R.; KEMP, D. H. Electrical studies on the feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Zeitschrift fuer Parasitenkunde**, Jena, v. 38, p. 32-44, 1972.

TELLAM, R. et al. Vaccination against ticks. **Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology**, n. 12, p. 303-331, 1997.

TEODORO, R. L.; MARTINEZ, M. L.; SILVA, M. V. G. B.; MACHADO, M. A.; VERNEQUE, R. D. S. 2004. Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: experiência brasileira. **Anais do V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**. Pirassununga, SP. CD ROM.

TSCHOPP, J. F. et al. High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, v. 5, p. 1305-1308, 1987.

TORO-ORTIZ, R. D.; VAZ JUNIOR, I. S.; GONZALES, J. C.; MASUDA, A. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. **Veterinary Parasitology**, v. 69, n. 3-4, p. 297-306, 1997.

VAN DE LOCHT, A.; STUBBS, M. T.; BODE, W.; FRIEDRICH, T.; BOLLSCHWEILER, C.; HOFFKEN, W.; HUBER, R. The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? **EMBO Journal**, v. 15, p. 6011- 6017, 1996.

VAZ JÚNIOR, I. da S. **Caracterização de proteínas de *Boophilus microplus* como imunógeno em vacina contra o carrapato**. 1997. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

VERISSIMO, C. J. **Resistência e Suscetibilidade de Bovinos Leiteiros Mestiços ao Carrapato *Boophilus microplus***, MSc. Tese, Universidade Estadual Paulista, 1991.

VERÍSSIMO, C.; BECHARA, G.; MUKAI, L. Mast cell counts correlate with *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick load in different cattle breeds. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 1, n. 2, p. 81-87, 2008.

VERMEULEN, N. M. J.; VILJOEN, G. J.; BEZUIDENHOUT, J. D.; VISSER, L.; NEITZ, A.W. H. Kinetic properties of toxic protease inhibitors isolated from tick eggs. **International Journal of Biochemistry**, v. 20, p. 621- 631, 1988.

WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animal. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 29, p. 401-409, 1978

WIKEL, S. K. Host immunity to ticks. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 1-22, 1996.

WILLADSEN, P. et al. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 143, p. 1346-1351, 1989.

WILLADSEN, P. et al. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 110, p. 43-50, 1995.

WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, p. 209-222, 1997.

WILLADSEN, P. Perspectives for subunit vaccines for the control of ticks. **Parassitologia**, v. 32 n. 1, p. 195–200, 1990.

WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. **Parasitology Today**, v. 15, n. 7, Jul, p. 258-62, 1999.

WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. Vaccination with "concealed" antigens for tick control. **Parasitology Today**, v. 4, n. 7, p. 196-198, 1988.

WILLADSEN, P.; MCKENNA, R. V. Trypsin-chymotrypsin inhibitors from the tick, *Boophilus microplus*. **Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science**, v. 61, p. 231–238, 1983.

WILLADSEN, P.; MCKENNA, R. V.; RIDING, G. A. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. **International Journal of Parasitology**, v. 18, n. 2, p. 183-189, 1988.

WILLADSEN, P.; RINDING, G. A. Characterization of a Proteolytic-Enzyme Inhibitor with Allergenic Activity. Multiple functions of a parasite-derived protein. **The Biochemical journal**, v. 177, p. 41–47, 1979.

WILLADSEN, P.; RINDING, G. A. On the biological role of a proteolytic-enzyme inhibitor from the ectoparasitic tick *Boophilus microplus*. **The Biochemical journal**, v. 189, n. 2, p. 295–303, 1980.

WILLADSEN, P.; SMITH, D.; COBON, G.; MCKENNA, R. V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. **Parasite Immunology**, v. 18, n. 5, p. 241–246, 1996.

## ARTIGO 1

[CUNHA, R. C. et al. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 254–262, 2012]

### IMUNOPROTEÇÃO DE BOVINOS CONTRA *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* COM ANTÍGENO RECOMBINANTE BM86-CAMPO GRANDE

Rodrigo Casquero Cunha<sup>1</sup>; Adalberto Angel Pérez de León<sup>2</sup>; Fábio Pereira Leivas Leite<sup>3</sup>; Luciano da Silva Pinto<sup>3</sup>; Alceu Gonçalves dos Santos Júnior<sup>4</sup>; Renato Andreotti<sup>1</sup>

1 – Laboratório de Sanidade Animal, EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil

2 – USDA-ARS Knippling-Bushland U.S. Livestock Insects Research Laboratory, Kerrville, TX, USA

3 – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas, RS, Brasil

4 – Programa de Pós-graduação em Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas, RS, Brasil

#### Resumo

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é, sem dúvidas, o ectoparasita economicamente mais importante para o gado a nível mundial. A utilização inadequada de acaricidas tem impulsionado a evolução da resistência em populações de *R. (B.) microplus*. Vacinas contra o carrapato representam uma tecnologia que pode ser combinada com acaricidas em programas de controle integrado para diminuir o impacto de *R. (B.) microplus*. A forma recombinante da Bm86 da cepa Campo Grande (rBm86-CG) de *R. (B.) microplus* foi produzida utilizando o sistema de expressão em *Pichia pastoris* para testar sua capacidade de imunoproteção ao gado contra a infestação de carrapatos. A secreção de rBm86-CG em *P. pastoris* pelo bioprocessamento simplificou a purificação do antígeno. A resposta imune humoral específica foi detectada por ELISA em soros de bovinos vacinados. Resultados de imunoblot revelaram que anticorpos policlonais de bovinos vacinados reconheceram uma proteína em extratos de larvas com um peso molecular correspondente à Bm86. O antígeno rBm86-CG mostrou eficácia de 31% contra a amostra CG de *R. (B.) microplus* utilizada para infestar os bovinos vacinados. Pelos resultados obtidos, concluímos que a rBm86-CG é um antígeno que pode ser usado em uma vacina polivalente, como parte de um programa integrado para o controle de *R. (B.) microplus* no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil.

**Palavras-chave:** Carrapato, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, vacina, Bm86 recombinante, *Pichia pastoris*.



## Introdução

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, vulgarmente conhecido como carrapato do boi, é sem dúvida o ectoparasita economicamente mais importante para a pecuária nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Os pecuaristas têm facilmente a sua disposição acaricidas químicos para o controle de *R. (B.) microplus* no gado. A utilização de acaricidas químicos tem sido dificultado pelo seu uso inadequado, o que tem contribuído para a evolução da resistência aos acaricidas nas populações de *R. (B.) microplus* (FURLONG, 2004). As vacinas fornecem uma ferramenta alternativa para o controle do carrapato (WILLADSEN; JONGEJAN, 1999). Programas integrados de controle de carrapatos que incluam vacinação poderiam reduzir o uso de acaricidas químicos, diminuindo o custo de produção animal, minimizando os impactos de contaminação ambiental e diminuindo o risco de resíduos químicos em produtos de origem animal (DE LA FUENTE et al, 1998; GARCIA-GARCIA et al, 2000; REDONDO et al, 1999).

TickGard<sup>PLUS</sup> (Intervet Australia Pty. Ltd., 91-105 Harpin Street, Bendigo East, Victoria) e Gavac<sup>TM</sup> (Heber Biotec S.A., Havana, Cuba) são duas vacinas baseadas em Bm86 que foram desenvolvidos na década de 1990 na Austrália e Cuba, respectivamente (DE LA FUENTE et al., 2007). Bm86 é uma glicoproteína isolada de *R. (B.) microplus*, que está localizada predominantemente na membrana das células do intestino dos carrapatos (GOUGH; KEMP, 1993). O gene da Bm86 de *R. (B.) microplus* é expresso em ovos alguns dias após a oviposição, em larvas não alimentadas ou alimentadas com sangue, em ninfas e em machos e fêmeas adultas (NIJHOF et al. De 2009). Além disso, foi demonstrado que Bm86 é expressa nos ovários de fêmeas adultas parcialmente ingurgitadas. Experimentos de silenciamento do seu gene revelaram que Bm86 desempenha um papel durante o período de alimentação e digestão do sangue em fêmeas de *R. (B.) microplus* alimentadas em bovinos com infecção aguda por *Babesia bovis* (BASTOS et al., 2010). Há uma correlação direta entre a produção de anticorpo policlonal anti-Bm86 e a proteção contra infestação de *R. (B.) microplus* em bovinos imunizados. Os anticorpos anti-Bm86 aparentemente ligam-se à superfície de células epiteliais no intestino do carrapato e interferem na endocitose, causando a lise celular e reduzindo a eficiência reprodutiva em fêmeas ingurgitadas (RIDING et al., 1994; WILLADSEN, 1997). O papel da Bm86 na endocitose foi questionado por Nijhof et al. (2009), porque o seu nível de expressão não aumentou durante a sucção de sangue.

Um estudo realizado em Mato Grosso do Sul, Brasil, com TickGard<sup>PLUS</sup> e Gavac<sup>TM</sup> utilizando uma cepa de *R. (B.) microplus* isolada em Campo Grande rendeu 46,4% e 49,2% de eficácia, respectivamente (ANDREOTTI, 2006). Estes resultados variaram daqueles previamente relatados para ambas as vacinas anti-*R. (B.) microplus* em outras partes do mundo. O nível de eficácia relatada para vacinas contendo uma forma recombinante da Bm86 varia de acordo com, entre outros fatores, o sistema de expressão utilizado para a produção de vacinas, características da população de carrapatos alvo e fatores do hospedeiro (DE LA FUENTE et al., 1999; PATARROYO et al., 2002; RAND et al., 1989; RODRIGUEZ et al., 1995; SITTE et al., 2002; ANDREOTTI et al., 2008; PARIZI et al., 2009). Postulou-se que as variações na sequência do locus gênico da Bm86 estão associadas à baixa suscetibilidade de determinadas populações de *R. (B.) microplus* quando infestando bovinos imunizados com as vacinas comerciais baseadas em Bm86 (GARCÍA-GARCÍA et al. 1999; GARCÍA- GARCÍA et al. 2000).

O grau para o qual as variações de sequência se correlacionam com o grau de eficácia das vacinas baseadas em Bm86 continua a ser totalmente desconhecido. Com base na análise de polimorfismo do gene Bm86 em isolados Sul-Americanas de *R. (B.) microplus*, Sossai et al. (2005) sugeriram que o isolamento geográfico não é o único fator determinante da variação genômica. Foi sugerido que uma diferença maior do que 3% na sequência de aminoácidos entre o antígeno recombinante e a proteína nativa Bm86 da população de carrapatos alvo resulta em vacinação ineficiente (GARCÍA- GARCÍA et al. 1999). A semelhança entre as sequências da proteína Bm86 da estirpe de Campo Grande e o antígeno recombinante utilizado nas vacinas comerciais foi de 96,5% (ANDREOTTI et al., 2008). Assim, a utilização da proteína Bm86 recombinante de Campo Grande (rBm86-CG) como antígeno para a imunização de bovinos poderia resultar em uma maior eficácia da vacina contra *R. (B.) microplus* isolado de Mato Grosso do Sul.

Dos 205 milhões de cabeças de gado no rebanho nacional relatados em 2009, 13,9% era do Mato Grosso do Sul (IBGE, 2011). A evolução da resistência aos acaricidas químicos disponíveis no mercado é um desafio constante para os produtores deste estado e é um dos principais focos de pesquisa e desenvolvimento, na tentativa de criar novas estratégias para o controle de *R. (B.) microplus*, objetivando uma pecuária de forma sustentável (ANDREOTTI et al. 2011). Neste trabalho, a rBm86-CG foi produzida utilizando o sistema de expressão baseado em *Pichia pastoris* para testar a hipótese de que esta proteína, por ser oriunda de uma

cepa local, aumentaria a proteção contra a infestação de *R. (B.) microplus* em bovinos imunizados em Mato Grosso do Sul. Portanto, são apresentados os resultados de um ensaio de imunização com o antígeno recombinante Bm86-CG.

## Material e métodos

### 1. Carrapatos

*R. (B.) microplus* utilizados neste estudo foram obtidos a partir de uma colônia de laboratório mantida na Embrapa Gado de Corte. Estes carrapatos foram coletados originalmente de bovinos infestados em Campo Grande - MS, Brasil. Bovinos foram infestados com larvas deste carrapato e, após o ingurgitamento, teleóginas foram colhidas, incubadas em câmaras de umidade a 28 °C e 95% de umidade relativa, para oviposição. As larvas foram utilizadas para infestação 18 dias após a eclosão.

### 2. Clonagem

O fragmento de DNA de 1.825 pb que corresponde a toda Bm86-CG (número de acesso do GenBank: EU352677.1) (ANDREOTTI et al., 2008) foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores EcoRI-BmCG-F1 (CGGAATTCTCATCCATTTGCTC) e BmCG-KpnI-R2 (TGGAAAGTCAAGTGCGGTACCCC), em termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Alemanha) utilizando Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polimerase de alta fidelidade, e clonado no vetor pPICZαA (Invitrogen). A inserção foi confirmada submetendo o plasmídeo à PCR com os iniciadores 5'AOX1 e 3'AOX1 que flanqueiam o local de múltipla clonagem neste plasmídeo. O plasmídeo resultante foi denominado pPICZαA-BmCG. *Pichia pastoris* foi transformada por eletroporação (MicroPulser, Bio-Rad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, uma alíquota de 80 µL da estirpe X33 de *P. pastoris* eletrocompetentes foi transformada utilizando 10 µg de pPICZαA-BmCG linearizado com SacI, aplicando um pulso de 20 kV durante 5 ms. As células recombinantes foram selecionadas em placas de YPDS contendo Zeocin<sup>™</sup> (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose, 1 M de sorbitol, 2% de agar, 100 µg / mL de zeocina). O DNA dos clones foi extraído utilizando o método de ruptura por esferas de vidro. Um mL de sedimento da cultura foi ressuspensionado com 150 mL de STES (2,42% de Tris base, 2,92% de cloreto de sódio, 0,1% de SDS, 0,372% de EDTA, pH 7,6) em microtubo de 1,5 mL. Cinquenta microlitros de pérolas de vidro (425-600 mm) e 150 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (12:12:1 v/v) foram adicionados à mistura, que foi agitada

em vórtex durante 1 min. e centrifugada a 13.000 x g durante 5 min. O sobrenadante foi precipitado com acetato de potássio, o sedimento recuperado e lavado com etanol 70%. O DNA foi seco ao ar e ressuspendido em água ultrapura esterilizada. O DNA foi quantificado utilizando um Espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA), e armazenado a -20 °C.

### 3. Produção de anticorpos policlonais e colheita de amostras de soro murino

Soros policlonais contra Gavac<sup>TM</sup>, TickGard<sup>PLUS</sup>, extrato de larvas de *R. (B.) microplus* e rBm86-CG foram produzidos utilizando camundongos BALB/c. Para se obter o extrato de larva, 8 g de larvas foram congeladas a -20 °C, macerados utilizando almofariz e pistilo em 150 mM de Tris-HCl, pH 7,4, adicionado a um volume final de 8 mL. O extrato fluido foi sonicada com dois pulsos de 10 s a 60% de amplitude e outros 4 pulsos de 10 s a 20%. O conteúdo final foi filtrado em filtro de seringa (0,22 µm) e armazenado a -20 °C. O extrato de larva foi quantificado e 3 mg de proteína total diluído em 15 mL de 150 mM Tris-HCl, pH 7,4, e emulsionado em 15 mL de adjuvante completo de Freund, o que proporcionou 30 mL de emulsão de extrato das larvas para a imunização. A vacina rBm86-CG foi preparada com 500 µg de proteína rBm86-CG ressuspensão em 5 mL de 150 mM de Tris-HCl, pH 7,4, e emulsionado com 5 mL de adjuvante completo de Freund. Vinte e quatro camundongos BALB/c fêmeas foram divididos em quatro grupos de 6 animais. Cada grupo recebeu uma das quatro vacinas, a uma concentração de 50 µg mL<sup>-1</sup> (Gavac<sup>TM</sup>, TickGard<sup>PLUS</sup> ou rBm86-CG), ou 1.000 µg mL<sup>-1</sup> (extrato de larvas), para cada dose de 100 µL inoculada. Três doses intramusculares foram aplicadas em intervalos de 21 dias. As amostras de soro foram colhidas 21 dias após os camundongos receberem a última imunização.

### 4. Dot blotting para triagem de *P. pastoris* transformantes

Cada clone foi inoculado em 5 mL de meio BMGY (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0, 1,34% de YNB, 4 x 10<sup>-5</sup>% de biotina, 1% de glicerol) e incubado em agitador orbital a 220 rpm, 30 °C, juntamente com os controles negativos. Após 24 h de incubação, as culturas foram centrifugadas a 1.500 x g durante 5 min, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 5 mL de BMMY (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0, 1,34% de YNB, 4 x 10<sup>-5</sup>% de biotina, 0,5% de metanol). As culturas foram incubadas em agitador por mais 4 dias. Cada cultura foi suplementada com 0,5% de metanol (v/v) a cada 24 h. As culturas foram

centrifugadas e os sobrenadantes colhidos em microtubos de 2 mL, tratados com PMSF 1 mM e armazenadas a -20 °C.

Uma membrana de PVDF foi lavada 10 s em metanol e, em seguida, 5 min em água ultrapura esterilizada. Uma alíquota de 5 µL de sobrenadante de cada clone selecionado foi aplicada à membrana de PVDF pré-tratada e seca. Alíquotas de 5 mL de Gavac<sup>TM</sup> e TickGard<sup>PLUS</sup> foram utilizadas como controles positivos. A membrana foi bloqueada utilizando tampão fosfato salina (PBS) contendo 5% de leite desnatado seco, com agitação durante 1 h a 30 °C e, subsequentemente, lavadas duas vezes (5 minutos de cada vez) com PBS-T (PBS mais 0,1% de Tween 80, pH 7,4). Cada membrana foi então incubada com os anticorpos policlonais dos camundongos vacinados com Gavac<sup>TM</sup> ou TickGard<sup>PLUS</sup>, diluídos 1:150 em PBS, em agitação durante 1 h a 30 °C. As membranas foram submetidas a três lavagens adicionais com PBS-T, seguidas por incubação com anticorpo secundário de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluído 1:1.000 em PBS-T. O processo foi completado por três lavagens adicionais com PBS-T e a incubação das membranas em 5 mL de solução de revelação (0,5% de diaminobenzidina, 0,075% de ureia) até se observar a coloração, a qual foi seguida por lavagem em água ultrapura esterilizada. As membranas processadas foram fotodocumentadas.

### 5. Triagem de fenótipo *Mut* em *P. pastoris* transformadas

Fenotipicamente, os clones recombinantes podem ser *Mut*<sup>+</sup> ou *Mut*<sup>S</sup>. O fenótipo *Mut*<sup>S</sup> (lenta utilização de metanol) resulta da perda parcial da atividade de oxidação de álcool causada por uma mutação no gene AOX1 (álcool oxidase 1). Apesar desta mutação, o gene AOX2 ainda é funcional. O resultado é o crescimento lento em metanol em comparação com as taxas de crescimento observadas nas estirpes *Mut*<sup>+</sup>. Ambos fenótipos podem ser produzidos pela estirpe X33. Para a análise genotípica, o DNA extraído de cada clone e o DNA de GS115 (*Mut*<sup>+</sup>) e GS115/albumin (*Mut*<sup>S</sup>) foram submetidos a PCR utilizando dois pares de iniciadores (3'AOX1 com 5'AOX1 e 3'AOX1 com  $\alpha$ -Factor), seguido de caracterização molecular de acordo com as condições estabelecidas pelo fabricante. Os produtos de PCR a partir de DNA genômico de cada clone (*Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>) foram sequenciados com os iniciadores para o promotor *P*<sub>AOX1</sub>. Estas sequências e a sequência da Bm86-CG foram comparados utilizando *software* ClustalW, para alinhamento de sequências.

## 6. Produção de rBm86-CG

Para expressar rBm86-CG, uma colônia isolada de cada clone *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup> foi inoculada num frasco erlenmeyer de 500 mL contendo 25 mL de meio BMGY, e incubada durante a noite em agitador orbital a 220 rpm, 30 °C, até atingir OD<sub>600 nm</sub> = 4 (aproximadamente 16-18 h). As culturas foram posteriormente centrifugadas a 1.500 x g durante 5 min. a temperatura ambiente e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos do clone *Mut*<sup>+</sup> e da X33 negativa foram ressuspensos em aproximadamente 200 mL de meio BMMY, a uma OD<sub>600 nm</sub> = 1,0. Cada cultura foi suplementada com 1% de metanol (v/v) a cada 24 h, por um período total de 96 horas de indução. Os sedimentos do clone *Mut*<sup>S</sup> e da GS115/Albumin foram ressuspensos em 250 mL de meio BMGY e incubados durante a noite. Estas culturas foram novamente centrifugadas, ressuspensas em 200 mL de meio BMMY e incubadas. A indução foi mantida pela suplementação com 0,5% de metanol a cada 24 horas, durante 96 h. Após este período de indução, as culturas foram centrifugadas a 3.300 x g a 4 °C, durante 5 min, e os sobrenadantes separados, tratados com PMSF 1 mM e congelados a -20 °C.

## 7. Purificação e quantificação de rBm86-CG

Os sobrenadantes do material expresso pelos clones *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup> foram quantificados pelo método de curva padrão de albumina sorológica bovina (BSA) em SDS-PAGE. Alíquotas de 50 µL de uma solução de BSA (0,5 µg mL<sup>-1</sup>) foram utilizadas como padrões de quantificação em um gel de poliacrilamida a 7,5%. As bandas formadas no gel foram quantificadas por meio de inspeção visual e pela utilização do *software* 2.0 TotalLab (Amersham / Biosciences, Reino Unido), o qual também serviu para estimar a massa molecular aparente das bandas.

Vinte e cinco mL de sobrenadante do clone *Mut*<sup>+</sup> foram incubados a 4 °C, durante 1 h, com metanol 1:1 (v / v) e as proteínas foram precipitadas por centrifugação a 5,000 x g durante 30 min a 4 °C. Os precipitados de proteínas foram eluídos por adição de tampão de ligação desnaturante (ureia 8 M, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,8, NaCl 500 mM). Esta solução foi carregada em coluna de cromatografia de afinidade de íons Ni<sup>2+</sup> (Ni-NTA, Qiagen, Hilden, Alemanha), previamente equilibrada com tampão de ligação desnaturante. A coluna foi primeiramente lavada com tampão de ligação desnaturante seguido de cinco lavagens com tampão de lavagem desnaturante (pH 6,0). A proteína rBm86-CG foi eluída em tampão de

elução desnaturante (pH 4,0). O processo de purificação foi monitorado em SDS-PAGE 10%. As frações eluídas de elevadas purezas foram reunidas e dialisadas contra PBS.

### **8. Eletroforese e Western blotting de rBm86-CG**

Cinquenta  $\mu$ L de sobrenadante de cada um dos dois clones selecionados foram misturados com 10  $\mu$ L de tampão de SDS-PAGE em separado. Estas amostras foram incubadas durante 6 min a 95 °C, deixadas esfriar e aplicadas (20  $\mu$ L) em gel de poliacrilamida 7,5%. A eletroforese foi executada por 1,5 h a 30 mA em um sistema de eletroforese 2D. Uma eletroforese foi executada com 10  $\mu$ L de sobrenadante *Mut*<sup>+</sup> por poço para a realização do *Western blotting*. As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF pré-tratada com metanol durante 10 s e água ultrapura esterilizada durante 5 min. A transferência foi realizada com um sistema imerso em tampão de transferência (0,3% de base Tris, 1,44% glicina, 15% metanol, pH 8,4) a 100 mA durante 2 h. A membrana foi lavada com PBS, deixada secar em estufa a 25 °C durante 1 h, corada com solução de Ponceau S (0,5% de Ponceau S, 1% de ácido acético glacial) e cortada em tiras. Estas tiras foram bloqueadas com PBS contendo 5% de leite em pó desnatado em agitação a 30 °C, durante 1 h, lavadas duas vezes com PBS-T, durante 5 min., e incubadas com anticorpo primário diluídos 1:150 em PBS a 30 °C, durante 1 h. Uma tira foi incubada com cada soro: anti-Gavac, anti-TickGard, anti-extrato de larva e anti-rBm86-CG. Cada tira foi lavada duas vezes durante 5 minutos com PBS-T e incubada com anticorpo secundário de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:1000 em PBS-T a 30 °C, durante 1 h. Seguiu-se três lavagens adicionais, enxague em água ultrapura e incubação em solução de revelação (5 mL de água Milli-Q, 5 mg de diaminobenzidina, 0,75 mg de NH<sub>4</sub>) até que bandas bem definidas aparecessem sobre a membrana de PVDF.

### **9. Imunoproteção em bovinos**

A proteína rBm86-CG expressa por *P. pastoris* foi emulsificada com Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris) para produzir doses de 2 mL com 100  $\mu$ g de antígeno. Um ensaio controlado foi realizado para avaliar a capacidade imunogênica e protetora do antígeno rBm86-CG. Bovinos de um ano de idade da raça Holandês foram ambientados antes da experimentação e receberam cuidados veterinários adequados durante o estudo. Os bovinos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de seis animais cada. Um grupo foi imunizado com o antígeno rBm86-CG, seguindo o protocolo descrito abaixo. Os outros seis

animais serviram de grupo controle e foram tratados conforme o protocolo, exceto que receberam injeções de 2 mL de adjuvante sem antígeno. Seguiu-se o protocolo de Andreotti et al. (2006), com pequenas modificações, de modo que cada animal foi injetado por via intramuscular nas semanas 0, 2 e 4. Amostras de soro de cada animal foram colhidas semanalmente antes e após a imunização. Vinte e um dias após a última dose, os animais foram desafiados com 15.000 larvas de *R. (B.) microplus*, isolado de Campo Grande, liberadas ao longo do dorso do animal em três aplicações, durante uma semana. A coleta de carrapatos foi realizada diariamente, logo que as fêmeas ingurgitadas começaram a se desprender espontaneamente dos animais controle. Os carrapatos foram levados para o laboratório, pesados e incubados a 29 °C em 85% de umidade relativa até a postura dos ovos ser completada. As massas de ovos foram pesadas e incubadas para determinar a taxa de eclosão, ou seja, a fertilidade.

#### **10. Coleta e análise do soro dos bovinos**

Amostras de sangue foram obtidas a partir dos animais antes da imunização e, após, semanalmente. O soro obtido a partir das amostras de sangue foi congelado para posterior análise por ELISA. As amostras de soro foram agrupadas por grupo de tratamento e data de coleta antes do teste. Placas de microtitulação foram revestidas com uma solução de 1 mg mL<sup>-1</sup> de rBm86-CG em tampão carbonato 20 mM (pH 9,6) durante a noite a 4 °C. As placas foram bloqueadas com 2% de albumina sorológica bovina em PBST (200 µL por poço) e depois lavadas cinco vezes com PBST. As placas foram incubadas com soro bovino diluído a 1:100 em PBST (100 µL por poço) durante 45 min a 37 °C e lavadas novamente três vezes. Em seguida, 50 µL de anticorpo secundário de coelho anti-IgG de bovino conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, MO) diluído 1:20.000 em PBS foram adicionados e a placa foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente, seguido por mais três lavagens com PBST. Ao final, foram adicionados 50 µL do substrato cromógeno o-fenilenodiamina (1,0 mM) e a reação foi interrompida após 15 min com 100 µL de NaOH (0,2 M). Um leitor de microplacas foi utilizado para fazer a leitura da placa a 490 nm.

#### **11. Análise estatística e de eficácia**

Os efeitos de vacinação sobre a biologia do carrapato e sua porcentagem de eficácia foram determinados como descrito por Garcia-Garcia et al. (1999) e Andreotti (2006). Resumidamente, foram calculadas as taxas de redução associadas a imunização com Bm86-



CG em relação ao grupo não vacinado de fêmeas adultas (% DT), de capacidade de postura (% OD) e de fertilidade (% DF). A eficácia da vacina foi calculada como  $100 \times [1 - (CRT \times CRO \times CRF)]$ , onde CRT, CRO e CRF são, respectivamente, a redução do número de fêmeas adultas, a redução na capacidade de postura e a redução na fertilidade. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os dados biológicos e avaliar a eficácia da vacina. Os níveis médios de anticorpos foram determinados para cada grupo e comparados utilizando ANOVA, como descrito anteriormente (ANDREOTTI, 2006).

## **Resultados**

### **1. Produção e caracterização de rBm86-CG expressa em *P. pastoris***

Um plasmídeo recombinante foi construído com a inserção da sequência do gene da proteína Bm86-CG no local de múltipla clonagem do plasmídeo pPICZαA, entre os locais de restrição EcoRI e KpnI (figura 1). A sequência da inserção foi confirmada por sequenciamento e alinhamento com o gene Bm86-CG (número de acesso do GenBank: EU352677.1) com 100% de identidade. Esta sequência foi clonada considerando o cassete de expressão controlada pelo promotor do gene AOX1. O local de múltipla clonagem foi mantido antes da sequência do gene Bm86-CG, o que permite uma futura clonagem de outras sequências de interesse.

### **2. Expressão da proteína rBm86-CG em *P. pastoris***

Os clones *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup> foram selecionados e induzidos para a expressão. O rendimento total da proteína no sobrenadante, incluindo rBm86-CG expressa pelos clones *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>, foi de 870 mg L<sup>-1</sup>. A análise do sobrenadante da expressão da proteína em SDS-PAGE 7,5% revelou uma banda de aproximadamente 80 kDa. O peso molecular esperado para a proteína rBm86-CG expressa neste sistema era de 79,1 kDa, correspondendo à banda de SDS-PAGE observada (figura 2).

### **3. Recuperação e purificação da proteína rBm86-CG**

Na análise da eletroforese dos sobrenadantes das culturas, os níveis recuperados de rBm86-CG foram de 62,5 e 32 mg L<sup>-1</sup> para *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>, respectivamente. A purificação em coluna de níquel seguida por SDS-PAGE revelou uma proteína com um peso molecular de aproximadamente 80 kDa (figura 3).

#### 4. Caracterização da proteína rBm86-CG

Camundongos foram utilizados para avaliar a reação imunológica cruzada entre rBm86-GC e as formas recombinantes comerciais e nativa da proteína. A análise por *Western blotting* da proteína rBm86-CG realizada com amostras de soros de camundongos imunizados com Gavac<sup>TM</sup>, TickGard<sup>PLUS</sup>, extrato das larvas de *R. (B.) microplus* e rBmCG revelou afinidade para uma proteína de aproximadamente 80 kDa. Estes resultados indicaram que a proteína rBmCG contém epítomos com o potencial para proteger os animais contra infestação por *R. (B.) microplus*.

#### 5. Soroconversão dos bovinos vacinados com rBm86-CG

Ao contrário dos animais controle, os bovinos vacinados desenvolveram uma resposta de anticorpos significativa contra rBm86-CG (figura 4) ( $p < 0,05$ ). Os níveis de anticorpos atingiram um pico 21 dias após a terceira imunização. A resposta imune humoral de bovinos para o antígeno rBm86-CG mostrou uma correlação negativa em relação ao número de teleóginas. Uma diminuição no nível de anticorpos contra rBm86-CG nos animais vacinados foi observada uma semana após a infestação, equivalente ao observado na semana anterior a que os carrapatos foram colocados nos mesmos animais (figura 4). A cinética da resposta de anticorpo entre bovinos vacinados com rBm86-CG foi semelhante a dos animais imunizados com Gavac<sup>TM</sup> (RODRÍGUEZ et al., 1994) e TickGard<sup>PLUS</sup> (WILLADSEN et al., 1989).

#### 6. Imunoproteção

A coleta diária das teleóginas foi encerrada 15 dias após o início do desprendimento. As dinâmicas de desprendimento e de produção de ovos mostraram que um pico significativo no número de teleóginas e no peso de massa de ovos ocorreu no quarto dia ( $p < 0,05$ , dados não apresentados). A imunização de bovinos com rBm86-CG reduziu o número de fêmeas adultas sobre eles em 28%. Não foi observada diminuição na capacidade de postura. A fertilidade foi reduzida em 8% (tabela 1). A vacinação do gado com o antígeno rBm86-CG proporcionou 31% de eficácia contra a infestação por *R. (B.) microplus*.

#### Discussão

A forma recombinante de Bm86-GC de *R. (B.) microplus* foi produzida utilizando o sistema de expressão baseado em *P. pastoris* para testar a sua capacidade imunoprotetora em bovinos contra a infestação de carrapatos. A secreção de rBm86-CG por *P. pastoris* e o

bioprocesso relatado aqui simplificaram a purificação do antígeno. Este processo aumenta a recuperação e pureza dos antígenos Bm86 recombinantes expressos no sistema de levedura para a produção da vacina (CANALES et al., 2008). A resposta imune humoral específica em bovinos vacinados, detectada por ELISA, confirma a imunogenicidade de rBm86-CG. Os resultados dos *dot blotting* revelaram que os anticorpos dos bovinos vacinados reconheceram uma proteína no extrato de larvas com um peso molecular correspondente a Bm86, que indicou semelhança conformacional entre rBm86-CG e a forma nativa da proteína.

A imunoproteção dos bovinos vacinados com a formulação experimental de rBm86-CG resultou em um nível de eficácia de 18% menor do que o observado anteriormente com a vacina baseada em Bm86, Gavac<sup>TM</sup>, contra a cepa de *R. (B.) microplus* de Campo Grande (ANDREOTTI, 2006). Análises de bioinformática por Andreotti et al. (2008) revelaram que a semelhança da sequência de aminoácidos entre os antígenos Bm86-CG e Bm86, presente na Gavac<sup>TM</sup>, foi de 96,3%. A eficácia de 31% alcançada com rBm86-CG foi consideravelmente maior do que a eficácia da Bm86 contra uma cepa de *R. (B.) microplus* da Argentina (GARCÍA-GARCÍA et al., 2000). A relação entre eficácia da vacina e variabilidade de sequências foi questionada porque há outros fatores além da sequência de aminoácidos primária do antígeno que influenciam a eficácia de uma vacina (WILLADSEN, 2008). O clone de DNA utilizado para produzir rBm86-CG compreende uma sequência que codifica para 608 dos 650 aminoácidos de todo *open reading frame* da Bm86. Dez dos aminoácidos que faltam estão localizados na extremidade N-terminal e o restante na C-terminal da sequência da proteína. Os aminoácidos que faltam não parecem conter características estruturais previstas de elevado potencial imunogênico (ANDREOTTI et al., 2008). Aspectos relacionados com a formulação da vacina ou polimorfismos do fator hospedeiro podem ter causado a eficácia menor do que o esperado, obtida em bovinos imunizados com o antígeno rBm86-CG.

É possível que na formulação da vacina experimental tenha faltado algum componente que poderia ter aumentado a imunogenicidade de rBm86-CG. Avanços em vacinologia permitiram o refinamento de adjuvantes e outros componentes de formulações de antígenos. Mudanças na cadeia de produção de alimentos fizeram necessária a substituição de Montanide 888 (de fonte animal) por Montanide 888 VG (de fonte vegetal) na Gavac<sup>TM</sup> (SEGURA et al., 2009). Duas vacinações iniciais com Gavac<sup>PLUS</sup> provocaram uma elevada resposta de anticorpos anti-Bm86 em bovinos *naïve*, provocando efeitos semelhantes em *R. (B.)*

*microplus*, como os observados com a administração de três doses (VARGAS et al., 2010). A imunogenicidade do antígeno rBm86-CG poderia ser reforçada pelo uso de outros adjuvantes. Tem sido mostrado que alguns componentes da parede celular bacteriana têm potencial altamente imunogênico. Monofosforil-lípido A, um derivado de lipopolissacarídeos, foi aprovado para utilização em combinação com hidróxido de alumínio numa vacina de papilomavírus humano comercial (MCKEE et al., 2010).

A variação da resposta imune entre os animais pode prejudicar o desenvolvimento de vacinas recombinantes e peptídicas. Foi demonstrado que polimorfismos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) podem afetar a magnitude da resposta imune do hospedeiro à vacinação (FELLAY et al., 2011). A deleção de um único aminoácido no sítio de reconhecimento do antígeno por uma molécula de MHC de classe II afetou a resposta à vacina TickGard (SITTE et al., 2002). A observação por Andreotti et al. (2008), que sugere que as porções estruturais da rBm86-CG podem se ligar a moléculas MHC classe I, deve ainda ser testada experimentalmente. Uma análise imunogenética dos bovinos deve ser levada em consideração durante os esforços de pesquisa para desenvolver a próxima geração de vacinas comerciais anti-*R. (B.) microplus*, buscando-se um perfil de eficácia que é consistente dentro das raças.

A eficácia obtida com vacinas baseadas em Bm86 contra *R. (B.) microplus* pode variar de 10 a 89% (WILLADSEN, 2008). Devido à sua elevada eficácia contra *R. (B.) annulatus*, a utilização de vacinas baseadas em Bm86 está a ser explorada para fins de erradicação (MILLER et al. 2011). Avanços científicos e tecnológicos oferecem a oportunidade de desenvolver novas vacinas contra carrapatos. Tecnologias existentes, baseadas no paradigma Bm86 fornecem a base para desenvolver uma vacina multi-antígeno com um perfil melhorado e produzindo um alto nível de eficácia contra *R. (B.) microplus* e *R. (B.) annulatus*. O impacto positivo das vacinas contra carrapatos para os bovinos já foi documentado (DE LA FUENTE et al., 2007). Uma segunda geração de vacinas anti-*R. (B.) microplus* deve atender a critérios rigorosos visando oportunidades de investimento em pesquisa e desenvolvimento requeridos pelas empresas internacionais de saúde animal com a expectativa de comercializar a tecnologia a nível mundial (MEAT & LIVESTOCK AUSTRALIA LIMITED, 2008). rBm86-CG é um antígeno que pode ser utilizado em uma vacina polivalente, como parte de um programa integrado para o controle de *R. (B.) microplus* no Mato Grosso do Sul.

## Agradecimentos

Este projeto foi financiado pela Embrapa Gado de Corte, CNPq e Fundect. Adalberto A. Pérez de León recebeu suporte, em parte, do projeto USDA-ARS nº 6205-32000-031-00D. O USDA é um provedor de oportunidades iguais e empregador.

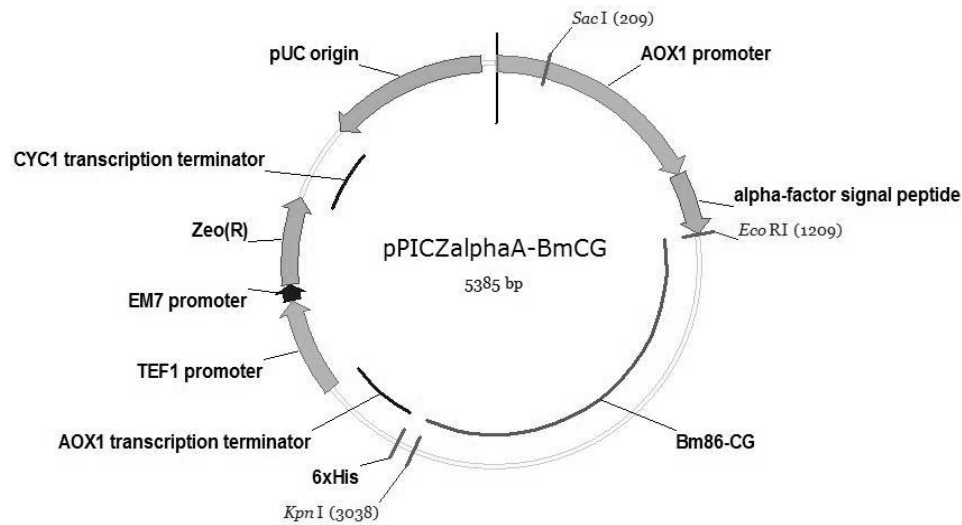
## Referências

- Andreotti R. Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. *Rev Bras Parasitol Vet* 2006; 15(3): 97-100.
- Andreotti R, Pedroso MS, Caetano AR, Martins NF. Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants Bm86 Campo Grande strain, Bm86 and Bm95. *Rev Bras Parasitol Vet* 2008; 17(1): 93-98.
- Andreotti R, Guerrero FD, Soares MA, Barros J C, Miller RJ, Pérez de León A. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(2): 127-33.
- Bastos RG, Ueti MW, Knowles DP, Scoles GA. The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute *Babesia bovis* infection. *Parasit Vectors* 2010; 3 : 1-11.
- Boué O, Farnós O, González A, Fernández R, Acosta JA, Valdés R, et al. Production and biochemical characterization of the recombinant *Boophilus microplus* Bm95 antigen from *Pichia pastoris*. *Exp Appl Acarol* 2004; 32 : 119-28.
- Buckholz RG, Gleeson MA. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology* 1991; 9 : 1067-1072.
- Canales M, Almazan C, Naranjo V, Jongejan F, de la Fuente J. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnol* 2009, 9 : 29.
- Canales M, de la Lastra JM, Naranjo V, Nijhof AM, Hope M, Jongejan F, et al. Expression of recombinant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol* 2008; 8 : 14.
- De la Fuente J, Rodríguez M, Redondo M, Montero C, García-García JC, Méndez L, et al. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine* 1998; 16(4): 366-373.
- De la Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, García-García JC, Méndez L, et al. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genet Anal* 1999; 15(3-5): 143-148.
- De la Fuente J, Almazán C, Canales M, Pérez de la Lastra JM, Kocan KM, Willadsen P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res Rev* 2007; 8(1): 23-28.
- Fellay J, Frahm N, Shianna KV, Cirulli ET, Casimiro DR, Robertson MN, et al. Host genetic determinants of T cell responses to the MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef vaccine in the step trial. *J Infect Dis* 2011; 203(6): 773-779.

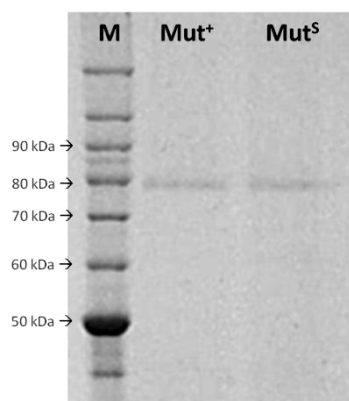
- Furlong J. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. *A Hora Veterinária* 2004; 23(137): 53-56.
- García-García JC, Gonzalez IL, González DM, Valdés M, Méndez L, Lamberti J, et al. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol* 1999; 23(11): 883-895.
- García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 2000; 18(21): 2275-2287.
- Gough JM, Kemp DH. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. *J Parasitol* 1993; 79(6): 900-907.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Municipal Livestock Production – 2009 [on line]. 2011 [cited 2011 Oct 10]. Available from: [http://www.ibge.gov.br/english/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=1761&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/english/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1761&id_pagina=1).
- Invitrogen. *Pichia* Expression Kit. For expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. Catalog no. K1710-01, 2009.
- McKee AS, MacLeod MK, Kappler JW, Marrack P. Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? *BMC Biol* 2010; 8: 37.
- Miller R, Estrada-Peña A, Almazán C, Allen A, Jory L, Yeater K, et al. Exploring the use of an anti-tick vaccine as a tool for the integrated eradication of the cattle fever tick, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. Submitted for publication 2011.
- Meat & Livestock Australia Limited. The development of a new or improved vaccine against *Boophilus microplus*: opportunities for R&D investment. North Sydney, New South Wales, 2008, pp. 64.
- Nijhof AM, Balk JA, Postigo M, Jongejan F. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. *BMC Mol Biol* 2009; 10: 112.
- Parizi LF, Pohl PC, Masuda A, Vaz Ida S Jr. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18(1): 1-7.
- Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Pimentel JC, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88(3-4): 163-172.
- Rand KN, Moore T, Sriskantha A, Spring K, Tellam R, Willadsen P, et al. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(24): 9657-9661.
- Redondo M, Fragoso H, Ortiz M, Montero C, Lona J, Medellín JA, et al. Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac and amidine treatments. *Exp Appl Acarol* 1999; 23(10) : 841-849.
- Riding GA, Jarmey J, McKenna RV, Pearson R, Cobon GS, Willadsen P. A protective “concealed” antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *J Immunol* 1994; 153(11): 5158-5166.

- Rodríguez M, Rubiera R, Penichet M, Montesinos R, Cremata J, Falcon V, et al. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J Biotechnol* 1994; 33 : 135-146.
- Rodríguez M, Massard CL, Da Fonseca AH, Ramos NF, Machado H, Labarta, V, et al. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. *Vaccine* 1995; 13(18): 1804-1808.
- Segura R, Pimentel R, Pérez E, Moreira A, Pérez C, Recio M, et al. Reformulation study of Gavac immunogen. *Vacci Monitor* 2009. 18: Suppl. 1, Abstract 37. Available from: <http://www.bvv.sld.cu/vaccimonitor/Vm2009/abstracts.pdf>.
- Sitte K, Brinkworth R, East IJ, Jazwinska EC. A single amino acid deletion in the antigen binding site of BoLA-DRB3 is predicted to affect peptide binding. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 85(3-4): 129-135.
- Sossai S, Peconick AP, Sales-Junior PA, Marcelino FC, Vargas MI, Neves ES, et al. Polymorphism of the *bm86* gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol* 2005; 37: 199–214.
- Vargas M, Montero C, Sánchez D, Pérez D, Valdés M, Alfonso A, et al. Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavac<sup>plus</sup> vaccine against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. *BMC Vet Res* 2010; 6: 43.
- Willadsen P. Novel vaccines for ectoparasites. *Vet Parasitol* 1997; 71(2-3): 209-222.
- Willadsen P. Anti-tick vaccines. In: Bowman AS, Patricia A. *Ticks: Biology, Disease and Control*, eds. Nuttall. Cambridge University Press, Cambridge; 2008. p. 424-446.
- Willadsen P, Jongejan F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol Today* 1999; 15(7): 258-262.
- Willadsen P, Kemp DH. Vaccination with ‘concealed’ antigens for tick control. *Parasitol Today* 1988; 4 : 196-198.
- Willadsen P, Mckenna RV. Vaccination with ‘concealed’ antigens: myth or reality? *Parasite Immunol* 1991; 13 : 605-616.
- Willadsen P, Riding GA, Mckenna RV, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, et al. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J Immunol* 1989; 143 : 1346-1351.

## FIGURAS E TABELAS

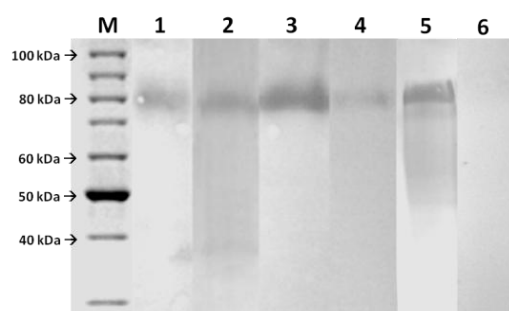


**Figura 1.** Mapa do plasmídeo pPICZ $\alpha$ A-BmCG utilizado para transformar *P. pastoris*. O mapa foi criado no software Vector NTI 8; AOX1 promoter: promotor fortemente induzida por metanol; SacI: enzima utilizada para linearizar o plasmídeo antes da transformação em *P. pastoris*; alpha-factor: sequência correspondente do peptídeo secretor de rBm86-CG; EcoRI: sítio de restrição utilizado para a clonagem na região 5'; Bm86-CG: gene parcial da Bm86-GC inserido no plasmídeo; KpnI: sítio de restrição utilizado para a clonagem na região 3'; AOX1 transcription terminator: sequência que determina o fim da transcrição; Zeo(R): gene de resistência à zeocina<sup>TM</sup>, permitindo a seleção de *P. pastoris* transformantes; pUC origin: origem de replicação de *E. coli*.

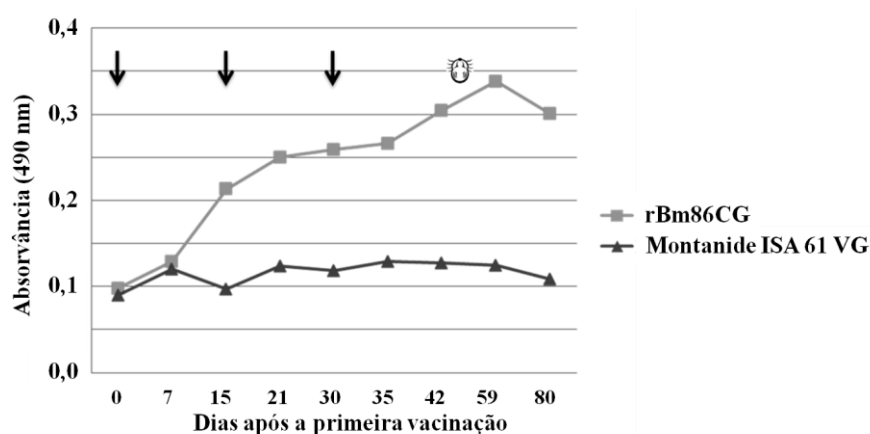


**Figura 2.** Expressão de rBm86-CG por *P. pastoris*. SDS-PAGE 7,5% da fração obtida pelo processo de cromatografia em coluna de níquel do sobrenadante da cultura dos clones *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>. M: Marcador BenchMark<sup>TM</sup> Loadler Protein que varia em peso molecular de 10-220 kDa. *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>: 10  $\mu$ g por poço de rBm86-CG expressa pelos clones *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>.





**Figura 3.** Western blotting da proteína rBm86-CG expressa pelo clone *Mut*<sup>+</sup>. 1: soro anti-Gavac<sup>TM</sup>; 2: soro anti-TickGard<sup>PLUS</sup>; 3: soro anti-extrato de larvas; 4: soro anti-rBm86-CG; 5: extrato de larva como antígeno reconhecido pelo soro de bovino imunizado com rBm86-CG; 6: controle negativo; M: Marcador de proteína BenchMark<sup>TM</sup> para eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida que varia de peso molecular de 10-220 kDa.



**Figura 4.** Perfil de resposta de anticorpos de bovinos vacinados com o antígeno rBm86-CG. Os animais controle foram injetados somente com adjuvante Montanide ISA 61 VG. Os títulos de anticorpos de bovinos imunizados estão representados pelo valor da  $DO_{490\text{ nm}}$ . As amostras de soro foram diluídas 1:100 e agrupadas por dia de teste. As setas indicam os dias das vacinações. O ícone carrapato indica o dia 51 após a primeira vacinação, que é quando os bovinos foram infestados.

**Tabela 1.** Efeitos sobre fêmeas e sua descendência e eficácia da vacinação com o antígeno rBm86-CG contra a infestação de bovinos com *R. (B.) microplus* isolado CG.

| Antígeno | % Redução <sup>a</sup> (vacinados/controles) |               |               | Eficácia (%) <sup>b</sup> |
|----------|----------------------------------------------|---------------|---------------|---------------------------|
|          | DT                                           | DO            | DF            |                           |
| rBmCG    | 28                                           | -5            | 8             | 31                        |
|          | (3,305/4,594)                                | (0.138/0.145) | (88.66/96.63) |                           |

<sup>a</sup>A porcentagem de redução foi calculada em relação ao grupo controle não vacinado: DT, fêmeas adultas; DO, capacidade de oviposição; DF, fertilidade.

<sup>b</sup>Eficácia (%) = 100 [1 - (CRT x CRO x CRF)]; onde CRT: redução do número de fêmeas adultas; CRO: redução da capacidade de postura; CRF: redução da fertilidade.

## ARTIGO 2

[ANDREOTTI, R. et al. Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. **Vaccine**, v. 30, n. 47, p. 6678–85, 19 out. 2012]

### IMUNOPROTEÇÃO CONTRA A INFESTAÇÃO DE CARRAPATOS EM BOVINOS VACINADOS COM UM INIBIDOR DE TRIPSINA RECOMBINANTE DE *Rhipicephalus microplus*

Renato Andreotti<sup>a</sup>, Rodrigo Casquero Cunha<sup>a</sup>, Mariana Aparecida Soares<sup>a</sup>, Felix D. Guerrero<sup>b</sup>,  
Fábio P. Leivas Leite<sup>c</sup>, Adalberto A. Pérez de León<sup>b</sup>

<sup>a</sup>EMBRAPA Beef Cattle, Avenida Rádio Maia, 830 – Vila Popular – Caixa Postal 154, CEP 79106-550 – Campo Grande, MS, Brazil

<sup>b</sup>USDA-ARS Knippling-Bushland U.S. Livestock Insects Research Laboratory, 2700 Fredericksburg Road, Kerrville, TX 78028, USA

<sup>c</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Institute of Biology, Department of Microbiology and Parasitology, Rua Gomes Carneiro, 1 – Centro – Caixa Postal 354, CEP 96010-610 – Pelotas, RS, Brazil

#### Resumo

O carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, é considerado globalmente como o ectoparasita de bovinos mais importante economicamente. Seu controle é conseguido primariamente através do uso de acaricidas. Esta abordagem é prejudicada pelo desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes aos acaricidas comerciais. A vacinação contra a infestação de *R. (B.) microplus* é uma tecnologia que pode ser integrada para o efetivo controle do carrapato em bovinos. As proteínas que pertencem à família de ITPB tipo Kunitz são abundantes em glândulas salivares, intestino médio e ovários deste carrapato. Estes órgãos são alvos atrativos para o desenvolvimento de uma nova vacina contra o carrapato do boi. Analisou-se, pela primeira vez, a eficácia contra a infestação de carrapatos em bovinos utilizando uma vacina contendo uma proteína recombinante de *R. (B.) microplus*, a qual é membro da família Kunitz, produzida num sistema de expressão baseado em levedura. A levedura *Pichia pastoris* foi modificada por engenharia genética para produzir a versão recombinante de um inibidor de tripsina, que é expresso em larvas de *R. (B.) microplus* (rRmLTI). A imunização com rRmLTI ofereceu 32% de eficácia contra *R. (B.) microplus*. O peso molecular estimado de rRmLTI foi de 46 kDa. A homologia estrutural com a forma nativa do inibidor de tripsina de larvas foi documentada pelo reconhecimento da rRmLTI em *Western blotting* utilizando anticorpos policlonais de camundongos imunizados com extrato de larvas de carrapato ou com rRmLTI. Análises de bioinformática das sequências parciais de nucleotídeos e de seus aminoácidos deduzidos indicaram que a rRmLTI assemelha-se a BMTI-6, que é uma proteína com três domínios Kunitz, presente em ovário e tecido adiposo de carrapatos.

**Palavras-chave:** *R. (B.) microplus*, carrapato, bovino, vacinação, inibidor de tripsina, proteínas recombinantes

## 1. Introdução

O ectoparasitismo do gado pelo carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, inflige perdas econômicas para a indústria pecuária. A produtividade da pecuária bovina é prejudicada pelos efeitos diretos do ectoparasitismo e indiretamente pelo papel que *R. (B.) microplus* desempenha como vetor de agentes infecciosos que causam a Babesiose e Anaplasmose bovinas [1,2]. O controle de *R. (B.) microplus* é feito principalmente através da utilização de acaricidas químicos [3]. No entanto, os acaricidas químicos não têm sido utilizados corretamente e isto levou ao desenvolvimento de populações de *R. (B.) microplus* resistentes aos acaricidas [4,5].

A vacinação de bovinos com moléculas de carrapatos formuladas como antígenos para induzir uma resposta imune protetora é uma estratégia útil para o controle integrado dos carrapatos dos bovinos [7,10,36]. Os benefícios da utilização de vacinas anti-carrapatos como parte de um programa de controle integrado incluem a redução na utilização de acaricidas, prolongando a vida útil destes por retardar o aparecimento de resistência, a redução na incidência de doenças transmitidas por *R. (B.) microplus* e a diminuição dos custos de produção [6,8,9]. A única molécula de carrapato atualmente desenvolvida e comercializada como um componente de uma vacina anti-carrapato é a proteína Bm86 de *R. (B.) microplus*. A Bm86 é uma glicoproteína expressa em ovos alguns dias após a oviposição, em larvas em jejum e alimentadas com sangue, em ninfas, em machos adultos e nos ovários de fêmeas adultas parcialmente ingurgitadas [11]. O gene da Bm86 parece ser reprimido nos ovários de carrapatos que se alimentam em bovinos infectados com *B. bovis* [12]. Vacinas anti-carrapato com base na versão recombinante da Bm86 (rBm86) foram registradas na Austrália, sob o nome comercial TickGARD<sup>®</sup>, e em Cuba, como Gavac<sup>®</sup>, na década de 1990 [13,36]. As vacinas baseadas em rBm86 são altamente eficazes contra *R. (B.) annulatus* [38,39], no entanto, o nível de eficácia contra *R. (B.) microplus* varia, entre outras coisas, de acordo com características da população de carrapatos alvo e fatores do hospedeiro [14,15]. Ensaios realizados no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, revelaram que a eficácia de vacinas baseadas em Bm86 contra *R. (B.) microplus* de Campo Grande variou de 31% a 49% [17,18].

A eficácia em torno de 99% contra *R. (B.) annulatus*, obtida com vacinas baseadas em Bm86, é uma indicação do elevado nível de imunoproteção anti-*R. (B.) microplus* que uma nova molécula antigênica e imunogênica de carrapatos, ou as suas combinações, pode estimular em bovinos vacinados. Tal nível de eficácia oferece a oportunidade de incorporar a

vacinação como uma ferramenta para a erradicação integrada do carrapato do boi [40,41]. A busca de antígenos protetores que sejam altamente eficazes contra *R. (B.) microplus* continua. Inibidores de proteases têm recebido atenção como um grupo de moléculas encontradas em carrapatos com potencial para serem utilizados como imunógenos em uma vacina anti-carrapato. Vários inibidores de tripsina, que estão presentes nas fases de ovos, larvas e adultos de *R. (B.) microplus* já foram descritos [19-21]. Foi sugerido que inibidores de serina-proteases de *R. (B.) microplus* podem estar envolvidos na fixação das larvas no local da picada e na alimentação de sangue [22]. Inibidores de tripsina de larvas de *R. (B.) microplus* purificados em sua forma nativa induziram uma resposta imune protetora em bovinos vacinados rendendo 72,8% de eficácia e redução de 69,7% no número de fêmeas adultas que completaram a fase parasitária do seu ciclo de vida [22]. No entanto, um peptídeo desenhado a partir de um dos inibidores de tripsina de larvas de *R. (B.) microplus* produziu apenas 18,4% de imunoproteção contra a infestação de carrapatos em bovinos cruzados [23].

A utilização de inibidores de tripsina recombinantes pode contornar o desafio de ter de purificar inibidores de tripsina em quantidades suficientes para conduzir testes de vacinação contra o carrapato do boi [21,22]. Um *expressed sequence tag* (EST) foi anteriormente identificado em larvas de *R. (B.) microplus*. Este EST corresponde à sequência amplificada a partir de tecido de ovário e codifica para um fragmento de um inibidor de protease denominado rBmTI-6 com domínios da família de inibidores de tripsina pancreática bovina tipo Kunitz (ITPB-Kunitz) [21,24]. A proteína rBmTI-6 foi expressa em *Pichia pastoris* e caracterizada como um ITPB-Kunitz de três cabeças, mas a sua capacidade para proteger bovinos imunizados contra carrapatos permaneceu a ser determinada [21]. Aqui, a sequência parcial de nucleotídeos deste inibidor de tripsina de larvas de *R. (B.) microplus* foi utilizada para produzir um polipeptídeo recombinante em um sistema de expressão por levedura para investigar as suas propriedades imunoprotetoras [24]. Os resultados do ensaio de imunização dos bovinos e de outros experimentos utilizando este inibidor de tripsina de larvas de *R. (B.) microplus* recombinante (rRmLTI) também são relatados.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Carrapatos

Os carrapatos utilizados neste estudo foram obtidos de uma colônia mantida no laboratório da Embrapa Gado de Corte. Esta colônia foi estabelecida utilizando carrapatos coletados de bovinos em fazendas ao redor de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Os

carrapatos foram mantidos em condições de laboratório durante dois anos antes de serem utilizados nas experiências relatadas aqui. Bovinos estabulados foram utilizados para manter o ciclo do carrapato. Os estágios de vida do carrapato que exigiam incubação foram mantidos em laboratório a 28 °C e 80% de humidade relativa. O isolado de carrapato do boi de Campo Grande é suscetível aos acaricidas disponíveis no mercado.

## 2.2. Transformação de *P. pastoris* e análise das sequências

O EST que codifica para RmLTI (GenBank ID: CK186726 [21,24]) foi otimizado para códons usuais de *P. pastoris* e sintetizado pela Epoch Biolabs, Inc. A otimização de códons foi feita utilizando software proprietário Epoch Biolabs, Inc., fixado em 15% de *cut off* para a eficiência de códons. O fragmento de DNA de RmLTI sintético foi clonado no pPICZ $\alpha$ A, dando origem ao plasmídeo pPICZ $\alpha$ RmLTI. O plasmídeo recombinante codifica uma cauda de seis histidinas que é adicionada à porção N-terminal da proteína produto. Procedimentos previamente descritos foram seguidos para produzir rRmLTI no sistema de expressão por *P. pastoris* [25].

Comparações do alinhamento, similaridade e discordância com base em técnicas de bioinformática foram conduzidos entre as sequências de aminoácidos preditas para: rRmLTI, EST CK186726, BMTI-6 de cDNA de ovário (GenBank ID: P83606.2) e as sequências de aminoácidos N-terminais das BMTI-A (GenBank ID: P83609), BMTI-D (GenBank ID: P83607), BMTI-2 (GenBank ID: P83603) e BMTI-3 (GenBank ID: P83604). A ferramenta ClustalW do BioEdit e o software Vector NTI<sup>®</sup> (Invitrogen) foram utilizados tal como descrito anteriormente para a realização das análises de bioinformática [16]. A sequência de aminoácidos da rRmLTI foi submetida às análises de função e de superfamília de proteínas utilizando o software InterProScan, que identifica domínios de proteínas [42].

## 2.3. Quantificação e purificação de rRmLTI e produção de anticorpos murinos

A concentração de proteína no sobrenadante de cultura de *P. pastoris* foi quantificada como descrito anteriormente [25]. As proteínas foram precipitadas com metanol e ressuspensas em tampão de ligação desnaturante (Ureia 8 M, fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8, NaCl 500 mM). A rRmLTI foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni<sup>2+</sup> (Ni-NTA; Qiagen, Hilden, Alemanha) com tampão de eluição desnaturante (ureia 8 M, fosfato de sódio 20 mM, pH 4,0, NaCl 500 mM). O processo de purificação foi monitorado

por SDS-PAGE 7,5%. As frações eluídas de elevadas purezas foram reunidas e dialisadas contra PBS, pH 7,4.

A utilização e os cuidados com os animais foram realizados na EMBRAPA Gado de Corte de acordo com as diretrizes institucionais. Soros policlonais contra extrato de larvas de *R. (B.) microplus* ou rRmLTI foram produzidos utilizando camundongos BALB/c como descrito anteriormente [25]. A vacina foi preparada com 500 µg de rRmLTI ressuspensos em 4 mL de Tris-HCl 150 mM, pH 7,4, e emulsificados com 6 mL de Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris). Doze fêmeas BALB/c foram utilizadas, as quais foram separadas em dois grupos de seis animais. Um grupo recebeu a formulação rRmLTI e o outro o extrato de larvas preparado. Cada camundongo dentro do respectivo grupo foi imunizado com 50 µg mL<sup>-1</sup> dose<sup>-1</sup> de rRmLTI ou 100 µg mL<sup>-1</sup> dose<sup>-1</sup> de extrato de larvas. Foram aplicadas três doses subcutâneas com intervalos de 21 dias. Os soros foram colhidos 21 dias após a última dose.

#### 2.4. Eletroforese e Western blotting da rRmLTI

A eletroforese do material foi realizada em gel de poliacrilamida 10% com 10 µL de sobrenadante de cultura por poço contendo 0,55 µg L<sup>-1</sup> de proteína. O *Western blotting* foi realizada como descrito anteriormente [25].

#### 2.5. Ensaio de vacinação de bovinos, análise do soro e avaliação da eficácia

O antígeno rRmLTI expresso em *P. pastoris* foi emulsificado com adjuvante Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris) e foram preparadas doses de 2 mL contendo 100 µg da proteína recombinante. Bovinos de um ano de idade da raça Holandês foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de seis animais cada. Um grupo foi imunizado com o antígeno rRmLTI purificado e formulado como descrito acima. O segundo grupo (controle negativo) foi injetado com adjuvante/salina apenas. Amostras de soro foram colhidas e processadas. Todos os procedimentos que envolveram os carrapatos foram realizados de acordo com métodos descritos anteriormente [17]. Os soros obtidos de cada um dos seis animais, antes da primeira vacinação e após, periodicamente, dos grupos vacinado e controle foram reunidos e armazenados em ultra-freezer até a realização do ELISA.

Para a realização do ELISA, placas de microtitulação foram revestidas com uma solução de 1 µg mL<sup>-1</sup> de rRmLTI em tampão de carbonato de sódio 20 mM (pH 9,6), 50 µL por poço, e incubadas durante a noite a 4 °C. Foram testadas duplicatas das amostras de soros

agrupadas por grupo e data de coleta. Os procedimentos subsequentes foram realizados como descrito anteriormente [25].

A avaliação dos efeitos do tratamento sobre a biologia do carrapato e a eficácia da vacina foram seguidos de acordo com descrição prévia [17,26]. As teleóginas que se desprendiam dos bovinos de cada grupo foram recolhidas diariamente durante 13 dias e incubadas em laboratório para obtenção dos ovos. As massas de ovos obtidos em cada dia de coleta de vários carrapatos em cada grupo foram incubadas para determinar as taxas de eclosão.

#### 2.6. *Alimentação ex vivo de carrapatos com IgG anti-rRmLTI e avaliação da taxa de eclosão*

As amostras de soro de bovinos imunizados com rRmLTI foram colhidas imediatamente antes da infestação por carrapatos e submetidas a cromatografia em proteína A sepharose para purificar IgG. A IgG eluída da coluna teve um rendimento de 5 mg mL<sup>-1</sup>. Quatro grupos, cada um constituído por dez fêmeas adultas de carrapatos, foram utilizados para o tratamento. Cada carrapato, do respectivo grupo, foi alimentado com a mistura de anticorpos contendo 0, 25, 50 ou 100 µg de IgG purificada em 20 µL através da colocação de um tubo capilar no seu hipostômio. O efeito sobre a eclosão dos ovos foi avaliada como descrito anteriormente [17].

#### 2.7. *Estatística*

Os dados dos parâmetros reprodutivos foram analisados por teste-t. As diferenças entre as médias foram analisadas por análise de variância (ANOVA). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1. *Produção de rRmLTI em sistema de expressão baseado em P. pastoris*

A identidade da inserção de DNA no pPICZα RmLTI foi confirmada por sequenciamento e alinhamento com a sequência de nucleotídeos do EST da RmLTI. Um clone *Mut*<sup>+</sup> foi selecionado e a análise da expressão da proteína recombinante revelou uma banda de aproximadamente 46 kDa. O peso molecular calculado para rRmLTI é de 37,9 kDa. Resta ainda ser validado se a modificação pós-traducional através de glicosilação, potencialmente adicionando 8-9 manoses e duas moléculas de N-acetil-glucosamina, pode ter



causado a discrepância entre os pesos moleculares calculado e observado do produto da expressão por *P. pastoris*. Quantificações diretas de rRmLTI a partir de sobrenadantes de culturas revelaram níveis de produção de 550 mg L<sup>-1</sup>. A análise do produto da purificação em coluna de níquel mostrou uma proteína de 46 kDa e, após a purificação, o rendimento foi de 870 mg L<sup>-1</sup>. *Western blotting* da proteína rRmLTI foi realizada com soros de camundongos (primário anti-extrato de larvas de *R. (B.) microplus* e anti-rRmLTI) e com anticorpo monoclonal anti-Histidina, revelando uma proteína de aproximadamente 46 kDa (figura 1).

### 3.2. *Imunoproteção de bovinos contra a infestação de R. (B.) microplus*

O perfil da resposta de anticorpos dos bovinos imunizados com a formulação vacinal contendo RmLTI é apresentado na figura 2. Os níveis de anticorpos contra rRmLTI tiveram um pico cerca de 31 dias após a segunda imunização de reforço (3ª dose). A infestação de carrapatos estabeleceu-se cerca de dez dias antes do início do aparente declínio na resposta humoral específica. Um efeito transitório sobre o peso médio das teleóginas que se desprenderam dos bovinos vacinados ficou evidente até o nono dia do período de coleta (figura 3). Com exceção dos dias 2 e 4, o peso médio de teleóginas recolhidas do grupo vacinado foi significativamente inferior até o nono dia (figura 3,  $p < 0,05$ ). A equivalência de peso médio de teleóginas entre os grupos a partir do dia 9 do período de coleta foi associada com a referida redução nos níveis de anticorpos anti- rRmLTI (figura 2). Uma tendência semelhante foi observada na taxa de eclosão de ovos de carrapatos que se desprenderam de bovinos vacinados (figura 4).

A contagem acumulada de teleóginas até o dia 13 após o início do desprendimento foi utilizada para calcular os efeitos da vacinação com rRmLTI (tabela 1). Os bovinos vacinados tiveram 30% menos carrapatos desprendendo-se deles quando comparados aos animais injetados com apenas adjuvante/salina. Embora a capacidade de postura não tenha sido afetada, houve um efeito significativo associado com a vacinação no peso dos carrapatos e na eclodibilidade larval (tabela 1,  $p < 0,05$ ). Em termos gerais, a vacina formulada com rRmLTI ofereceu 32% de imunoproteção aos bovinos contra a infestação de carrapatos (tabela 1).

### 3.3. *Efeito de IgG anti-rRmLTI purificada na eclosão dos ovos dos carrapatos*

O efeito da resposta de anticorpos anti-rRmLTI na eclosão dos ovos foi também investigada *ex vivo*. Uma relação dose/resposta inversa foi observada entre a eclosão dos ovos e a quantidade de IgG ingerida pela teleógina (figura 5). A viabilidade dos ovos postos por

teleóginas que ingeriram anticorpos IgG purificados de bovinos vacinados com rRmLTI foi significativamente comprometida, chegando a uma diminuição de 75,6% na postura de carrapatos alimentados com 100 µg de IgG ( $p < 0,05$ ).

### 3.4. Identificação de RmLTI como um membro da família de ITPB tipo Kunitz

Uma comparação das sequências de DNA a do EST CK186726 e do clone RmLTI otimizado para utilização em *P. pastoris* revelou 77% de identidade entre as duas sequências. Dezanove bases desta sequência EST foram deletadas na sequência de DNA sintetizada para a clonagem de RmLTI no sistema de expressão de levedura (dados não mostrados).

A figura 6 representa o alinhamento das sequências de aminoácidos previstas para rRmLTI, EST CK186726 e BMTI-6 de cDNA de ovário com as sequências N-terminais informadas para BMTI-A, BMTI-D, BMTI-2, e BMTI-3. As sequências de aminoácidos deduzidas de rRmLTI, EST CK186726 e BMTI-6 são 99% idênticas. Foram adicionados, durante os procedimentos de clonagem, sequências de ácidos nucleicos que codificam seis aminoácidos adicionais (EAEAEF) na porção N-terminal e trinta e dois aminoácidos adicionais (VPRAAAAASFLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH) na porção C-terminal da rRmLTI. Isto devido à inserção de um local de restrição e à sequência que codifica para o peptídeo poli-His, respectivamente.

A semelhança entre as sequências parciais de aminoácidos sugeriu que RmLTI em larvas é um membro da família de ITPB-Kunitz, assim como a BMTI-6 no ovário de fêmeas adultas de carrapatos. Uma análise melhor da suposta função de RmLTI é apresentada na figura 7. Relevantes características proteicas identificadas na sequência de aminoácidos deduzida para a sequência CK186726 incluem três prováveis domínios de ITPB-Kunitz e dois prováveis sítios de inibidores de proteinase I2 tipo Kunitz conservados. Como observado na BMTI-6, seis locais de N-glicosilação estão presentes na sequência parcial da proteína RmLTI. Seis resíduos de cisteína foram observados em cada um dos três domínios Kunitz, possivelmente para formarem ligações dissulfeto que dão estabilidade ao polipeptídeo compacto na sua forma estrutural.

## 4. Discussão

A avaliação da eficácia contra a infestação de carrapatos nos bovinos utilizando uma vacina formulada com uma proteína recombinante membro da família de ITPB-Kunitz de *R. (B.) microplus* produzida em sistema de expressão baseado em *P. pastoris*, é relatada pela

primeira vez aqui. Uma resposta imune humoral específica e robusta contra rRmLTI foi obtida com o protocolo de vacinação consistindo de três imunizações, cada uma aplicada a cada duas semanas. A eficácia de 32% obtida com a formulação rRmLTI reflete a dificuldade do desafio de descobrir antígenos altamente eficazes em proteger os animais contra a infestação por *R. (B.) microplus*. Uma experiência de vacinação de *Bos indicus* imunizados com uma mistura de inibidores de tripsina purificados de larvas, com um ou dois domínios tipo Kunitz, proporcionou 72,8% de eficácia contra a infestação de *R. (B.) microplus* [22]. Em contraste, o nível de imunoproteção obtido em bovinos cruzados vacinados com o polipeptídeo sintético de 29 resíduos de aminoácidos, desenhado a partir da sequência N-terminal do inibidor de tripsina A de *R. (B.) microplus*, foi de 18,4% [23]. Como o gene que codifica a RmLTI ainda permanece por ser completamente caracterizado, a discrepância aparente entre o nível de anticorpos específicos e o baixo nível de eficácia obtidos com a vacina rRmLTI pode ser devida a utilização da sequência parcial do gene (EST) para produzir a proteína recombinante em sistema de expressão de levedura. Alternativamente, as redundâncias estrutural e funcional das proteínas pertencentes à família Kunitz presentes em *R. (B.) microplus* também podem ser responsáveis pela eficácia relativamente baixa obtida com a vacina rRmLTI.

Embora o reconhecimento de rRmLTI por anticorpos policlonais de camundongos imunizados com extrato de larva de carrapatos indique que o polipeptídeo recombinante produzido em *P. pastoris* foi tão antigênicos como a forma nativa do inibidor de tripsina de larvas cognato, é possível que estes anticorpos reconheçam epítomos partilhados pelos diversos inibidores de tripsina descobertos em larvas de *R. (B.) microplus*. O anti-soro de bovinos vacinados com inibidores de tripsina de *R. (B.) microplus* reconheceram a proteína rBmTI-6 produzida em *P. pastoris* [21]. Similaridade antigênica aparentemente se estende para além das fronteiras intraespecíficas, porque o anti-soro contra a forma nativa dos inibidores de tripsina de larvas de *R. (B.) microplus* reage de forma cruzada com os inibidores de tripsina identificados em larvas de *R. sanguineus* [27]. A imunogenicidade da rRmLTI reflete-se na cinética da resposta imune humoral bovina. O efeito significativo na taxa de eclosão de larvas de ovos postos por teleóginas que parasitaram bovinos vacinados, que foi amplificado pela alimentação com IgG anti-rRmLTI purificada, sugere que a potencialização da resposta humoral, talvez utilizando outros adjuvantes, poderia aumentar a eficácia de uma vacina polivalente formulada com inibidores do tipo Kunitz de *R. (B.) microplus*. Tem sido

demonstrado que a escolha do adjuvante pode influenciar nos níveis de anticorpos que estão correlacionados com o grau de inibição de malária [28]. No entanto, não foi observada nenhuma correlação direta entre anticorpos contra rRmLTI e média de eficácia neste estudo. Por comparação, a grande quantidade de inibidores do tipo Kunitz presentes em *R. (B.) microplus* foi considerada para explicar o aparentemente pequeno impacto que o silenciamento do gene que codifica para boophilin, um inibidor de trombina duplo tipo Kunitz, expressa no intestino, teve na produção de ovos [29].

Considerando o suposto envolvimento de inibidores de tripsina de larvas e o papel de outros inibidores tipo Kunitz na alimentação de sangue, a redução do número de teleóginas que se desprenderam dos bovinos vacinados pode estar refletindo o impacto dos anticorpos bovinos anti-rRmLTI na capacidade de *R. (B.) microplus* se alimentar de sangue [20,29]. No entanto, os papéis fisiológicos das proteínas RmLTI e BmTI-6 continuam por ser determinados nas fases de larva e adulto do carrapato do boi, respectivamente, apesar das semelhanças em suas sequências parciais de nucleotídeos e aminoácidos. Sem saber a função de RmLTI e BmTI-6, continua sendo possível que a diminuição na taxa de eclosão observada em ovos postos por teleóginas alimentadas com anticorpos IgG purificados a partir de bovinos vacinados resultou dos efeitos da ligação dos anticorpos aos epítomos compartilhados por rRmLTI e a forma nativa de BmTI-6 em ovários de *R. (B.) microplus*.

A família Kunitz é uma de pelo menos 20 famílias que pertencem aos inibidores de serina-protease [30]. Uma característica das proteínas pertencentes a esta família é o domínio Kunitz que pode estar presente em cópias únicas ou múltiplas. Pelo menos 303 proteínas do tipo Kunitz foram identificadas em carrapatos, até agora, e algumas delas podem conter até sete domínios Kunitz [31]. Os padrões de cisteína foram utilizados para classificar proteínas do tipo Kunitz em três grupos para facilitar o estudo de sua evolução no vetor da doença de Lyme, *Ixodes scapularis*, e ampliar a análise para carrapatos em geral [31]. Embora tendo envolvido primariamente para inibição de proteases, o domínio Kunitz evoluiu para executar outras funções que requerem interações proteína-proteína [32]. Ovários, gordura corporal, hemócitos e intestinos de carrapatos contêm proteínas tipo Kunitz [21,29,33,34]. Estudos de proteômica revelaram a presença de proteínas do tipo Kunitz que são reguladas positivamente em tecido ovariano de *R. (B.) microplus* infectado com *Babesia bovis* [35]. Um banco de dados do genoma disponível publicamente chamado *CattleTickBase* oferece a oportunidade de estudar a história evolutiva das proteínas tipo Kunitz em *R. (B.) microplus* [35]. É possível

que BmTI -6 e RmLTI codificadas por CK186726 são variantes de processamento do mesmo gene ou parálogos da mesma proteína tipo Kunitz, como sugerido anteriormente para BmTI -A e outras proteínas tipo Kunitz presentes em ovários de carrapatos [34].

Pesquisas anteriores documentando 72,8% de eficácia contra a infestação de *R. (B.) microplus* utilizando inibidores de tripsina purificados e o papel crucial que as proteínas tipo Kunitz desempenham em vários processos biológicos, incluindo inibição de proteinases, garantiram a continuação de pesquisas em vacinologia com esta família de proteínas. A produção de rRmLTI em *P. pastoris* facilita a sua utilização para formulação de vacinas polivalentes contra o carrapato do boi que incluam outras proteínas tipo Kunitz ou diferentes antígenos de *R. (B.) microplus*. O nível de imunoproteção alcançado pela vacinação com rRmLTI foi baixo em comparação com outros novos antígenos descobertos recentemente [37,43], com especial atenção aos resultados de vacinação utilizando peptídeos imunogênicos que renderam eficácias entre 80 e 90% [44,45]. Glândulas salivares, intestino e ovários são os principais alvos para se interromper a biologia do carrapato dos bovinos utilizando vacinas e as proteínas tipo Kunitz são abundantes nestes tecidos. A utilização de epítomos de proteínas tipo Kunitz em combinação com porções de outras moléculas imunogênicas de carrapato para produzir uma vacina de dupla ação poderia ser uma outra forma de explorar a redundância de inibidores tipo Kunitz de *R. (B.) microplus* para desenvolver uma vacina altamente eficaz contra o carrapato do boi.

### **Agradecimentos**

Agradecemos à Embrapa Gado de Corte, ao CNPq e à Fundect pelo apoio financeiro. Este artigo relata os resultados de pesquisa apenas. A menção de marcas ou produtos comerciais nesta publicação é exclusivamente para a finalidade de fornecer informações específicas e não implica recomendação de aprovação pelo Departamento de Agricultura dos EUA. F.D. Guerrero e A.A. Pérez de León são financiados pelo projeto 6205-32000-031-00D do USDA-ARS. O Departamento de Agricultura dos EUA é um fornecedor de oportunidades iguais e empregador. Declaração de conflito: Os autores declaram que não têm interesses conflitantes. Contribuições dos autores: RA desenvolveu a proposta que foi financiado para testar a imunoproteção de inibidores de tripsina de larvas do carrapato do boi e ajudou a preparar o artigo. RCC conduziu as pesquisas e adquiriu e analisou os dados relacionados com a clonagem de DNA e produção de rRmLTI no sistema de expressão de levedura analisado. MAS manteve a colônia carrapato bovino, conduziu e colheu os dados do *stall test* e apoiou

os experimentos de laboratório envolvendo a purificação da rRmLTI. FDG assistiu com a análise bioinformática e interpretação de dados relacionados com a sequência do EST BMTI e síntese da mesma. FPLL contribuiu para o estudo da produção de anticorpo policlonal, coleta de amostra de soro murino e análise da resposta imune. AAPL codesenvolveu a proposta para testar a imunoproteção de inibidores de tripsina de larvas do carrapato do boi, analisou, interpretou os dados e ajudou a redigir o artigo. Todos os autores aprovaram a versão final do manuscrito submetido para publicação.

### Referências

- [1] Grisi L, Massard CL, Moya-Borja GE, Pereira JB. Impacto das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária* 2002;125:8–10.
- [2] De La Fuente J, Kocan KM, Almazan NC, Blouin EF. Targeting the tick–pathogen interface for novel control strategies. *Front Biosci* 2008;13:6947–56.
- [3] Guerrero FD, Lovis L, Martins JR. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012;21:1–6.
- [4] Andreotti R, Guerrero FD, Soares MA, Barros JC, Miller RJ, Pérez de León A. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011;20:127–33.
- [5] Rosario-Cruz R, Almazan C, Miller RJ, Dominguez-Garcia DI, Hernandez-Ortiz R, De La Fuente J. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Front Biosci* 2009;14:2657–65.
- [6] De La Fuente J, Kocan KM, Blouin EF. Tick vaccines and the transmission of tick-borne pathogens. *Vet Res Commun* 2007;1:85–90.
- [7] Willadsen P, Kemp DH. Vaccination with ‘concealed’ antigens for tick control. *Parasitol Today* 1988;4:196–8.
- [8] Rodríguez M, Penichet ML, Mouris AE, Labarta V, Lorenzo Luaces L, Rubiera R, et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet Parasitol* 1995;57:339–49.
- [9] De La Fuente J, Rodriguez M, Redondo M, Montero C, Garcia-Garcia JC, Mendez L, et al. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine* 1998;16:366–73.

- [10] Redondo M, Fragoso H, Ortíz M, Montero C, Lona J, Medellín JA, et al. Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac and amidine treatments. *Exp Appl Acarol* 1999;23:841–9.
- [11] Nijhof AM, Balk JA, Postigo M, Jongejan F. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. *BMC Mol Biol* 2009;10:112.
- [12] Bastos RG, Ueti MW, Knowles DP, Scoles GA. The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute *Babesia bovis* infection. *Parasites Vectors* 2010;3:1–11.
- [13] Willadsen P. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope. *Trends Parasitol* 2008;4:164–7.
- [14] García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 2000;18:2275–87.
- [15] Sossai S, Peconick AP, Sales-Junior PA, Marcelino FC, Vargas MI, Neves ES, et al. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol* 2005;37(3-4):199–214.
- [16] Andreotti R, Pedroso MS, Caetano AR, Martins NF. Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants Bm86 Campo Grande strain, Bm86 and Bm95. *Rev Bras Parasitol Vet* 2008;17:93–8.
- [17] Andreotti R. Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. *Rev Bras Parasitol Vet* 2006;15:97–100.
- [18] Cunha RC, Pérez de León AA, Leite FPL, da Silva Pinto L, dos Santos Júnior AG, Andreotti R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012;21:1–9.

- [19] Tanaka AS, Andreotti R, Gomes A, Torquato RJS, Sampaio MU, Sampaio CAM. A double headed serine proteinase inhibitor – human plasma kallikrein and elastase inhibitor – from *Boophilus microplus* larvae. Immunopharmacology 1999;45:171–7.
- [20] Andreotti R, Malavazi-Piza KC, Sasaki SD, Torquato RJ, Gomes A, Tanaka AS. Serine proteinase inhibitors from eggs and larvae of tick *Boophilus microplus*: purification and biochemical characterization. J Protein Chem 2001;20:337–43.
- [21] Sasaki SD, Tanaka AS. rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick *Boophilus microplus*, its cloning, expression and biochemical characterization. Vet Parasitol 2008;155:133–41.
- [22] Andreotti R, Gomes A, Malavazi-Piza KC, Sasaki SD, Sampaio CA, Tanaka AS. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. Int Immunopharmacol 2002;2:557–63.
- [23] Andreotti R. Synthetic bmti n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. Exp Parasitol 2007;116:66–70.
- [24] Guerrero FD, Miller RJ, Rousseau ME, Sunkara S, Quackenbush J, Lee Y, et al. BmiGI: a database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. Insect Biochem Mol Biol 2005;35:585–95.
- [25] Cunha RC, Andreotti R, Leite FPL. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: expression and characterization of Bm86-CG in *Pichia pastoris*. Rev Bras Parasitol Vet 2011;20:103–10.
- [26] Garcia-Garcia JC, Gonzalez IL, Gonzalez DM, Valdes M, Mendez L, Lamberti J, et al. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. Exp Applied Acarol 1999;23:883–95.
- [27] Azzolini SSA, Sasaki SD, Torquato RJ, Andreotti R, Andreotti E, Tanaka AS. *Rhipicephalus sanguineus* trypsin inhibitors present in the tick larvae: isolation, characterization, and partial primary structure determination. Arch Biochem Biophys 2003;417:176–82.
- [28] Kusi KA, Faber BW, Riasat V, Thomas AW, Kocken CH, Remarque EJ. Generation of humoral immune responses to multi-allele PfAMA1 vaccines; effect of adjuvant and

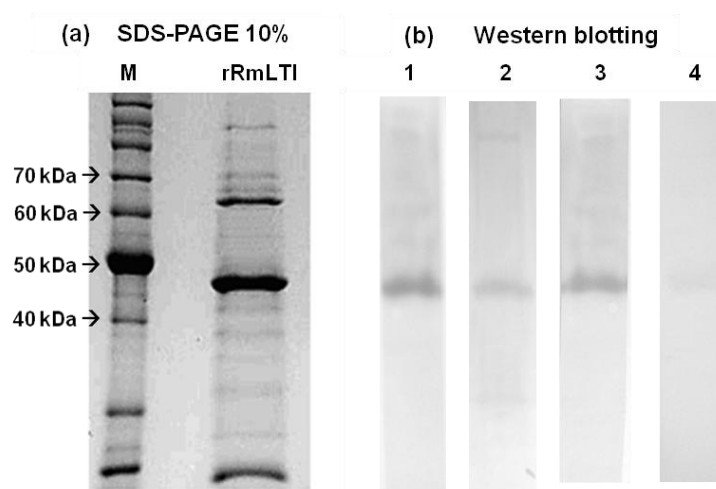


number of component alleles on the breadth of response. PLoS ONE 2010;5:e15391, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015391>.

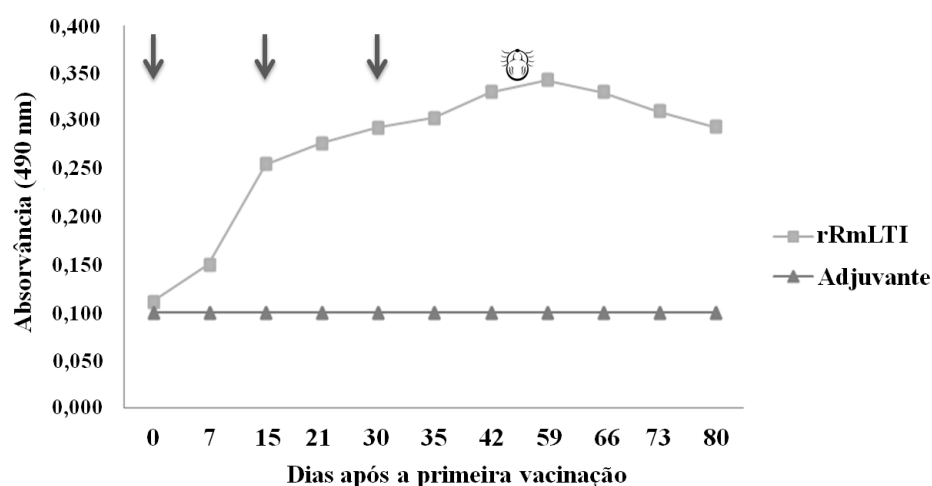
- [29] Soares TS, Watanabe RM, Tanaka-Azevedo AM, Torquato RJ, Lu S, Figueiredo AC, et al. Expression and functional characterization of boophilin, a thrombin inhibitor from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut. Vet Parasitol 2012;January [Epub ahead of print].
- [30] Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F, Otlewski J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. Cell Mol Life Sci 2003;60:2427–44.
- [31] Dai SX, Zhang AD, Huang JF. Evolution, expansion and expression of the Kunitz/BPTI gene family associated with long-term blood feeding in *Ixodes scapularis*. BMC Evol Biol 2012;12:4.
- [32] MacLean 2nd JA, Roberts RM, Green JA. Atypical Kunitz-type serine proteinase inhibitors produced by the ruminant placenta. Biol Reprod 2004;71:455–63.
- [33] Lima CA, Torquato RJ, Sasaki SD, Justo GZ, Tanaka AS. Biochemical characterization of a Kunitz type inhibitor similar to dendrotoxins produced by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) hemocytes. Vet Parasitol 2010;167:279–87.
- [34] Rachinsky A, Guerrero FD, Scoles GA. Differential protein expression in ovaries of uninfected and *Babesia*-infected southern cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Insect Biochem Mol Biol 2007;37:1291–308.
- [35] Bellgard MI, Moolhuijzen PM, Guerrero FD, Schibeci D, Rodriguez-Valle M, Peterson DG, et al. CattleTickBase: an integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Int J Parasitol 2012;42: 161–9.
- [36] de la Fuente J, Almazán C, Canales M, Pérez de la Lastra J, Kocan K, Willadsen P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. Anim Health Res Rev 2007;8:23–8.
- [37] Guerrero FD, Miller R, Pérez de León AA. Anti-cattle tick vaccines: many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? Int J Parasitol 2012;42:421–7.
- [38] Fragoso H, Rad PH, Ortiz M, Rodríguez M, Redondo M, Herrera L, et al. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. Vaccine 1998;16:1990–2.

- [39] Pipano E, Alekceev E, Galker F, Fish L, Samish M, Shkap V. Immunity against *Boophilus annulatus* induced by the Bm86 (Tick-GARD) vaccine. *Exp Appl Acarol* 2003;29:141–9.
- [40] Miller R, Estrada-Peña A, Almazán C, Allen A, Jory L, Yeater K, et al. Exploring the use of an anti-tick vaccine as a tool for the integrated eradication of the cattle fever tick *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Vaccine* 2012;June [Epub ahead of print].
- [41] Pérez de León AA, Teel PD, Auclair AN, Messenger MT, Guerrero FD, Schuster G, et al. Integrated strategy for sustainable cattle fever tick eradication in USA is required to mitigate the impact of global change. *Front Physiol* 2012;3:195–2011.
- [42] Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, et al. Inter-ProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* 2005;33:116–20.
- [43] Parizi LF, Githaka NW, Logullo C, Konnai S, Masuda A, Ohashi K, et al. The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. *Vet J* 2012;July [Epub ahead of print].
- [44] Rodríguez-Mallon A, Fernández E, Encinosa PE, Bello Y, Méndez-Pérez L, Ruiz LC, et al. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine* 2012;30:1782–9.
- [45] Patarroyo JH, Vargas MI, González CZ, Guzmán F, Martins-Filho OA, Afonso LC, et al. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462 against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol* 2009;166: 333–9.

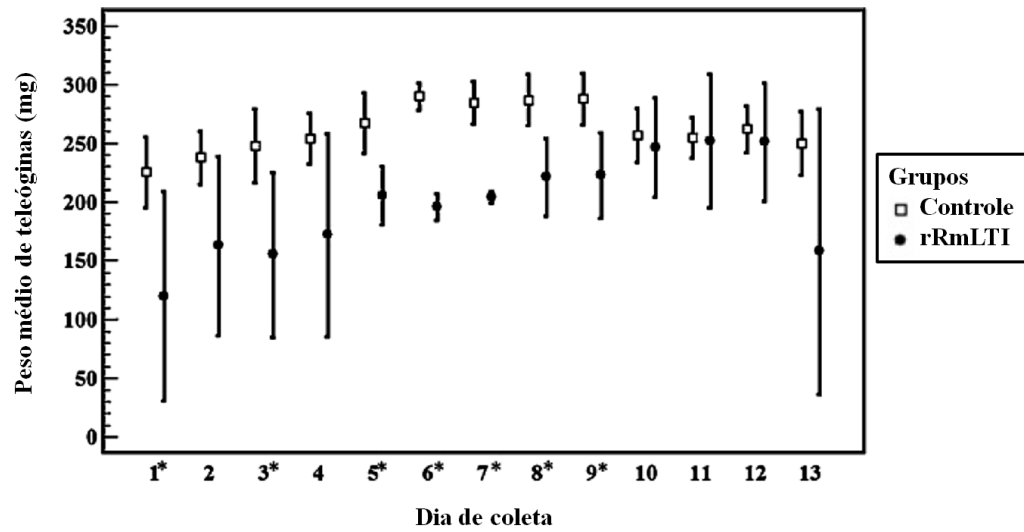
## FIGURAS E TABELAS



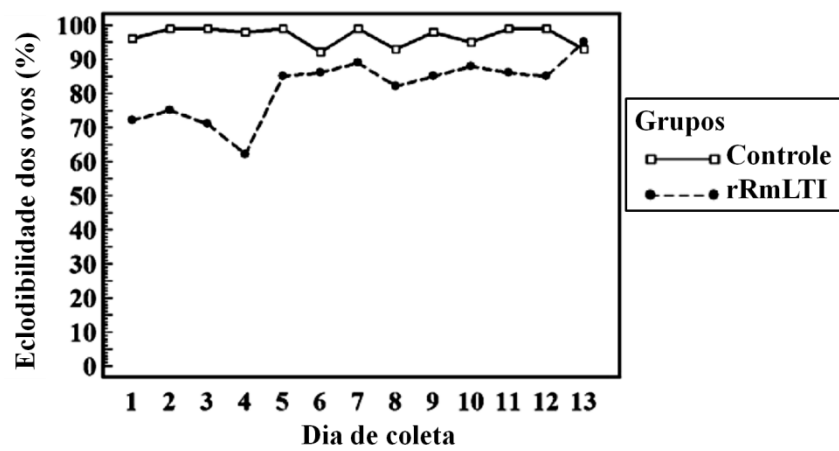
**Figura 1.** Identificação do inibidor de tripsina presente em larvas de *R. (B.) microplus* expresso por *P. pastoris* por eletroforese e *immunoblotting*. O sobrenadante da cultura de *P. pastoris* transformada com pPICZaRmLTI foi processado para realização de: (a) eletroforese (SDS-PAGE 10%), onde o gel foi carregado com M (marcador de peso molecular [BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen]) e rRmLTI (sobrenadante da expressão de rRmLTI por *P. pastoris*); (b) *Western blotting* da rRmLTI detectado com: (1) anticorpo monoclonal anti-His; (2) soro de camundongos vacinados com rRmLTI; (3) soro de camundongos vacinados com extrato das larvas; (4) e soro de camundongos não vacinados.



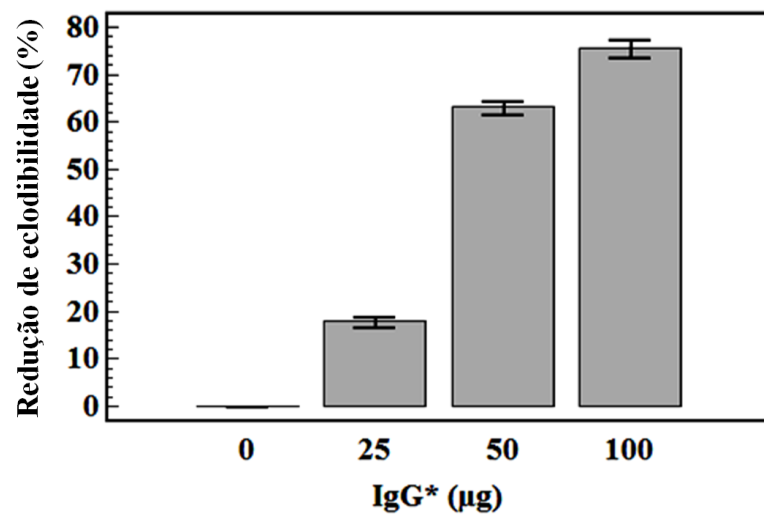
**Figura 2.** Perfil de resposta imune humoral em bovinos vacinados com rRmLTI. As leituras de absorvância são do ELISA das amostras de soros semanais coletadas dos dois grupos de seis bovinos imunizados com 0, 15 e 30 dias (setas) com rRmLTI (linha quadriculada) ou adjuvante/salina (linha triangular). O ícone carrapato indica o dia 51 após a primeira vacinação, que é quando os bovinos foram infestados. Os títulos de anticorpos de bovinos imunizados estão representados como o valor da  $DO_{490\text{ nm}}$  da diluição 1:100 do soro. As amostras individuais foram reunidas por grupo e dia de coleta para testes de ELISA



**Figura 3.** Redução de peso de teleóginas de *R. (B.) microplus* que se alimentaram de bovinos vacinados com rRmLTI. Média do grupo  $\pm$  Desvio Padrão. \*Dia de coleta com asterisco indica que o peso médio entre as teleóginas que se alimentaram de bovinos vacinados ou de bovinos controles foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Porcentagem de eclosão de ovos postos por teleóginas alimentadas em bovinos controles ou vacinados com rRmLTI. Consulte o texto para obter detalhes sobre o processamento do ovo.



**Figura 5.** IgG anti-rRmLTI ingerida por teleóginas inibe a eclosão dos ovos de maneira dose-dependente. \*Quatro grupos de dez carrapatos receberam 0, 25, 50 e 100 µg de IgG purificada. Cada teleóquina foi alimentada com a quantidade especificada de IgG num volume de 20 µL utilizando um tubo capilar. O gráfico mostra a média dos tratamentos  $\pm$  desvio padrão. A porcentagem média de inibição de eclosão foi significativamente diferente entre os diferentes grupos de tratamentos ( $p < 0,01$ ).

```

rRmLTI      EAEAEFFETYCKPTYDSGPCKGYFPRWWFNVKTGQCEEFIYGGCQGNKNNHVTRKECETR 60
BmTI-6      ----VDFETYCKPTYDSGPCKGYFPRWWFNVKTGQCEEFIYGGCQGNKNNHVTRKECETR 56
CK186726.1  ----VDFETYCKPTYDSGPCKGYFPRWWFNVKTGQCEEFIYGGCQGNKNNHVTRKECETR 56
BmTI-2      -----
BmTI-A      -----
BmTI-3      -----
BmTI-D      -----

rRmLTI      CLRKQLSRLHFSPPVDQYPYGDTERSNEEVPEYPPVHLNDSLEVSAMNQRPLRNYTKQH 120
BmTI-6      CLRKQLSRLHFSPPVDQYPYGDTERSNEEVPEYPPVHLNDSLEVSAMNQRPLRNYTKQH 116
CK186726.1  CLRKQLSRLHFSPPVDQYPYGDTERSNEEVPEYPPVHLNDSLEVSAMNQRPLRNYTKQH 116
BmTI-2      -----
BmTI-A      -----SQPHVNPFA-----CYVAPDQGPCRAIL--- 23
BmTI-3      -----
BmTI-D      -----

rRmLTI      KPNVTSDFS AISLTSGVDFETYCKPTHDRGPCKAYIPRWWFNVKTGQCEQFIYGGCQGNK 180
BmTI-6      KPNVTSDFS AISLTSGVDFETYCKPTHDRGPCKAYIPRWWFNVKTGQCEQFIYGGCQGNK 176
CK186726.1  KPNVTSDFS AISLTSGVDFETYCKPTHDRGPCKAYIPRWWFNVKTGQCEQFIYGGCQGNK 176
BmTI-2      ---VTIGFV-----CELPKEVGGPCRGHIIPRY----- 25
BmTI-A      --RYYFDDD-----TQTCQRFYGGCEGNANNXXXEQC-----KAS 58
BmTI-3      -EVHNFA-----CLGKPDGGC--AHYIYRRY-----Y 25
BmTI-D      --AVDFSKVP-----TATAGPCKG----- 17

rRmLTI      NNYETKSICETNCLRRQLSELGVSADVHYRKHWNETHKYS PNVTV EYP AVHFNVT LN FVCN 240
BmTI-6      NNYETKSICETNCLRRQLSELGVSADVHYRKHWNETHKYS PNVTV EYP AVHFNVT LN FVCN 236
CK186726.1  NNYETKSICETNCLRRQLSELGVSADVHYRKHWNETHKYS PNVTV EYP AVHFNVT LN FVCN 236
BmTI-2      -----
BmTI-A      CKPETEY-----EAKKCLARPES-----GPCLAYMPMNG----- 87
BmTI-3      YV----- 27
BmTI-D      -----

rRmLTI      EPKYPELCKGYFPRYYYNSRSKTCCKFIYGGCQSNNGNFLTLEECENTCLVDLQVVPRAA 300
BmTI-6      EPKYPELCKGYFPRYYYNSRSKTCCKFIYGGCQSNNGNFLTLEECENTCLVDLQV----- 291
CK186726.1  EPKYPELCKGYFPRYYYNSRSKTCCKFIYGGCQSNNGNFLTLEECENTCLVDLQ----- 290
BmTI-2      -----
BmTI-A      -----YDSKLGQCVEFIYGGCDGNDNKYTTEEECLKSCK----- 121
BmTI-3      -----
BmTI-D      -----

rRmLTI      AAASFLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH 327
BmTI-6      -----
CK186726.1  -----
BmTI-2      -----
BmTI-A      -----
BmTI-3      -----
BmTI-D      -----

```

Figura 6. Alinhamento das seqüências de aminoácidos preditas para rRmLTI, EST CK186726, BmTI-6 de cDNA de ovário e as seqüências de aminoácidos N-terminais de BmTI-A, BmTI-D, BmTI-2 e BmTI-3.

```

1  GAG GCT GAA GCT GAA TTC TTC GAG ACT TAC TGC AAA CCA ACT TAC GAC TCT GGT CCA TGT
1  E  A  E  A  E  F  F  E  T  Y  C  K  P  T  Y  D  S  G  P  C
61  AAA GGT TAC TTC CCT AGA TGG TGG TTT AAT GTT AAG ACT GGT CAG TGC GAA GAG TTC ATC
21  K  G  Y  F  P  R  W  W  F  N  V  K  T  G  Q  C  E  E  F  I
121 TAC GGT GGT TGC CAA GGT AAC AAG AAC AAC CAT GTT ACT AGA AAG GAG TGC GAA ACC AGA
41  Y  G  G  C  Q  G  N  K  N  N  H  V  T  R  K  E  C  E  T  R
181 TGT TTG AGA AAG CAA TTG TCC AGA TTG CAT TTC TCC CCA CCT GTC GAC CAA TAC CCT TAC
61  C  L  R  K  Q  L  S  R  L  H  F  S  P  P  V  D  Q  Y  P  Y
241 GGA GAT ACC GAG CGT TCC AAC GAG GAG GTT CCT GAA TAC CCA CCA GTC CAC TTG AAC GAC
81  G  D  T  E  R  S  N  E  E  V  P  E  Y  P  P  V  H  L  N*...D
301 TCT TTG GAG GTT TCC GCT GTT ATG AAC CAG AGA CCA TTG AGA AAC TAC ACT AAG CAG CAT
101 S  L  E  V  S  A  V  M  N  Q  R  P  L  R  N*...Y...T...  K  Q  H
361 AAG CCA AAC GTT ACT TCC GAC TTC TCT GCT ATT TCC TTG ACC TCC GGT GTT GAT TTC GAA
121 K  P  N*...V...T...  S  D  F  S  A  I  S  L  T  S  G  V  D  F  E
421 ACT TAC TGC AAG CCA ACC CAC GAC AGA GGT CCA TGC AAG GCT TAC ATC CCA CGT TGG TGG
141 T  Y  C  K  P  T  H  D  R  G  P  C  K  A  Y  I  P  R  W  W
481 TTC AAC GTC AAG ACC GGT CAA TGT GAG CAA TTC ATC TAC GGT GGT TGT CAA GGT AAC AAG
161 F  N  V  K  T  G  Q  C  E  Q  F  I  Y  G  G  C  Q  G  N  K
541 AAC AAC TAC GAG ACC AAG TCT ATC TGT GAA ACT AAC TGT TTG CGT CGT CAA TTG TCC GAG
181 N  N  Y  E  T  K  S  I  C  E  T  N  C  L  R  R  Q  L  S  E
601 TTG GGT GTT TCT GCC GAC GTT CAT TAC AGA AAG CAC TGG AAC GAG ACT AAG TAC TCT CCA
201 L  G  V  S  A  D  V  H  Y  R  K  H  W  N*...E...T...  K  Y  S  P
661 AAC GTC ACT GTC GAG TAC CCA GCC GTT CAC TTC AAC GTC ACC TTG AAC CCA GTC TGC AAC
221 N*...V...T...  V  E  Y  P  A  V  H  F  N*...V...T...  L  N  P  V  C  N
721 GAA CCA AAG TAC CCA GAG TTG TGT AAG GGT TAC TTC CCA AGA TAC TAC TAC AAC TCC AGA
241 E  P  K  Y  P  E  L  C  K  G  Y  F  P  R  Y  Y  Y  N  S  R
781 TCT AAG ACC TGT AAG AAG TTC ATC TAC GGT GGA TGT CAG TCT AAC GGA AAC AAC TTC TTG
261 S  K  T  C  K  K  F  I  Y  G  G  C  Q  S  N  G  N  N  F  L
841 ACC TTG GAA GAA TGT GAA AAC ACT TGT TTG GTC GAC TTG CAA GTG GTA CCT CGA GCC GCG
281 T  L  E  E  C  E  N  T  C  L  V  D  L  Q  V  V  P  R  A  A
901 GCG GCC GCC AGC TTT CTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC
301 A  A  A  S  F  L  E  Q  K  L  I  S  E  E  D  L  N  S  A  V
961 GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA
321 D  H  H  H  H  H  H  Stop

```

**Figura 7.** Um inibidor de tripsina em larvas de *R. (B.) microplus* é codificado pelo EST CK186726. A sequência de aminoácidos deduzida a partir do DNA sintetizado para codificar RmLTI e otimizado para códons usuais de *P. pastoris* foi analisada para as características de proteínas utilizando a ferramenta de bioinformática InterProScan. Resíduos de asparagina (N), preditos a serem N-glicosilados estão marcados com asteriscos. A linha pontilhada sublinha os códons Asn-Xaa-Ser/Thr. Resíduos de cisteína (C) preditos a formarem pontes dissulfetos estão destacados em cinza. Os aminoácidos que abrangem os domínios ITPB-Kunitz estão

sublinhados. Dois locais preditos a serem inibidores de protease I2 tipo Kunitz conservados são duplamente sublinhados.

**Tabela 1.** Eficácia da vacina formulada com um inibidor de tripsina de larvas de *R. (B.) microplus* recombinante contra infestação deste carrapato e seus efeitos sobre os parâmetros reprodutivos das teleóginas.

| Animal                                                 | Número total de carrapatos |           | Peso médio dos carrapatos (mg) |          | Peso médio dos ovos (mg) |           | Eclodibilidade (%) |          |
|--------------------------------------------------------|----------------------------|-----------|--------------------------------|----------|--------------------------|-----------|--------------------|----------|
|                                                        | Controle                   | Vacinado  | Controle                       | Vacinado | Controle                 | Vacinado  | Controle           | Vacinado |
| 1                                                      | 1209                       | 818       | 267                            | 210      | 112                      | 161       | 95                 | 90       |
| 2                                                      | 661                        | 441       | 254                            | 209      | 138                      | 142       | 98                 | 85       |
| 3                                                      | 571                        | 588       | 276                            | 209      | 121                      | 143       | 97                 | 86       |
| 4                                                      | 521                        | 602       | 285                            | 234      | 145                      | 160       | 98                 | 89       |
| 5                                                      | 1089                       | 671       | 304                            | 209      | 160                      | 154       | 96                 | 91       |
| 6                                                      | 543                        | 89        | 275                            | 190      | 149                      | 125       | 96                 | 87       |
| Média ± DP <sup>a</sup>                                | 766 ± 303                  | 535 ± 250 | 277 ± 17                       | 210 ± 14 | 138 ± 18                 | 148 ± 014 | 97 ± 1.2           | 88 ± 2.4 |
| Teste-t                                                | p = 0,1810                 |           | p <0,0001                      |          | p = 0,3040               |           | p < 0,0001         |          |
| % de Redução <sup>b</sup>                              | DT = 30,15                 |           | DW = 24,66                     |          | DO = -7,27               |           | DF = 8,97          |          |
| Eficácia =100 [1 - (535/766 x 148/138 x 88/97)] = 32 % |                            |           |                                |          |                          |           |                    |          |

<sup>a</sup>Média aritmética ± desvio padrão; estão mostrados os valores p do teste-t para amostras independentes.

<sup>b</sup>As porcentagens de redução foram calculadas em relação ao grupo controle: %DT, número de teleóginas; %DW, peso das teleóginas; %DO, capacidade de postura; %DF, fertilidade dos ovos. Eficácia (%) = 100[1-(CRT x CRO x CRF)]; onde CRT: redução do número de carrapatos adultos; CRO: redução da capacidade de postura, CRF: redução da fertilidade.



### ARTIGO 3

[CUNHA, R. C. et al. Calculation of the efficacy of vaccines against tick infestations on cattle. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 4, p. 1–8, 2013]

## CÁLCULO DE EFICÁCIA DE VACINAS CONTRA A INFESTAÇÃO DE CARRAPATOS NOS BOVINOS

Rodrigo Casquero Cunha<sup>1</sup>; Renato Andreotti<sup>2</sup>; Marcos Valério Garcia<sup>2</sup>; André de Abreu Rangel Aguirre<sup>1</sup>; Alexandre Leitão<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, MS, Brasil

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Corte, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Departamento de Sanidade Animal, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>3</sup>Instituto de Investigação Científica Tropical – IICT, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal – CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa – UTL, Lisboa, Portugal

### Resumo

Carrapatos de bovinos são responsáveis por grandes perdas econômicas para a pecuária bovina mundial e seu principal método de controle, o químico, vem apresentando problemas, seja pelo desenvolvimento de cepas de carrapatos resistentes ou pela contaminação ambiental. Na tentativa de diminuir a utilização dos acaricidas, surgem pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de vacinas contra carrapatos. Uma maneira de avaliar essas vacinas é pelo cálculo de porcentagem de eficácia. O objetivo deste trabalho foi analisar as publicações científicas indexadas no PubMed que utilizaram este método de avaliação e discutir os principais fatores que podem interferir no seu cálculo. Dessa maneira, selecionaram-se 25 artigos que tratavam desse assunto. A porcentagem de eficácia apareceu sendo calculada de duas formas, uma considerando a redução da fertilidade dos ovos e a outra não. Essa última pode subestimar a eficiência da vacina, e a fórmula de cálculo da eficácia mais completa representa o quanto da infestação a vacina realmente reduziu. Em nosso entendimento, a utilização da fórmula completa para o cálculo da porcentagem de eficácia é mais abrangente e representativa do efeito da vacina na população de carrapatos.

**Palavras-chave:** Eficiência, carrapato, vacina, bovino.

## Introdução

Os carrapatos-do-boi são ectoparasitas responsáveis por grandes perdas econômicas, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais. O controle da infestação de carrapatos em bovinos baseia-se principalmente na utilização de acaricidas. Entretanto, o desenvolvimento de carrapatos cada vez mais resistentes aos princípios ativos existentes, assim como, a preocupação com contaminação ambiental, sublinham a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos de controle. Neste contexto, surgem as vacinas contra carrapato.

O cálculo de porcentagem eficácia para vacinas contra carrapatos que afetam bovinos é utilizado para representar a proteção de uma vacina contra uma cepa de determinada espécie de carrapato. Os primeiros a testarem a eficácia de uma vacina contra carrapato bovino foram Wong e Opdebeeck (1989). Para isso utilizaram apenas três parâmetros de análise que foram o número total de carrapatos, a porcentagem de carrapatos com alterações no seu aspecto normal (danificados) e o peso total de ovos. Estes autores mensuraram, ainda, uma quarta variável que denominaram de porcentagem de imunoproteção. Esta última era calculada a partir do peso de ovos do grupo vacinado em relação ao peso de ovos do grupo controle. Oito anos após, Canales et al. (1997) calcularam pela primeira vez a eficácia propriamente dita, considerando três variáveis para o seu cálculo: produção total de carrapatos, capacidade de oviposição e fertilidade. Em seguida, Fragoso et al. (1998) utilizaram estas medidas ao testarem a vacina comercial Gavac<sup>TM</sup> (Heber Biotec S.A., P.O. Box 6162, Havana, Cuba), desenvolvida para ser utilizada como ferramenta de controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, em cepas de carrapatos *R. (B.) annulatus* isoladas do México e Iran. Desta maneira este cálculo serviu como padrão para outras publicações.

Mais tarde, Patarroyo et al. (2002) também utilizaram esta medida de proteção, porém com algumas modificações e, a partir de então, diversos autores têm utilizado esta medida para quantificar a proteção de suas vacinas. Alguns autores acrescentam variáveis (DE LA FUENTE et al., 2010) e outros subtraem (AZHAHIANAMBI et al., 2009a; AZHAHIANAMBI et al., 2009b; JEYABAL et al., 2010; MERINO et al., 2011) de acordo com suas condições laboratoriais e seu desenho experimental.

O objetivo deste artigo é analisar trabalhos publicados em revistas com arbitragem científicas por pares que calcularam a porcentagem de eficácia de vacinas contra carrapatos de bovinos em teste de estábulo, comparando as diferentes abordagens metodológicas.

## Material e métodos

### *Revisão bibliográfica*

A pesquisa na internet para consultar artigos de interesse foi realizada pelo provedor da Embrapa Gado de Corte. O site de busca utilizado foi o PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), sem a utilização de filtros de pesquisas e utilizando-se das palavras-chave combinadas entre si “Tick”, “Vaccine” ou “Immunization”. Dessa maneira, o algoritmo utilizado para a busca foi: TICKS AND (VACCINES OR IMMUNIZATION).

Foram selecionados apenas trabalhos realizados com vacinas contra carrapatos de bovinos avaliadas em teste de estábulo com o cálculo de porcentagem de eficácia e/ou eficiência. Portanto, foram excluídos da base de dados todos os trabalhos que contemplavam experimentação de vacinas para bovinos, porém, testados somente em outras espécies de animais, mesmo que realizado o cálculo de porcentagem de eficácia.

### *Banco de Dados*

Um banco de dados foi tabulado no programa computacional Excel com as principais variáveis dos experimentos. Os dados, das metodologias, sem importância no desenho experimental do trabalho foram desconsiderados. As variáveis consideradas de importância foram:

- Variáveis interferentes: espécie de carrapato, raça dos bovinos, idade e peso dos animais e adjuvante utilizado na vacina.
- Variáveis independentes: tipo de delineamento, número de repetições, utilização de controles positivo e negativo, número e tipo (qualitativo ou quantitativo) de tratamentos e dose (em miligramas de antígeno), via e número de aplicações das vacinas.
- Variáveis dependentes: número total de teleóginas no grupo vacinado (NTV), número total de teleóginas no grupo controle negativo (NTC), efeito no número de teleóginas ingurgitadas  $\{\%DT = 100[1-(NTV/NTC)]\}$ , peso médio de teleóginas no grupo vacinado (WTV), peso médio de teleóginas no grupo controle negativo (WTC), efeito no peso das teleóginas  $\{\%DW = 100[1-(WTV/WTC)]\}$ , peso médio de ovos por teleóginas do grupo vacinado (PATV), peso médio de ovos por teleóginas do grupo controle (PATC), efeito na oviposição  $\{\%DO = 100[1-(PATV/PATC)]\}$ , média de

peso de larva por grama de ovos no grupo vacinado (PPLOV), média de peso de larva por grama de ovos no grupo controle (PPLOC), efeito na fertilidade dos ovos  $\{\%DF = 100[1-(PPLOV/PPLOC)]\}$ , redução do número de teleóginas no grupo vacinado / controle (CRT), redução da oviposição no grupo vacinado / controle (CRO), redução na fertilidade dos ovos no grupo vacinado / controle (CRF) e a proteção da vacina contra o carrapato considerando os efeitos em CRT, CTO e/ou CRF  $\{\% \text{ de Eficácia } (\%E) = 100[1-(CRT \times CRO \times CRF)]\}$ .

Nos trabalhos que realizaram infestação com carrapatos heteroxenos, foram considerados apenas aqueles artigos que relatavam o teste de porcentagem de eficácia após a infestação com a fase adulta do parasita e, dessa maneira, estimaram %DT, %DO, %DF e %E a partir de coleta de fêmeas ingurgitadas, desconsiderando aqueles cálculos de efeito da vacina nas fases de larva e ninfa.

Também foram observados os testes estatísticos utilizados nas análises de comparação entre as variáveis dos grupos vacinados em relação aos respectivos grupos controles.

## Resultados

Foram encontrados 1.134 artigos a partir da pesquisa com o algoritmo utilizado. Desses, foram encontrados diversos artigos com experimentação de vacinas para bovinos, porém, testados em outras espécies de animais, como por exemplo camundongo (CANALES et al., 2009), coelhos (BIAN et al., 2011), ovelhas (ALMAZÁN et al., 2005) e cervídeos (CARREÓN et al., 2012).

Quanto a experimentação com bovinos estabulados, foram encontrados 25 trabalhos, que variaram de data desde 1989 até 2012, distribuídos em 13 revistas: *BMC Biotechnology*, *Experimental Parasitology*, *Immunology*, *International Immunopharmacology*, *Journal of Parasitology Research*, *Parasite Immunology*, *Parasitology research*, *Research in Veterinary Science*, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Brazilian Journal of Veterinary Parasitology)*, *Transboundary and Emerging Diseases*, *Vaccine*, *Veterinary Immunology and Immunopathology* e *Veterinary Parasitology*. Destes, um foi publicado em 1989, um em 1997, um em 1998, um em 2000, dois em 2002, um em 2006, um em 2007, quatro em 2009, quatro em 2010, três em 2011 e seis em 2012.

Os desafios foram realizados com *Amblyomma americanum* (1 artigo), *Hyalomma anatolicum anatolicum* (5 artigos), *H. scupense* (1 artigo), *H. excavatum* (1 artigo), *R. (B.) annulatus* (4 artigos), *R. haemaphysaloides* (1 artigo), *R. (B.) microplus* (17 artigos) and *Ixodes ricinus* (1 artigo).

Quanto ao delineamento experimental, todos foram do tipo delineamento inteiramente casualizado, com exceção de um (CANALES et al., 1997) que não comentou. O número de animais por grupo, sendo cada animal uma repetição em todos os artigos, variou de 3 a 16, sendo que a grande maioria (21/25) utilizou de 3 a 6 animais por grupo. Dois autores não citaram o número de animais por grupo (CANALES et al., 1997; FRAGOSO et al., 1998) e três artigos utilizaram grupos com números de animais diferentes (ANDREOTTI, 2006; AZHAHIANAMBI et al., 2009a; KUMAR et al., 2012a). Três trabalhos tiveram grupo controle negativo não vacinado, 21 vacinado com salina e/ou adjuvante em igual volume e um apenas não citou qual foi o tratamento controle (CANALES et al., 1997). Apenas 6 trabalhos utilizaram grupo controle positivo, dos quais, 6 citaram o antígeno rBm86 e 3 a vacina comercial Gavac<sup>TM</sup>. Apenas um trabalho utilizou dois grupos controles negativos, um vacinado com o adjuvante (saponina) e outro somente salina (AZHAHIANAMBI et al., 2009a).

Grande parte dos trabalhos pesquisados (11/25) utilizou apenas 2 grupos experimentais, sendo sempre um controle negativo e outro vacinado. Outros utilizaram 3 (4/25), 4 (2/25), 5 (1/25), 6 (4/25), 8 (1/25) e 18 (1/25) grupos experimentais, todos com formulações de antígenos diferentes, sendo que um dos trabalhos não deixa claro quantos grupos foram utilizados (CANALES et al., 1997). Na maioria dos trabalhos foi utilizado animais cruzados (17/25). Destes, um artigo trabalhou com grupos de animais cruzados e holandeses (CANALES et al., 1997), outro com animais cruzados e Aberdeen Angus (FRAGOSO et al., 1998) e outro com cruza de Nellore e Simmental (ANDREOTTI, 2007). Três artigos citam que utilizaram raça européia cruzada, porém não comentam quais as raças (ALMAZÁN et al., 2010; KUMAR et al., 2012a; MERINO et al., 2011). Dos demais, duas publicações citam a utilização de animais da raça Hereford (PARIZI et al., 2011; WONG e OPDEBEECK, 1989) e três da raça Holandesa (CANALES et al., 1997; GALAÏ et al., 2012; GARCÍA-GARCÍA et al., 2000). Um outro não descreveu com que raça trabalhou (JEYABAL et al., 2010). Apenas três trabalhos controlaram o peso dos animais, sendo que destes, um não descreveu o peso médio dos animais (ANDREOTTI, 2006, 2007; MILLER et

al., 2012). A idade dos animais experimentados variou de 6 a 12 meses, sendo que seis autores não controlaram ou omitiram esta variável interferente.

Todos os trabalhos foram de caráter qualitativo e a dose aplicada variou de 0,016 mg a 2 mg de antígenos. A maioria dos trabalhos (17/25) utilizou a dose de 0,1 mg de antígeno e sete trabalhos aplicaram a dose de 0,125 mg a 0,4 mg, um aplicou doses de 0,016 mg a 0,5 mg (WONG e OPDEBEECK, 1989). Apenas um utilizou dose de 2 mg de antígeno (PATARROYO et al., 2002). Apresentações de adjuvante Montanide foram as mais utilizadas (18/25), seguidas por saponinas (5/25), hidróxido de alumínio gel (2/25), Marcol 52 (1/25) e adjuvante de Freund completo. Dos trabalhos que utilizaram Montanide, 16 utilizaram a dose de 0,1 mg de antígeno. A maior dose encontrada foi de 2 mg em adjuvante saponina. A grande maioria aplicou 3 doses de vacina (20/25). Em um trabalho foram aplicadas 4 doses com intervalos de um mês (KUMAR et al., 2009) e, em outro trabalho, foram aplicadas seis doses com 15 dias de intervalo. A aplicação intramuscular foi a mais utilizada (16/25), seguida pela subcutânea (7/25). Dois trabalhos não relataram a via de inoculação da vacina (ANDREOTTI et al., 2012; CANALES et al., 1997).

Vinte e quatro trabalhos calcularam as variáveis NTV, NTC e %DT, sendo que apenas um não as calculou (WONG e OPDEBEECK, 1989). Seis trabalhos não calcularam as variáveis WTV, WTC e %DW. Todos os trabalhos calcularam as variáveis PATV, PATC e %DO. Oito trabalhos não calcularam as variáveis PPLOV, PPLOC e %DF. Dezesesseis artigos utilizaram a fórmula mais completa para o cálculo da eficácia, considerando as variáveis CRT, CRO e CRF, enquanto sete consideraram apenas CRT e CRO, um considerou somente CRO para o cálculo de eficácia (WONG e OPDEBEECK, 1989) e um considerou uma quarta variável, designada por EF ( $FE = \text{peso de ovos} / \text{peso de teleóquina}$ ), para o cálculo da eficácia (ANDREOTTI et al., 2002).

Quanto aos testes estatísticos utilizados para comparar as médias das variáveis entre os grupos vacinados e controles, o teste mais utilizado foi o teste-t de *Student* (13/25), seguido por análise de variância (ANOVA; 9/25), *Mann-Whitney* (3/25),  $X^2$ -test (2/25), *Tukey* (1/25) e *Wilcoxon* (1/19). Três artigos citaram ter utilizado programas estatísticos. Um deles apenas colocou os nomes dos programas sem fazer referência ao comando ou teste utilizado (KUMAR et al., 2012b) e um, que utilizou o *statistical analysis software* (SAS), citou ter utilizado o procedimento *Generalized Linear Mixed Model* (GLMMIX) (MILLER et al., 2012).

## Discussão

O cálculo da eficácia de uma vacina contra carrapatos é fundamental para a sua avaliação. Os trabalhos que utilizam outras espécies animais para vacinação (ALMAZÁN et al., 2005; CANALES et al., 2009; BIAN et al., 2011), antes do teste em bovinos, o fazem por diversos motivos. Geralmente estes experimentos ocorrem a fim de testar se a vacina é imunogênica e também de otimizar possíveis doses, para então serem utilizadas em bovinos, uma vez que o ensaio nesta última espécie animal é de custo elevado e exige instalações individuais e apropriadas para a coleta dos carrapatos. Além disso, o teste em bovino é o último passo para a caracterização de uma vacina contra carrapatos destas espécies. Dessa maneira, também se pode explicar porque foram encontrados apenas 25 trabalhos utilizando metodologias de teste em bovinos estabelecidos.

A revista que mais publicou trabalhos desta área foi a *Vaccine* (9/25), o que faz sentido pois é uma revista direcionada para a publicação de novas tecnologias em vacinas. Nesta revista foram publicados três dos primeiros artigos sobre vacina contra carrapato bovino (CANALES et al., 1997; FRAGOSO et al., 1998; GARCÍA-GARCÍA et al., 2000). Anos depois, outros seis artigos foram publicados (ANDREOTTI et al., 2012; DE LA FUENTE et al., 2010; GALAÏ et al., 2012; HAJDUSEK et al., 2010; MERINO et al., 2011; MILLER et al., 2012). Convém destacar que todos os trabalhos foram publicados em revistas de grande impacto nas áreas de medicina veterinária, parasitologia e sanidade animal.

O delineamento inteiramente casualizado foi o mais utilizado devido às características deste tipo de experimento, uma vez que os animais precisam ficar em baias individuais para que não haja a mistura de carrapatos que caem de um animal com os de outro animal. Assim, todo o experimento pode ser conduzido individualmente por animal, constituindo cada animal uma repetição. O número de repetições pode ser considerado pequeno em relação ao que se quer testar, uma vez que a variação na produção de carrapatos entre animais do mesmo grupo é muito grande. Dos trabalhos que utilizaram três animais, o mínimo utilizado, dois deles utilizaram 3 animais apenas no grupo controle e 4 (PARIZI et al., 2011) e 5 (AZHAHIANAMBI et al., 2009) nos grupos vacinados. Mesmo os trabalhos que utilizaram 3 ou 4 animais por grupo conseguiram mostrar diferenças significativas nos dados da biologia do carrapato entre os grupos vacinados e controles. Alguns autores utilizaram 5 bovinos por grupo (GALAÏ et al., 2012; JEYABAL et al., 2010; KUMAR et al., 2012a, b; MILLER et al., 2012) e conseguiram mostrar diferenças entre os grupos vacinado e controle, em alguns dos

parâmetros biológicos analisados, com  $p < 0,05$ . Porém, outros autores que utilizaram 5 repetições por grupo (AZHAHIANAMBI et al., 2009a, b; CANALES et al., 2009), não mostraram a significância do teste de comparação entre os grupos. Os trabalhos que utilizaram maior número de repetições foram dois com 8 animais por grupo (ANDREOTTI et al., 2002; ANDREOTTI, 2007), que encontrou significância de  $p < 0,01$  para a diferença de produção de carrapato entre os grupos vacinado e controle, e outro com 16 animais por grupo (ANDREOTTI, 2006), que citou ter encontrado diferença significativa do teste, porém não coloca qual foi o seu nível, ou o valor  $p$ .

A utilização de um grupo controle negativo é fundamental para se estabelecer a proteção média da vacina, pois a produção de carrapato do grupo vacinado é comparada ao grupo controle negativo. Estas comparações das variáveis dependentes dentro dos grupos vacinados em relação ao controle negativo permitem inferir a porcentagem de proteção da vacina contra o carrapato. Três trabalhos sequer simularam a aplicação da vacina ao grupo controle (FRAGOSO et al., 1998; ANDREOTTI, 2006; KUMAR et al., 2009), isso pode ter interferido nas variáveis respostas pois estes animais não sofreram o estresse que os animais dos grupos vacinados podem ter sofrido, pois foram tratados em diferentes condições. Ainda, o controle negativo ideal seria, não só a aplicação de um volume igual de um placebo como salina (por exemplo, salina), mas sim toda a composição vacinal sem o antígeno em questão e, podendo ser aplicado junto, um outro antígeno conhecido não relacionado com os carrapatos, como por exemplo a ovalbumina, se fosse possível aplicar esse antígeno com a mesma composição da vacina.

O grupo controle positivo é importante para constatar a capacidade de resposta dos animais utilizados à uma vacina já estudada, como por exemplo a Gavac<sup>TM</sup>, excluindo-se assim variáveis de interferência como os fatores indivíduo, ambiental e outros relacionados a uma possível não resposta do animal à vacina.

Todos os trabalhos que utilizaram 2 grupos experimentais trabalharam com 1 grupo vacinal e outro grupo controle negativo. Apesar de todos os trabalhos terem sido de caráter qualitativo, dois trabalhos (CANALES et al., 1997; SUGUMAR et al., 2011) fizeram previamente um teste quantitativo em camundongos para definir a dose mínima a ser injetada em bovinos. Sugumar et al. (2011) encontraram como sendo de 0,2 mg por dose, utilizando hidróxido de alumínio como adjuvante. Se essa concentração pudesse ser extrapolada para os demais antígenos e adjuvantes, poderíamos dizer que a maioria das vacinas foi formulada com



quantidade insuficiente de antígeno vacinal. No entanto, a quantidade de antígenos numa composição vacinal não pode ser estabelecida por comparação com uma formulação vacinal diferente. Deve ser estabelecida utilizando a mesma formulação de vacina na espécie alvo.

Alguns estudos que utilizam mais de dois tratamentos poderiam ter trabalhado com doses diferentes para determinar a dose ideal, mas optaram por utilizar diferentes antígenos e não falar como a melhor dose foi escolhida. Além disso, os níveis de anticorpos necessários para se alcançar a máxima eficácia da vacina pode variar entre antígenos. Para Bm86, há uma correlação direta entre o título de anticorpos para este antígeno e a eficácia da vacinação, medida através do efeito direto sobre a fertilidade das fêmeas de carrapatos ingurgitadas em bovinos vacinados em pastejo (DE LA FUENTE et al., 1998). Também existe uma correlação entre os títulos de anticorpos para outros antígenos, tais como Bm95, Subolisin (SUB), Fator de Alongamento 1a (EF1a), Ubiquitina (UBQ), Akirin (AKR) e Inibidor de Tripsina (RmLTI), e a eficácia da vacina (ALMAZÁN et al., 2012; ANDREOTTI et al., 2012; CARREÓN et al., 2012; DE LA FUENTE et al., 1998; HAVLÍKOVÁ et al., 2013; MERINO et al., 2011; MORENO- CID et al., 2013). Em alguns experimentos, diferentes quantidades Bm86 foram testadas, e 100 µg foi aceito como a composição ótima (GARCÍA-GARCÍA et al., 1998; RODRÍGUEZ et al., 1994; WILLADSEN et al., 1989). Da mesma forma, nenhum estudo testou diferentes vias de administração da vacina, ou diferentes adjuvantes para estabelecer a melhor forma de apresentar os antígenos vacinais para o sistema imune dos animais. Outro aspecto a ser considerado é a importância de uma avaliação da segurança da vacina. Por exemplo, para demonstrar a segurança e os efeitos sobre parâmetros reprodutivos nos bovinos da vacina Gavac<sup>TM</sup>, a sua toxicidade foi avaliada em camundongos e cobaias (BOUÉ et al., 1999)

A grande maioria dos artigos utilizou para sua metodologia animais cruzados. De certa maneira, utilizar animais cruzados, sem raça definida, é vantajoso uma vez que se pensa em bovinos em geral, por serem mais representativos da população bovina alvo da vacina. Por outro lado, sabe-se que animais com sangue europeu são mais suscetíveis à infestação por carrapatos e dentro de um grupo de animais cruzados pode haver diferentes graus de sangue. Por outro lado, a utilização de uma raça pura de bovinos, apesar de contribuir para a homogeneidade do grupo, não é representativa de todas as raças. Apesar disso, pode ser um passo importante para a otimização da vacina, uma vez que outros ensaios poderão ser feitos

para testar a vacina em outras populações bovinas mais representativas, como um ensaio a campo, por exemplo.

A variável interferente “peso médio dos animais” foi negligenciada ou omitida na grande maioria dos trabalhos (21/25), sendo que apenas quatro citam o peso dos animais (ANDREOTTI et al., 2002; ANDREOTTI, 2006, 2007; MILLER et al., 2012) e somente um cita que os animais foram pesados (FRAGOSO et al., 1998), porém omite a informação de que o peso foi bloqueado. O peso de um animal pode interferir, uma vez que reflete não só o estado corporal do animal e seu status de saúde, mas também, animais menores e mais magros podem não ter a mesma suscetibilidade, ou resistência, aos carrapatos quanto animais mais pesados, principalmente quando se trata da mesma raça, onde os animais contemporâneos costumam ter o mesmo padrão corporal (DE LA FUENTE et al., 1998).

A variável interferente mais bem bloqueada foi a idade dos animais que não ultrapassou os 12 meses. Mesmo assim, 7 autores não consideraram ou omitiram esta informação que é de suma importância para se analisar a possibilidade de exposição prévia ao carrapato e seus antígenos, o que poderia interferir na resposta imunológica vacinal. Em casos de padronização de vacinas, é comum a utilização de animais que nunca entraram em contato com antígenos, conhecidos como "*naive*". Porém, é muito difícil conseguir um bovino que seja literalmente *naive*, pois a infraestrutura necessária para tal seria muito cara. Dessa maneira, tentando bloquear essa variável interferente, poderiam ser utilizados animais de locais livres de carrapatos e com idade suficiente para que o colostro não atue na época do teste.

Das variáveis resposta, NTV, NTC e %DT representam o primeiro efeito a ser observado após a infestação. A %DT, que é o produto  $NTV/NVC$ , é dado em porcentagem e representa a diminuição de carrapatos adultos após a vacinação sob condições experimentais de infestação. É de grande importância que se considere esta variável, uma vez que representa não só o quanto a vacina diminui de carrapatos adultos, mas também a diminuição na fixação das larvas após a infestação experimental, assim como, parte da diminuição da infestação ambiental, uma vez que as teleóginas ingurgitadas caem no solo e fazem a postura reinfestando-o. Apenas um artigo não considerou esta variável (WONG e OPDEBEECK, 1989), que foi um dos primeiros a estudar vacinas contra carrapato bovino em teste de estábulo.

WTV, WTC e DW não são consideradas para o cálculo de eficácia porque o peso dos ovos por teleógina (%DO), que é utilizado, considera as variáveis PATV e PATC e é proporcional ao peso das teleóginas. Porém alguns autores gostam de considerá-las porque representam a diminuição na eficiência de alimentação das teleóginas após a vacinação. Neste caso, pensando em eficiência contra o carrapato, o melhor seria a utilização de %DO (CRO) para o cálculo da eficiência, uma vez que representa o efeito da vacina na oviposição, além de que nem todas as teleóginas conseguem ovipor.

PPLOV e PPLOC são calculados em função da capacidade de eclosão dos ovos e %DF representa a porcentagem de diminuição dessa capacidade. Este dado, junto com %DT e %DO, representa a porcentagem de diminuição da infestação ambiental.

A eficácia, propriamente dita, aparece sendo calculada de duas formas principais:  $%E = 100[1-(CRT \times CRO \times CRF)]$  e  $%E = 100[1-(CRT \times CRO)]$ . Esta segunda fórmula, não tem em consideração se os ovos são férteis ou não, podendo subestimar a eficiência da vacina. Como por exemplo, pode acontecer que o grupo vacinado tenha uma produção de ovos normal, ou mesmo acima do grupo controle, porém estes ovos não serão tão férteis como os do grupo controle (ANDREOTTI et al., 2012; CUNHA et al., 2012). Dessa maneira, a fórmula de cálculo de porcentagem de eficácia mais completa acumula os três efeitos e ao final representa o quanto da infestação a vacina reduziu, o quanto teve de efeito na oviposição dos carrapatos que sobreviveram e o quanto que estes ovos que foram postos eram férteis em relação a população controle. A não utilização de %DF torna o cálculo impreciso, uma vez que pode acontecer de este dado ser negativo, representando que as amostras dos ovos do grupo vacinado foram mais férteis que as do grupo controle. Desta maneira, o cálculo da eficácia estaria sendo superestimado, já que o cálculo se dá por amostragem.

Quanto ao cálculo estatístico, o teste utilizado depende das variáveis a serem analisadas. Dentro do grupo controle negativo, geralmente se tem uma concentração da dispersão dos valores próximo à média do grupo (população). Diferentemente, o grupo vacinado apresenta, devido ao fator individual de resposta à vacina, uma maior dispersão desses valores, aumentando a variância. Nesses casos, em geral, podemos utilizar uma análise de variância (ANOVA), que vai analisar se a diferença observada entre dois grupos é devida às variações aleatórias de uma amostra em relação a outra ou se os dados vêm de populações verdadeiramente diferentes. Pode-se utilizar o teste F associado ao ANOVA, que vai testar a hipótese nula de que todas as populações têm a mesma média. O teste t (de Student) para a

diferença entre duas médias também pode ser utilizado, podendo ser considerado em casos particulares uma análise de variância (ANOVA 1 fator). Dessa maneira, consegue-se estabelecer se o grupo vacinado teve um determinado parâmetro biológico diferente do grupo controle.

Neste trabalho estão citados e discutidos os principais fatores que podem afetar o cálculo de porcentagem de eficácia de uma vacina contra carrapato bovino e que, portanto, devem ser bloqueados. Em nosso entendimento, a utilização da fórmula completa, que contempla CRT, CRO e CRF, para o cálculo da porcentagem de eficácia, é mais abrangente e representativa do efeito da vacina na população de carrapatos.

## Referências

- Almazán C, Kocan KM, Blouin EF, De La Fuente J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine* 2005; 23(46-47): 5294-5298. doi:10.1016/j.vaccine.2005.08.004
- Almazán C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, et al. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitol Res* 2010; 106(2): 471-479. doi:10.1007/s00436-009-1689-1
- Almazán C, Moreno-Cantú O, Moreno-Cid JA, Galindo RC, Canales M, Villar M, et al. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine* 2012; 30(2): 265-272. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22085549>
- Andreotti R. Performance of two Bm86 antigen vaccine formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. *Rev Bras Parasitol Vet* 2006; 15(3): 97-100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978472>
- Andreotti R. A synthetic bmti n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. *Exp Parasitol* 2007; 116(1): 66-70. doi:10.1016/j.exppara.2006.11.009
- Andreotti R, Cunha RC, Soares MA, Guerrero FD, Leite FPL, De León AP. Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine* 2012; 30(47): 6678-3385. doi:10.1016/j.vaccine.2012.08.066
- Andreotti R, Gomes A, Malavazi-Piza KC, Sasaki SD, Sampaio CAM, Tanaka AS. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *Int Immunopharmacol* 2002; 2(4): 557-563. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11962734>

Azhahianambi P, De La Fuente J, Suryanarayana VVS, Ghosh S. Cloning, expression and immunoprotective efficacy of rHaa86, the homologue of the Bm86 tick vaccine antigen, from *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Parasite Immunol* 2009a; 31(3): 111-122. doi:10.1111/j.1365-3024.2008.01082.x

Azhahianambi P, Ray DD, Chaudhuri P, Gupta R, Ghosh S. Vaccine Efficacy of Bm86 Ortholog of *H. a. anatolicum*, rHaa86 Expressed in Prokaryotic Expression System. *J Parasitol Res* 2009b; 1-7. doi:10.1155/2009/165812

Bian Y, Chen W, Yang G, Gu X, Wang S, Sun J, et al. Cloning, expression and evaluation of the efficacy of a recombinant *Haemaphysalis concinna* Hc-23 antigen in rabbits. *Vaccine* 2011; 29(5): 1041-1044. doi:10.1016/j.vaccine.2010.11.062

Boué O, Redondo M, Montero C, Rodríguez M, De La Fuente J. Reproductive and safety assessment of vaccination with Gavac against the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Theriogenology* 1999; 51(8): 1547-1554. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00097-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00097-7)

Canales M, Enríquez A, Ramos E, Cabrera D, Dandie H, Soto A, et al. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. *Vaccine* 1997; 15(4):414-422. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9141213>

Canales M, Labruna MB, Soares JF, Prudencio CR, De La Fuente J. Protective efficacy of bacterial membranes containing surface-exposed BM95 antigenic peptides for the control of cattle tick infestations. *Vaccine* 2009; 27(52): 7244-7248. doi:10.1016/j.vaccine.2009.09.123

Carreón D, De La Lastra JMP, Almazán C, Canales M, Ruiz-Fons F, Boadella M, et al. Vaccination with BM86, subolesin and akirin protective antigens for the control of tick infestations in white tailed deer and red deer. *Vaccine* 2012; 30(2): 273-279. doi:10.1016/j.vaccine.2011.10.099

Cunha R, León AP, De Leite F, Pinto LDS, Santos Júnior A, Andreotti R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21(3): 254-262. Retrieved from [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-29612012000300014&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-29612012000300014&script=sci_arttext)

De La Fuente J, Manzano-Roman R, Naranjo V, Kocan KM, Zivkovic Z, Blouin EF, et al. Identification of protective antigens by RNA interference for control of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Vaccine* 2010; 28(7): 1786-1795. doi:10.1016/j.vaccine.2009.12.007

De La Fuente J, Rodríguez M, Redondo M, Montero C, García-García JC, Méndez L, et al. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac<sup>TM</sup> against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine* 1998; 16(4): 366-373.

Fragoso H, Rad PH, Ortiz M, Rodríguez M, Redondo M, Herrera L, et al. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *Vaccine* 1998; 16(20): 1990-1992.

Galai Y, Canales M, Saïd MB, Gharbi M, Mhadhbi M, Jedidi M, et al. Efficacy of *Hyalomma scupense* (Hd86) antigen against *Hyalomma excavatum* and *H. scupense* tick infestations in cattle. *Vaccine* 2012; 30(49): 7084-7089. doi:10.1016/j.vaccine.2012.09.051

García-García JC, Soto A, Nigro F, Mazza M, Joglar M, Hechevarría M, et al. Adjuvant and immunostimulating properties of the recombinant Bm86 protein expressed in *Pichia pastoris*. *Vaccine* 1998; 16(9-10): 1053-1055. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9682358>

García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boué O, et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 2000; 18(21): 2275-2287. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10717348>

Hajdusek O, Almazán C, Loosova G, Villar M, Canales M, Grubhoffer L, et al. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine* 2010; 28(17): 2993-2998. doi:10.1016/j.vaccine.2010.02.008

Havlíková S, Ličková M, Ayllón N, Roller L, Kazimírová M, Slovák M, et al. Immunization with recombinant subolesin does not reduce tick infection with tick-borne encephalitis virus nor protect mice against disease. *Vaccine* 2013; 31(12): 1582-1589. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23357197>

Jeyabal L, Azhahianambi P, Susitha K, Ray DD, Chaudhuri P, Vanlahmuaka, et al. Efficacy of rHaa86, an orthologue of Bm86, against challenge infestations of *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Transbound Emerg Dis* v 2010; 27(1-2): 96-102. doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01107.x

Kumar A, Garg R, Yadav CL, Vatsya S, Kumar RR, Sugumar P, et al. Immune responses against recombinant tick antigen, Bm95, for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in cattle. *Vet Parasitol* 2009; 165(1-2): 119-124. doi:10.1016/j.vetpar.2009.06.030

Kumar B, Azhahianambi P, Ray DD, Chaudhuri P, De La Fuente J, Kumar R, et al. Comparative efficacy of rHaa86 and rBm86 against *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasite Immunol* 2012a; 34(6): 297-301. doi:10.1111/j.1365-3024.2012.01356.x

Kumar B, Murugan K, Ray DD, Ghosh S. Efficacy of rBm86 against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (IVRI-I line) and *Hyalomma anatolicum anatolicum* (IVRI-II line) infestations on bovine calves. *Parasitol Res* 2012b; 111(2): 629-635. doi:10.1007/s00436-012-2879-9

Merino O, Almazán C, Canales M, Villar M, Moreno-Cid JA, Estrada-Peña A, et al. Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks fed on cattle. *Vaccine* 2011; 29(12): 2248-2254. doi:10.1016/j.vaccine.2011.01.050

Miller R, Estrada-Peña A, Almazán C, Allen A, Jory L, Yeater K, Pérez De León AP. Exploring the use of an anti-tick vaccine as a tool for the integrated eradication of the cattle

fever tick, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Vaccine* 2012; 30(38): 5682-5687. doi:10.1016/j.vaccine.2012.05.061

Moreno-Cid JA, Pérez De La Lastra JM, Villar M, Jiménez M, Pinal R, Estrada-Peña A, et al. Control of multiple arthropod vector infestations with subolesin/akirin vaccines. *Vaccine* 2013; 31(8): 1187-1196. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23291476>

Parizi LF, Utiumi KU, Imamura S, Onuma M, Ohashi K, Masuda A, et al. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Exp Parasitol* 2011; 127(1): 113-118. doi:10.1016/j.exppara.2010.07.001

Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Pimentel JC, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88(3-4): 163-172. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12127414>

Rodríguez M, Rubiera R, Penichet M, Montesinos R, Cremata J, Falcón V, et al. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J Biotechnol* 1994; 33(2): 135-146. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764729>

Sugumar P, Chandran D, Sudha Rani G, Shahana PV, Maske DK, Rangarajan PN, et al. Recombinant mid gut antigen (Bm95) as a vaccine against Indian *Rhipicephalus haemaphysaloides* in *Bos indicus* cattle. *Res Vet Sci* 2011; 90(2): 262-268. doi:10.1016/j.rvsc.2010.05.037

Willadsen P, Riding GA, McKenna RV, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, et al. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J Immunol* 1989; 143(4): 1346-1351. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2745982>

Wong JY, Opdebeeck JP. Protective efficacy of antigens solubilized from gut membranes of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Immunology* 1989; 66(1): 149-155. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1385135&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

TABELA

| Variáveis Independentes    |                                                                             |            |               |                    |                         |                                     | Variáveis interferentes |     |             |           | Variáveis dependentes |                         |                          |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------|---------------|--------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----|-------------|-----------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| Referência                 | Tick                                                                        | Repetições | Controle Pos. | Controle Neg.      | Raça                    | Adjuvante                           | Nº de doses             | Via | Dose (mg)   | Peso (kg) | Idade (meses)         | Fórmula de %E utilizada | Eficácia máxima referida |
| Almazan et al., 2010       | <i>R. (B.) microplus</i>                                                    | 4          | Bm86          | Adjuvante + salina | Europeu cruzado         | Montanide ISA 50 V                  | 3                       | IM  | 0,1         | 0         | 12                    | 100 [1-(CRT×CROxCRF)]   | 60%                      |
| Andreotti et al., 2002     | <i>R. (B.) microplus</i>                                                    | 8          | 0             | Veículo            | Nellore                 | Freund's                            | 3                       | SC  | 0,1         | 150       | 6                     | 100[1-(CRT×CRW×CRO)]    | 72,80%                   |
| Andreotti et al., 2012     | <i>R. (B.) microplus</i>                                                    | 6          | 0             | Adjuvante + salina | Cruzado                 | Montanide ISA 61 VG                 | 3                       | 0   | 0,1         | 0         | 12                    | 101 [1-(CRT×CROxCRF)]   | 32%                      |
| Andreotti, 2006            | <i>R. (B.) microplus</i>                                                    | 16 e 8     | 0             | Não vacinados      | Cruzado                 | Gavac e TickGard                    | 2                       | SC  | 0,1         | 140-170   | 8                     | 100[1-(CRTxCROxCRF)]    | 49,20%                   |
| Andreotti, 2007            | <i>R. (B.) microplus</i>                                                    | 8          | 0             | Adjuvante          | Nellore x Simmental     | saponina em água                    | 3                       | IM  | 0,1         | 140-170   | 8                     | 100[1-(CRTxCROxCRF)]    | 18,40%                   |
| Azhahianambi et al., 2009a | <i>H. a. anaticum</i>                                                       | 5 e 3      | Saponina      | PBS                | Cruzado                 | saponin in mineral oil              | 3                       | IM  | 0,125       | 0         | 10 - 12               | 100 [1-(CRTxCRO)]       | 61,60%                   |
| Azhahianambi et al., 2009b | <i>H. a. anaticum</i>                                                       | 5          | 0             | Adjuvante          | Cruzado                 | 10% Montanide 888 in mineral oil    | 3                       | IM  | 0,4 e 0,1   | 0         | 7                     | 100 [1-(CRTxCRO)]       | 72%                      |
| Canales et al., 1997       | <i>R. (B.) microplus</i>                                                    | NC         | NC            | NC                 | Holandês e Cruzado      | Montanide 888 in mineral oil        | 3                       | 0   | 0,1         | 0         | 0                     | 100 [1-(CRT×CROxCRF)]   | 91%                      |
| Canales et al., 2009       | <i>R. (B.) microplus</i> e <i>R. (B.) annulatus</i>                         | 5          | Gavac™        | Adjuvante + salina | Cruzado                 | Montanide ISA 50 V                  | 3                       | IM  | 0,1         | 0         | 0                     | 100 [1-(CRT×CROxCRF)]   | 99,60%                   |
| Cunha et al.,2012          | <i>R. (B.) microplus</i>                                                    | 6          | 0             | Adjuvante + salina | Cruzado                 | Montanide ISA 61 VG                 | 3                       | IM  | 0,1         | 0         | 12                    | 101 [1-(CRT×CROxCRF)]   | 31%                      |
| De La Fuente et al., 2010  | <i>A. americanum</i>                                                        | 3          | 0             | Adjuvante + salina | Cruzado                 | Montanide ISA 50 V                  | 3                       | SC  | 0,1         | 0         | 0                     | 100[1-(CRT×CRO×CRF)]    | 66%                      |
| Fragoso et al., 1998       | <i>R. (B.) annulatus</i>                                                    | NC         | 0             | Não vacinados      | Aberdin Angus e Cruzado | Gavac                               | 3                       | IM  | 0,1         | 1         | 0                     | 100[1-(CRT×CRO×CRF)]    | 99,99%                   |
| Galai et al., 2012         | <i>H. scupense</i> e <i>H. excavatum</i>                                    | 5          | Bm86          | Adjuvante          | Holandês                | Montanide 887                       | 3 + 1                   | IM  | 0,1         | 0         | 3 - 4                 | 100 [1 - (CRTxCRO)]     | 67,40%                   |
| Garcia-Garcia et al., 2000 | <i>R. (B.) microplus</i>                                                    | 3          | Gavac™        | Adjuvante          | Holandês                | Montanide 888                       | 3                       | IM  | 0,1         | 0         | 12                    | 100[1-(CRT×CRO×CRF)]    | 89%                      |
| Hajdusek et al., 2010      | <i>R. (B.) microplus</i> , <i>R. (B.) annulatus</i> e <i>Ixodes ricinus</i> | 4          | Bm86          | Adjuvante + salina | Cruzado                 | Montanide ISA 50 V                  | 3                       | IM  | 0,1         | 0         | 0                     | 100[1-(CRT×CRO×CRF)]    | 100%                     |
| Jeyabal et al., 2010       | <i>H. a. anaticum</i>                                                       | 5          | 0             | Adjuvante          | 0                       | Montanide 888 in mineral oil        | 3                       | SC  | 0,4         | 0         | 7                     | 100 [1 - (CRTxCRO)]     | 82,30%                   |
| Kumar et al., 2009         | <i>R. (B.) microplus</i>                                                    | 6          | 0             | Não vacinados      | Cruzado                 | Algel                               | 4                       | SC  | 0,2         | 0         | 6                     | 100[1-(CRT×CRO×CRF)]    | 81,27%                   |
| Kumar et al., 2012a        | <i>R. (B.) microplus</i> e <i>H. a. anaticum</i>                            | 5          | Gavac™        | PBS                | Europeu cruzado         | 10% Montanide 888 in mineral oil    | 3                       | IM  | 0,1         | 0         | 10 - 12               | 101 [1 - (CRTxCRO)]     | 45,80%                   |
| Kumar et al., 2012b        | <i>R. (B.)microplus</i> e <i>H. a. anaticum</i>                             | 2 de 5     | 0             | PBS                | Cruzado                 | Gavac                               | 3                       | IM  | 0,1         | 0         | 6 - 8                 | 102 [1 - (CRTxCRO)]     | 44,50%                   |
| Merino et al., 2011        | <i>R. (B.)microplus</i>                                                     | 6          | 0             | Adjuvante + salina | Europeu Cruzado         | Montanide ISA 50 V                  | 3                       | IM  | 0,1         | 0         | 7                     | 100 [1-(CRT×CRO)]       | 75%                      |
| Miller et al., 2012        | <i>R. (B.) annulatus</i>                                                    | 5          | 0             | Adjuvante          | Angus                   | Gavac                               | 4                       | IM  | 0,1         | 136-227   | 0                     | 100[1-(CRT×CRO×CRF)]    | 99,90%                   |
| Parizi et al., 2011        | <i>R. (B.) microplus</i>                                                    | 4 e 3      | 0             | PBS + Adjuvante    | Hereford                | Montanide 888, Marcol 52 e Saponina | 6                       | IM  | 0,2 e 0,4   | 0         | 0                     | 100 [1-(CRT×CROxCRF)]   | 57%                      |
| Patarroyo et al., 2002     | <i>R. (B.) microplus</i>                                                    | 4          | 0             | Adjuvante ou água  | Cruzado                 | saponina em água                    | 3                       | SC  | 2           | 0         | 8 - 10                | 100 [1-(CRT×CROxCRF)]   | 81,05%                   |
| Sugumar et al., 2011       | <i>R. haemaphysaloides</i>                                                  | 3          | 0             | PBS                | Cruzado                 | aluminium hydroxide gel             | 2                       | SC  | 0,2         | 0         | 6                     | 100 [1-(CRT×CROxCRF)]   | 78,90%                   |
| Wong e Opdebeeck, 1989     | <i>R. (B.) microplus</i>                                                    | 4          | 0             | Adjuvante          | Hereford                | Saponina Quil A                     | 2                       | IM  | 0,016 - 0,5 | 0         | 9 - 12                | 100 [1-(CRO)]           | 96%                      |



## ARTIGO 4

[Proposta de artigo a ser apresentado à revista Vaccine]

### IMUNÓGENOS RECOMBINANTES DE *R. (B.) microplus* EXPRESSOS ASSOCIADOS A UM EPÍTOPO ESTIMULADOR DE CÉLULAS T AUXILIARES

Rodrigo Casquero Cunha<sup>1</sup>, Renato Andreotti<sup>2</sup>, Manoel Rodríguez-Valle<sup>3</sup>, Ala E. Lew-Tabor<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, MS, Brasil

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Corte, Departamento de Sanidade Animal, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>3</sup>Queensland Alliance for Agriculture, Food & Innovation, The University of Queensland, Department of Employment, Economic Development & Innovation, P.O. Box 6097, St. Lucia, 4067 QLD, Australia

#### Resumo

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um dos parasitas que causam maior prejuízo econômico nas regiões tropicais e subtropicais. Seu controle químico é limitado devido, principalmente, ao desenvolvimento de resistência aos principais acaricidas comerciais. Uma alternativa ao controle químico seria o desenvolvimento de uma vacina que pudesse, pelo menos, ser utilizada em associação com o uso de acaricidas, diminuindo a frequência das suas aplicações e reduzindo custos e a contaminação ambiental. A Bm86-CG e a RmLTI são dois antígenos recombinantes que mostraram ser eficientes no controle do carrapato bovino. Com o objetivo de desenvolver uma vacina recombinante associando estes dois antígenos e melhorando sua capacidade imunogênica, sequências parciais antigênicas destes foram expressas associadas a um peptídeo presente no primeiro domínio do fragmento C da toxina tetânica, o qual é um epítipo estimulador de linfócitos T auxiliares. Os antígenos foram expressos em *P. pastoris* GS115. Os sobrenadantes dos cultivos foram analisados por *Western blotting* contra soros de bovinos anti-rBm86 e anti-RmLTI e as proteínas foram detectadas no sobrenadante, confirmando sua expressão e antigenicidade.

**Palavras-chave:** *R. (B.) microplus*, bovinos, vacinação, inibidor de tripsina, Bm86, TT-Th.

## 1. Introdução

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ou “carrapato do boi”, é um ectoparasita de bovinos. Está presente nas áreas tropicais e subtropicais, sendo responsável por grandes perdas econômicas. Seu principal método de controle, o químico, vem apresentando limitações devido a má utilização dos princípios ativos, levando ao desenvolvimento da resistência. Neste contexto, as vacinas surgem como uma alternativa para o controle da infestação do carrapato, propondo um uso associado aos carrapaticidas, reduzindo a aplicação dos mesmos e diminuindo o custo de produção, a contaminação ambiental e os resíduos nos produtos de origem animal [1].

Um dos principais antígenos vacinais utilizados em vacinas contra *R. (B.) microplus* é a proteína Bm86, uma glicoproteína localizada predominantemente na membrana de células do intestino do carrapato[2–5]. Quando utilizada como antígeno vacinal, anticorpos contra esta proteína se ligam à superfície das células epiteliais do intestino do carrapato provocando lise celular pela fixação do complemento e diminuindo a eficiência reprodutiva das teleóginas, uma vez que estas células estão envolvidas no mecanismo de endocitose [2].

Vários inibidores de tripsina de *R. (B.) microplus* (BmTIs) com atividade inibitória contra Calicreína Plasmática Humana (HuPK), Elastase de Neutrófilo Humano (HNE) e Plasmina presente em ovos e larvas já foram descritos [6]. A RmLTI é um inibidor de serina protease da família de inibidores de tripsina pancreática bovina tipo Kunitz (ITPB-Kunitz) presente nas larvas e na saliva de *R. (B.) microplus* [6-7]. BmTIs já foram utilizadas como antígenos vacinais nas suas formas nativa, sintética e recombinante, mostrando eficácias de 72,8%, 18,4% e 32%, respectivamente [9-11].

Vacinas compostas com antígenos geneticamente ligados ao fragmento C (FrC) da toxina tetânica (TT), têm mostrado induzir uma imunoproteção muito forte [12-13]. Kumar et al. (1992), tentando aumentar a resposta imune contra seu antígeno vacinal, relataram que o FrC poderia ser substituído por um peptídeo de 15 aminoácidos, então chamado de *universal T-helper cell epitope* (TT-Th), localizado no primeiro domínio do FrC (aa 829-844). Este fragmento aumenta a resposta imune contra antígenos recombinantes a ele associados e elimina o problema de uma possível inibição da resposta ao antígeno vacinal associado ao FrC devido a preexistência de uma resposta contra a TT [13].

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um antígeno vacinal contra *R. (B.) microplus* a partir de duas proteínas imunogênicas, a Bm86-CG e a RmLTI [10,14], em associação com TT-Th [13]. Esta associação promoveria uma modulação da resposta imune contra estes antígenos, por meio da ativação de células T auxiliares, promovendo a formulação de uma vacina anti-carrapato poliantigênica mais efetiva.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Análise das sequências

As sequências foram analisadas utilizando-se ferramentas do programa Geneious Pro 4.8.5. A sequência de aminoácidos da Bm86-CG (numero de acesso: ACA57829.1) foi alinhada com sequências de genes homólogos a Bm86 de diferentes espécies, entre elas, *R. (B.) annulatus*, *R. appendiculatus*, *R. (B.) decoloratus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *H. a. excavatum*, *H. detritum*, *H. dromedarii* e *H. marginatum marginatum*, disponíveis no GenBank. A sequência aminoacídica parcial da RmLTI foi comparada com as sequências de aminoácidos preditas para diferentes *expressed sequence tag* (EST) disponíveis no GenBank, todas de possíveis inibidores de serina proteinases, isolados de diferentes espécies, entre elas, *R. (B.) microplus*, *Ixodes escapularis* e *Amblyomma maculatum*. Estas análises foram realizadas para se estabelecer os sítios ativos mais conservados destas proteínas, que seriam então os alvos para clonagem.

### 2.2. Carrapatos e cDNA

Foram utilizados carrapatos *R. (B.) microplus* oriundos de uma colônia isolada e mantida na Embrapa Gado de Corte, que tem sua sede em Campo Grande, no estado de Mato Grosso do Sul, na região Centro-Oeste do Brasil. Esta colônia é mantida livre de patógenos, como *Anaplasma* e *Babesia*, e não é resistente aos acaricidas organofosforados e piretróides. Ainda no laboratório da Embrapa Gado de Corte, 30 fêmeas adultas semi-ingurgitadas foram dissecadas e seus órgãos foram separados em microtubos de 1,5 mL contendo 50 µL de solução salina (PBS, pH7,4). Cada *pool* de órgãos, sendo intestinos, glândulas salivares e ovários, foi submetido à extração de RNA total com o reagente *Trizol*® (Invitrogen), seguindo instruções do manual do fabricante. O RNA total de cada órgão foi quantificado e utilizado para a síntese de cDNA pela reação de transcrição reversa com o kit *ThermoScript*™ RT-PCR System (Invitrogen), segundo especificações do seu manual. O cDNA foi liofilizado

e enviado para a Universidade de Queensland, em Brisbane - QLD, Austrália. Chegando lá, o cDNA foi eluído em água ultra pura ao volume inicial e estocado a -20 °C.

### 2.3. Síntese do TT-Th e construção do pPIC $\alpha$ -Th

Dois oligonucleotídeos complementares foram sintetizados (senso 5'CCAGTACATCAAGGCTAACTCCAAATTCATCGGTATCACCGAACT3'; antisenso 5'CTAGAGTTCGGTGATACCGATGAATTTGGAGTTAGCCTTGATGTACTGGGTAC3' ) de maneira que, quando hibridizados formando uma dupla fita, deixassem livre suas extremidades 5' e 3' (sublinhadas), complementares aos sítios de restrição das enzimas *KpnI* e *XbaI*, respectivamente. A hibridização ocorreu com 2,5 nmol de cada oligonucleotídeo em tampão de hibridização (NaCl 10 mM, EDTA 1mM, Tris 10mM, pH7,4), em um volume final de 1mL. A solução foi incubada em banho-maria a 95° C, 1 min. A fonte de energia foi desligada e o banho deixado chegar à temperatura ambiente. Esta estratégia possibilitou a ligação do oligonucleotídeo hibridizado (correspondente a sequência de aminoácidos 829-844 do fragmento C (FrC) da toxina tetânica) ao plasmídeo pPICZalphaA restrito com as enzimas *KpnI* e *XbaI*. Dessa maneira, obteve-se o pPIC $\alpha$ -Th, que ainda continha os locais de restrição *XhoI*, *EcoRI* e *KpnI*, os quais foram utilizados para as clonagens subsequentes.

### 2.4. Clonagem do gene parcial da RmLTI

Três *primers* foram desenhados, o primer senso XhoKexRmLTI (5'actCTCGAGAAAAGATTCGAGACTTACTGCAAG3'), que adiciona um local de restrição *XhoI* na extremidade 5' do amplificado, um antisenso KpnRmLTI (5'cgcgGGTACCAGTGAGGAAGTTGTTGCCG3'), que adiciona um local de restrição *KpnI* na extremidade 5' do amplificado, e um outro antisenso EcoRmLTI (5'cgGAATTCAGTGAGGAAGTTGTTGCCGTT3'), que adiciona um local de restrição *EcoRI* na extremidade 5' do amplificado. Esses *primers* foram utilizados para amplificar, por PCR, parte do gene da RmLTI a partir do cDNA de *R. (B.) microplus* isolado de Campo Grande.

Dois plasmídeos foram então construídos nesta etapa, um denominado pPIC $\alpha$ TI-Th com o gene parcial da RmLTI clonado entre as enzimas *XhoI* e *KpnI*, subjacente ao fragmento correspondente ao TT-Th, e o outro denominado pPIC $\alpha$ TI-Eco-Th com a mesma sequência clonada entre as enzimas *XhoI* e *EcoRI*, para posterior clonagem de parte do gene da Bm86-CG.

## 2.5. Clonagem do gene parcial da Bm86-CG

Três *primers* foram desenhados, um primer senso EcoBmCG (5'cgGAATTCCGAGGTCGCCTACGCCGCT3'), que adiciona um local de restrição *EcoRI* na extremidade 5' do amplificado, um outro senso XhoKexBmCG (5'actCTCGAGAAAAGACGAGGTCGCCTACGCC3'), que adiciona um local de restrição *XhoI* na extremidade 5' do amplificado, e um antisenso KpnBm86 (5'cgcgGGTACCGTAACACTCGTGATCATCAGGACA3'), que adiciona um local de restrição *KpnI* na extremidade 5' do amplificado. Esses primers foram utilizados para amplificar, por PCR, parte do gene da Bm86-CG a partir do cDNA de *R. (B.) microplus* isolado de Campo Grande.

Outros dois plasmídeos foram construídos nesta etapa. O primeiro, pPIC $\alpha$ TI-CG-Th, com o gene parcial da Bm86-CG clonado no plasmídeo pPIC $\alpha$ TI-Eco-Th, entre os sítios de restrição *EcoRI* e *KpnI*, e entre os fragmentos correspondentes aos genes da RmLTI, na extremidade 5', e do TT-Th, na extremidade 3'. O segundo, pPIC $\alpha$ CG-Th, com a mesma sequência parcial do gene da Bm86-CG clonada no plasmídeo pPIC $\alpha$ Th entre os locais de restrição *XhoI* e *KpnI*.

Todas as reações de restrição e ligação foram realizadas com enzimas da New England Biolabs, seguindo seus respectivos manuais e protocolos. Os PCRs foram purificados do gel de agarose 1% utilizando-se QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) e clonados em plasmídeo TOPO. A cada clonagem, os plasmídeos foram submetidos à reação de sequenciamento. Após a confirmação das sequências, os insertos, assim como os plasmídeos derivados do pPICZalphaA, foram restritos com as respectivas enzimas e purificados a partir do gel de agarose. As transformações das ligações e as propagações de plasmídeos foram realizadas em *E. coli* TOP10F quimiocompetente (Invitrogen). Uma busca por colônias transformantes foi realizada pela PCR com *primers* dos vetores e dos insertos. As purificações de plasmídeos em pequena e larga escalas foram realizadas com os Quiagen Plasmid Mini KiT (Quiagen) e Quiagen Plasmid Max KiT (Quiagen), respectivamente.

## 2.6. Transformação em *Pichia pastoris*

As transformações foram realizadas seguindo as recomendações do manual EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen). Brevemente, os plasmídeos pPIC $\alpha$ TI-Th, pPIC $\alpha$ CG-Th, pPIC $\alpha$ TI-CG-Th e pPICZalphaA foram extraídos em larga escala com

"Quiagen Plasmid Max KiT" (Quiagen). Aproximadamente 100 µg de cada plasmídeo foram linearizados com *SacI*, purificados com fenol-clorofórmio e ressuspensos a 1 µg µL<sup>-1</sup>. Aliquotas de 10 µg de cada plasmídeo linearizado foram transformadas por eletroporação em *P. pastoris* estirpe GS115. As colônias de *P. pastoris* recombinantes foram selecionadas para resistência à Zeocin<sup>TM</sup> (Invitrogen) em placas com meio YPD enriquecido com este antibiótico (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose, 1 M de sorbitol, 2% de agar, 100 µg / mL de zeocina). As colônias que cresceram foram submetidas a PCR com os primer AOX1 5' e AOX1 3', para a confirmação da recombinação e, também, traçar seu genótipo como *Mut<sup>S</sup>* ou *Mut<sup>+</sup>*. Placas de meio mínimo com dextrose e histidina (MDH; 1,34% de YNB, 2% de dextrose, 4.10<sup>-5</sup>% de biotina, 0,004% de histidina) e meio mínimo com metanol e histidina (MMH; 1,34% de YNB, 0,5% de metanol, 4.10<sup>-5</sup>% de biotina, 0,004% de histidina) foram utilizadas para a determinação do fenótipo *Mut<sup>S</sup>* ou *Mut<sup>+</sup>*.

Os clones de GS115 com cada plasmídeo foram pré-inoculados em frascos *erlenmeyers* de 1L com 200 mL de meio YPD líquido com zeocina. Os cultivos foram incubados a 30 °C, 240 rpm, durante a noite. As células foram separadas por centrifugação a 4.000 x g, por 5 min., os sobrenadantes foram descartados e as células sedimentadas foram ressuspensas em YPD com 15% de glicerol a uma DO<sub>600nm</sub> de 100. As células foram congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente estocadas a -80° C.

## 2.7. Expressão das proteínas recombinantes

Cinco clones de cada plasmídeo foram escolhidos para serem induzidos, assim como, um clone com o plasmídeo pPICZalphaA como controle. Uma colônia isolada de cada clone foi inoculada em 25 mL de meio BMGY (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, fosfato de potássio 100 mM, 1,34% de YNB, 4 x 10<sup>-5</sup>% de biotina, 1% de glicerol, pH 6,0) e incubada durante a noite a 30 °C, 250 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 1.500 x g por 5 min. e ressuspensas em meio BMMY (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, fosfato de potássio 100 mM, 1,34% de YNB, 4 x 10<sup>-5</sup>% de biotina, 0,5% de metanol, pH 6,0) para a indução a uma DO<sub>600nm</sub> final de 1,0, em frascos *erlenmeyers* de 1L. As culturas foram então incubadas por mais 4 dias a 30 °C, 250rpm. A cada 24h, uma alíquota de 1 mL de cada cultivo foi coletada e a DO<sub>600nm</sub> foi aferida. A indução foi mantida com a adição de 0,5% de metanol (v/v) a cada 24h. Ao final de 96 h de indução, as culturas foram centrifugadas e os sobrenadantes foram tratados com 1mM de PMSF. A proteína total de cada sobrenadante foi precipitada com 60% de sulfato de amônia e centrifugação a 20.000 x g por 45 min., a 4°C.

As proteínas foram ressuspensas, dialisadas contra PBS, pH 7,4, congeladas a -80 °C, liofilizadas e enviadas à Embrapa Gado de Corte para posterior utilização em um ensaio de vacinação de bovinos e infestação com carrapatos.

### 2.8. SDS-PAGE e *Western blotting*

Foram misturados 20 µL de cada sobrenadante com 5 µL de tampão de amostra NuPAGE® (Invitrogen). A solução foi aquecida a 70 °C por 10 min. e utilizada para SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes. As amostras foram aplicadas em dois géis. Um foi corado com solução de nitrato de prata e outro foi submetido à transferência para uma membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com leite em pó desnatado a 2% em PBS, pH 7,4, sob agitação a temperatura ambiente por 30 min. A membrana foi lavada três vezes com PBS-T (PBS, 0,1% de Tween 80, pH 7,4) e incubada com soro de bovinos vacinados com rBm86-CG e rRmLTI, diluídos 1:300, previamente adsorvidos com o sobrenadante da expressão de GS115 transformada com o plasmídeo pPICZalphaA. A membrana foi novamente lavada com PBS-T e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de bovino conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:5.000 em PBS. A membrana foi novamente lavada e incubada em 5 mL de solução de revelação (0,5% de diaminobenzidina, 0,075% de ureia) até se observar a coloração.

## 3. Resultados e discussão

O alinhamento da sequência de aminoácidos da Bm86-CG mostrou a presença de uma região na porção C-terminal, altamente conservada entre as espécies da família Ixodidae, variando de 42% a 100% de identidade. Dentro da subfamília Rhipicephalinae, a identidade foi de 100% entre a maioria dos *R. (B.) microplus*, no mínimo 96,7% comparando-se com *R. (B.) annulatus*, 95,5% quando comparada com *R. (B.) decoloratus* e no mínimo 69,7% quando comparada com *R. appendiculatus* (figura 1). Essa região (a.a. 458-548) corresponde aos dois últimos sítios ativos EGF presentes na extremidade C-terminal dessa proteína.

A sequência parcial de aminoácidos da RmLTI mostrou ter três sítios ativos pertencentes a superfamília de ITPB-Kunits. Estes sítios ativos têm grande identidade a outras sequências de proteínas da mesma família presentes no GenBank (dados não mostrados). Os três sítios ativos foram separados e denominados domínio a (Da), domínio b (Db) e domínio c (Dc), da extremidade N-terminal à C-terminal. Quando as sequências de aminoácidos de cada domínio foram comparadas entre si, os domínios Da e Db mostraram ter identidade de 80%.

Como o domínio Da mostrou-se com baixa antigenicidade na análise de predição de regiões antigênicas, em relação aos outros dois domínios, decidiu-se clonar apenas a sequência de nucleotídeos que codifica os domínios Db e Dc (figura 2).

Com escolha de regiões mais conservadas das sequências de aminoácidos das Bm86-CG e RmLTI, o objetivo foi expressar uma proteína quimérica que pudesse ser utilizada não somente para o controle do *R. (B.) microplus* isolado de Campo Grande, mas sim, para o controle de toda a população de carrapatos desta espécie a nível nacional e, porque não, a nível mundial. Bem como, ser utilizada como antígeno vacinal para o controle de outras espécies, como por exemplo *R. (B.) annulatus*, que até o século XIX era o carrapato mais importante economicamente para a pecuária bovina dos Estados Unidos [15], e *R. (B.) decoloratus*, principal espécie de carrapatos presente na África [16].

Após a reação de hibridização dos oligonucleotídeos, a dupla fita produto desta hibridização foi clonada em pPICZalphaA, originando o plasmídeo pPIC $\alpha$ -Th, que mantém o local de múltipla clonagem (MCS) do plasmídeo original, contendo os locais de restrição *Xho*I, *Eco*RI e *Kpn*I, entre outros.

Os produtos de PCRs das sequências parciais dos genes das proteínas Bm86-CG e RmLTI foram amplificados a partir do cDNA de *R. (B.) microplus*, isolado de Campo Grande (figuras 3 e 4). Os mesmos foram clonados em plasmídeos pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> e sequenciados, sendo que as sequências estavam 100% correspondentes às sequências publicadas no GenBank sob os números de acesso: EU352677.1 e CK186726.1, respectivamente.

Os insertos foram liberados dos plasmídeos TOPO e subclonados em seus respectivos locais, nos plasmídeos derivados do pPICZalphaA. Deu-se então origem a três plasmídeos principais: pPIC $\alpha$ TI-Th, pPIC $\alpha$ CG-Th e pPIC $\alpha$ TI-CG-Th, como esquematizado na figura 5. Estes plasmídeos também foram sequenciados e suas sequências foram 100% idênticas às sequências esperadas.

Os plasmídeos linearizados foram transformados em *P. pastoris* GS115 e todas as colônias recombinantes obtidas de cada plasmídeo foram do genótipo *Mut*<sup>+</sup>, segundo a PCR com os primers AOX1 5' e AOX1 3'. O fenótipo foi confirmado pela observação do crescimento dos clones em placas de MDH e MMH (figura 6).

O crescimento de cada um dos cinco clones selecionados foi acompanhado. As absorvâncias das culturas foram medidas e o crescimento das células não variou conforme o



clone e o plasmídeo. A única diferença foi que as recombinantes transformadas com o plasmídeo pPICZalphaA cresceram mais rápido e alcançaram uma absorvância maior ao final dos 4 dias (figura 7).

Os sobrenadantes dos clones transformados com os plasmídeos pPIC $\alpha$ TI-Th, pPIC $\alpha$ CG-Th e pPIC $\alpha$ TI-CG-Th expressaram as proteínas quiméricas rRmLTI-Th, rBmCG-Th e rRmLTI-CG-Th, respectivamente. Os pesos moleculares aproximados esperados para as proteínas recombinantes rBmCG-Th, rRmLTI-Th e rRmLTI-CG-Th expressas eram de 12 kDa, 19 kDa e 29 kDa, respectivamente. O sobrenadante do clone transformado com o pPICZalphaA A foi tratado da mesma forma que os anteriores e utilizado como controle negativo de expressão. Os SDS-PAGE dos sobrenadantes não mostraram bandas bem definidas para a expressão das proteínas quiméricas (figura 8). Talvez devido a presença de sítios de glicosilação, tanto na Bm86-CG quanto na RmLTI [10,15], e a grande quantidade de cisteínas nas sequências de aminoácidos das proteínas quiméricas. A rRmLTI-Th contém 10 resíduos de cisteínas (6,1% do total de aminoácidos), a rBmCG-Th contém 12 resíduos de cisteínas (13,2% do total de aminoácidos) e a rRmLTI-CG-Th contém 22 resíduos de cisteínas (8,3% do total de aminoácidos) potenciais para formarem pontes dissulfeto. A adição de açúcares na modificação pós-traducional através de glicosilação, potencialmente adicionando 8-9 manoses e duas moléculas de N-acetil-glucosamina, e a ocorrência de um grande número de pontes dissulfetos podem ter contribuído para que estas proteínas quiméricas apresentassem diferentes isoformas e pesos moleculares.

O *Western blotting* mostra o reconhecimento de proteínas presentes no sobrenadante pelos soros anti-rBm86-CG e anti-rRmLTI de bovinos. Como era de se esperar, as proteínas rRmLTI-Th e rBmCG-Th não mostraram reatividade cruzada com os soros anti-rBm86-CG e anti-rRmLTI, respectivamente. O reconhecimento das proteínas recombinantes rRmLTI-Th e rRmLTI-CG-Th deve ser pela presença de determinantes antigênicos (DA) na sequência parcial clonada da RmLTI idênticos aos que induziram resposta imune humoral no ensaio de vacinação de bovinos, realizado previamente [10]. Este dado revela que há uma certa semelhança entre estas proteínas recombinantes, sugerindo que a proteína aqui expressa apresenta um potencial antigênico e provavelmente imunogênico, sendo que há o compartilhamento de DA capazes de serem apresentados em MHC II de bovinos de ambas rRmLTI-Th e rRmLTI-CG-Th com rRmLTI. Do mesmo modo, o reconhecimento das proteínas quiméricas rRmLTI-CG-Th e rBmCG-Th pelo soro de bovinos previamente

vacinados com rBm86-CG [14] mostra que a sequência parcial de aminoácidos da Bm86-CG expressa neste sistema também compartilha DA capazes de serem apresentados por MHC II de bovinos com a rBm86-CG.

Os clones de GS115 foram aptos a expressarem as proteínas recombinantes com as sequências parciais das Bm86-CG e RmLTI, confirmados pelo *Western blotting*, que revelou em seus supernadantes, proteínas com identidade as rBm86-CG e rRmLTI. O sobrenadante da expressão da GS115 transformada com o plasmídeo pPICZalphaA não reagiu com os soros anti-rRmLTI e anti-rBm86-CG na reação de *Western blotting*. Isso significa que estes soros foram suficientemente adsorvidos e não continham anticorpos anti-*P. pastoris*, assim com, as reações contra as proteínas com as sequências parciais das RmLTI e Bm86-CG foram específicas e que a porção clonada destas proteínas são antigênicas.

Mais ensaios serão feitos para a caracterização das proteínas recombinantes, como por exemplo, *imunoblotting* com soro antitetânico para a detecção do TT-Th nas proteínas quiméricas. Também serão realizados ensaios de purificação em colunas de gel filtração e troca iônica para, somente depois de se ter as proteínas expressas purificadas, a realização de *stall test* com bovinos e o cálculo de eficácia vacinal contra *R. (B.) microplus*.

### **Agradecimentos**

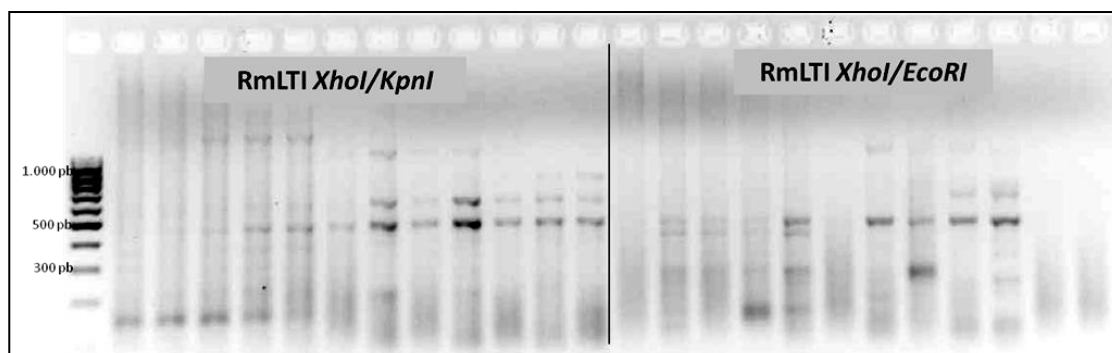
À CAPES/REUNI, pelo financiamento da bolsa sanduíche do Aluno de doutorado RCC. Ao *Department of Employment, Economic Development and Innovation (DEEDI)*, que é um departamento da *Applied Biotechnology Livestock da Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation (QAAFI)*, situado na *The University of Queensland*, cidade de Brisbane, Queensland, Austrália, em conjunto com qual o projeto de pesquisa foi desenvolvido. O DEEDI foi o financiador do projeto.

## Referências

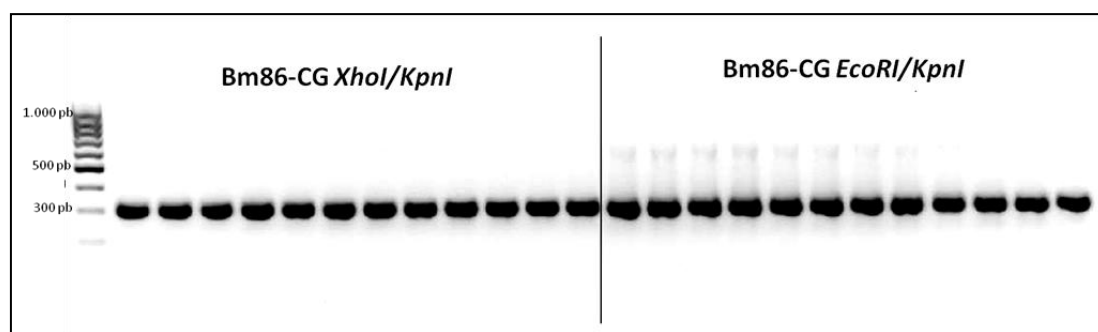
- [1] García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 2000;18:2275–87.
- [2] Willadsen P, McKenna R V. Vaccination with “concealed” antigens: myth or reality? *Parasite Immunol* 1991;13:605–16.
- [3] Willadsen P, Kemp DH. Vaccination with “concealed” antigens for tick control. *Parasitol Today* 1988;4:196–8.
- [4] Rand KN, Moore T, Sriskantha a, Spring K, Tellam R, Willadsen P, et al. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:9657–61.
- [5] Willadsen P, Riding G a, McKenna R V, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, et al. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J Immunol* 1989;143:1346–51.
- [6] Sasaki SD, Azzolini SS, Hirata IY, Andreotti R, Tanaka AS. *Boophilus microplus* tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors. *Biochimie* 2004;86:643–9.
- [7] Tanaka a S, Andreotti R, Gomes a, Torquato RJ, Sampaio MU, Sampaio C a. A double headed serine proteinase inhibitor--human plasma kallikrein and elastase inhibitor--from *Boophilus microplus* larvae. *Immunopharmacology* 1999;45:171–7.
- [8] Sasaki SD, Tanaka AS. rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick *Boophilus microplus*, its cloning, expression and biochemical characterization. *Vet Parasitol* 2008;155:133–41.
- [9] Andreotti R. A synthetic bmti n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. *Exp Parasitol* 2007;116:66–70.
- [10] Andreotti R, Cunha RC, Soares MA, Guerrero FD, Leite FPL, de León A a P. Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine* 2012;30:6678–85.
- [11] Andreotti R, Gomes A, Malavazi-Piza KC, Sasaki SD, Sampaio C a M, Tanaka AS. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *Int Immunopharmacol* 2002;2:557–63.

- [12] Kumar A, Arora R, Kaur P, Chauhan VS, Sharma P. “Universal” T helper cell determinants enhance immunogenicity of a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen peptide. *J Immunol* 1992;148:1499–505.
- [13] Tymciu S, Durieux-Alexandrenne C, Wijkhuisen A, Créminon C, Frobert Y, Grassi J, et al. Enhancement of antibody responses in DNA vaccination using a vector encoding a universal T-helper cell epitope. *DNA Cell Biol* 2004;23:395–402.
- [14] Cunha R, León AP de, Leite F, Pinto LDS, Santos Júnior A, Andreotti R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Rev Bras ...* 2012;2961:254–62.
- [15] Cunha RC, Andreotti R, Leite FPL. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: expression and characterization of Bm86-CG in *Pichia pastoris*. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011;20:103–10.
- [16] Graham OH, Hourrigan JL. Eradication programs for the arthropod parasites of livestock. *J Med Entomol* 1977;13:629–58.
- [17] Bock R, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W. Babesiosis of cattle. *Parasitology* 2004;129 Suppl:S247–69.

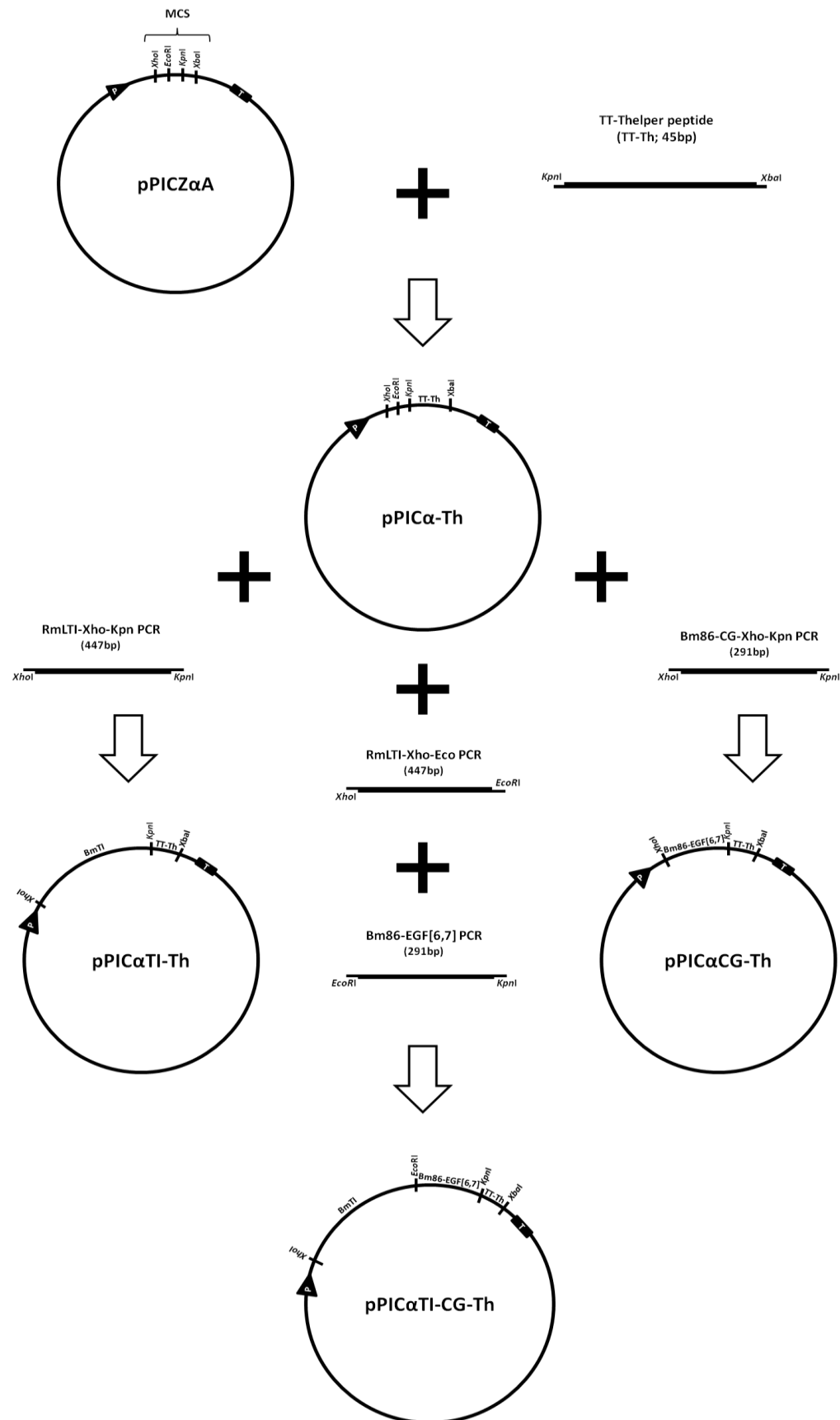




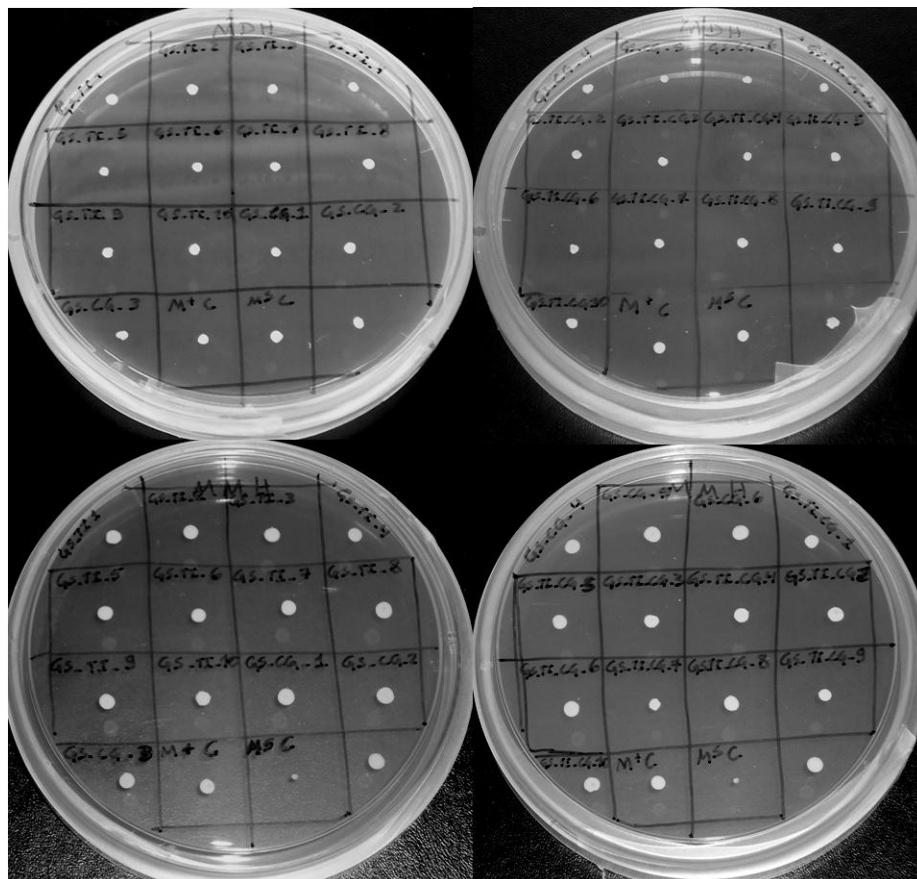
**Figura 3.** PCR com gradiente de temperatura para amplificar o gene parcial da RmLTI. A Temperatura variou de 50° C a 65° C da esquerda para a direita. As bandas clonadas foram as de 475 pb.



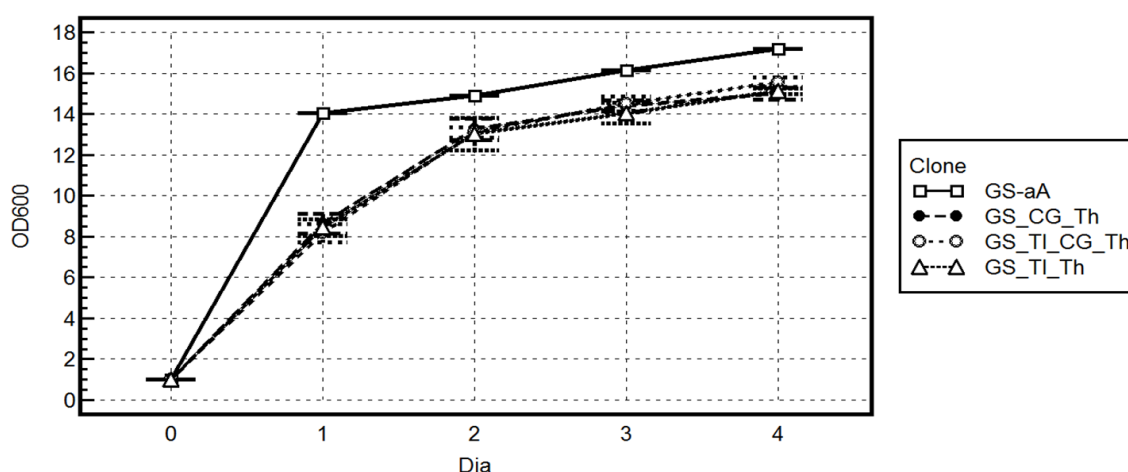
**Figura 4.** PCR com gradiente de temperatura para amplificar a sequência parcial da Bm86-CG. A temperatura variou de 50° C a 65° C da esquerda para a direita.



**Figura 5.** Esquemática da construção dos plasmídeos.

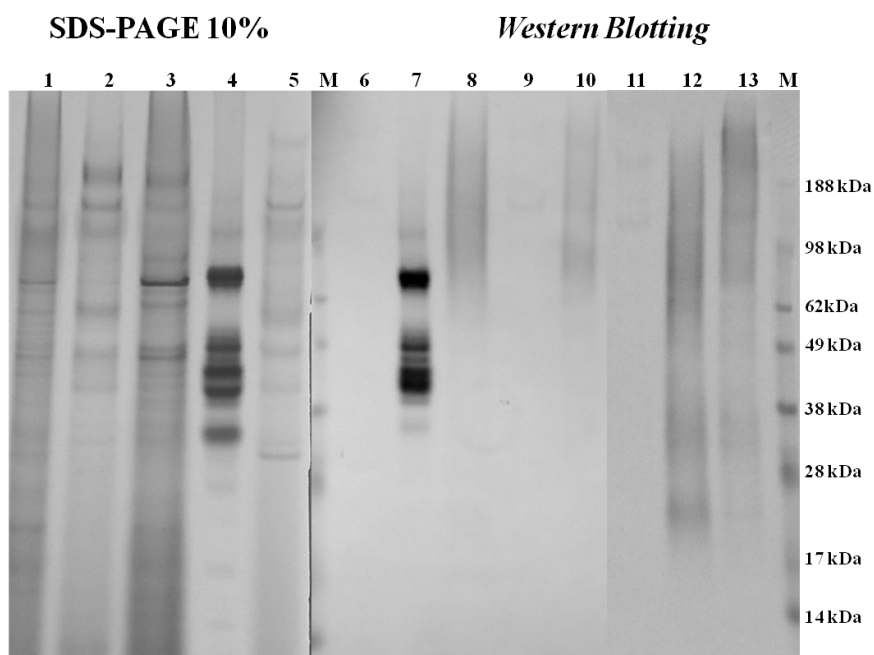


**Figura 6.** Fenotipagem dos clones de GS115 semeados em meio MD e MM. M+C e MSC são as cepas GS115/pPICZ/lacZ (*Mut*<sup>+</sup>) e GS115 Albumin (*Mut*<sup>S</sup>), utilizadas como controle, respectivamente. As duas placas de cima são os clones semeados em MDH e as duas de baixo são os mesmos clones semeados em MMH, evidenciando que todos os clones foram *Mut*<sup>+</sup>.



**Figura 7.** Crescimento médio ( $OD_{600\text{ nm}} \pm$  desvio padrão) das 5 colônias de cada plasmídeo transformado, mostrando um desvio padrão muito baixo, o que significa que não houve diferença entre as recombinantes, a um nível de 99,9% de significância. GS-aA, GS\_CG\_Th, GS\_TI\_CG\_Th e GS\_TI\_Th são os clones transformados com os plasmídeos pPICZalphaA, pPIC $\alpha$ CG-Th, pPIC $\alpha$ TI-CG-Th e pPIC $\alpha$ TI-Th, respectivamente.





**Figura 8.** 1-5) SDS-PAGE 10%; 6-13) *Western Blotting*. M) Marcador de peso molecular (188-14 kDa). 1, 8 e 11) Sobrenadante da expressão da rBmCG-Th; 2, 9 e 12) Sobrenadante da expressão da rRmLTI-Th; 3, 10 e 13) Sobrenadante da expressão da rRmLTI-CG-Th; 4 e 7) 1 µg de rBm86, utilizada como controle positivo. 5-6) Sobrenadante da expressão do clone transformado com o pPICZalphaA. 6-10) Membrana incubada com soro de bovino vacinado com rBmCG. 11-13) Membrana incubada com soro de bovino vacinado com rRmLTI

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No momento da sua liberação comercial em 1994, a vacina contra a *Boophilus microplus* TickGARD foi a primeira, comercialmente disponível, anti-parasita utilizando um antígeno recombinante. Era, portanto, altamente inovador, com um modo de ação único e recomendações de utilização que eram muito diferentes das de acaricidas convencionais.

As duas últimas décadas têm visto uma escalada de problemas com resistência química. Desde o lançamento original da vacina, a resistência tem sido relatada na Austrália e América do Sul a três classes adicionais de acaricidas químicos: lactonas macrocíclicas, fipronil e os reguladores de crescimento de insetos. Há cada vez mais a percepção de que qualquer programa, sustentável e bem-sucedido de controle parasitário, deve ter uma abordagem integrada para sanar o desejo de alternativas "verdes". Todos estes fatores tornam uma vacina anti-carrapato melhorada um produto desejável.

As vacinas desenvolvidas a partir da Bm86 conferem proteção parcial aos bovinos contra futuras infestações de *R. (B.) microplus* diminuindo o número de carrapatos, a produção de ovos e a fertilidade. Estes resultados, no entanto, não asseguram a proteção desejada pela produção bovina, sugerindo a necessidade de mais de um antígeno protetor.

Embora os antígenos ocultos sejam a base das vacinas comerciais e tenham sido estudados em outros ectoparasitas, como *Lucilia cuprina* e *Pediculus humanus*, experimentos com antígenos naturalmente expostos ao sistema imunológico do hospedeiro associados a antígenos ocultos, podem significar uma potencialização da imunoproteção, principalmente se eles atuarem em fases ou órgãos distintos do ectoparasita. Este é o caso da utilização de vacinas formuladas com Bm86-CG, que atua destruindo as células do intestino dos carrapatos adultos, e RmLTI, que é secretada pela larva e também está presente nos ovários.

A avaliação sorológica de animais imunizados com diferentes antígenos para o controle do carrapato mostrou que os níveis de anticorpos tendem a decrescer em alguns meses, reduzindo a proteção. Isto indica a necessidade de um reforço de vacinação com os diferentes antígenos disponíveis. Assim, o uso de adjuvantes adequados é um ponto importante no processo do desenvolvimento da vacina contra o carrapato do bovino.

Em uma vacina a especificidade da resposta imune é dada pelo antígeno, entretanto os adjuvantes são as substâncias que ampliam e modulam a imunogenicidade do antígeno vacinal. Um aspecto que influencia grandemente no desenvolvimento de uma vacina é a

interação que ocorre entre o patógeno e o hospedeiro. Esta interação determina o tipo de resposta imune que a vacina necessita induzir para proteger o bovino de forma eficiente em infestações parasitárias. Entretanto, vacinas contra carrapato apresentam um desafio extra ao compararmos a outros patógenos, pois estes apresentam ciclos de vida com fases distintas no hospedeiro e fora deste. Além disso, a resposta imune, bem como os parasitas, são muito complexos e os aspectos imunológicos da interação hospedeiro-parasita são pouco conhecidos.

Apesar desta complexidade, a otimização da imunologia pode ser nada mais do que a avaliação de uma variedade de formulações de adjuvantes apropriados e disponíveis comercialmente, porém, os critérios utilizados para avaliar estes são críticos.

O desenvolvimento de uma vacina é um processo complexo, de vários estágios. Investimentos em pesquisa e desenvolvimento poderiam acelerar este longo processo de desenvolvimento em uma série de pontos. Atualmente, o maior desafio é a falta de antígenos recombinantes com alta eficácia comprovada contra *R. (B.) microplus*.

Na expectativa de que uma vacina com eficácia superior às vacinas comerciais já disponibilizadas irá requerer mais do que um antígeno, a eficácia das combinações de antígenos atualmente conhecidos deve ser explorada, assim como, a identificação de novos antígenos e combinações destes com moléculas estimuladoras do sistema imune.

Um ponto muito importante, crítico para o desenvolvimento de vacinas contra o carrapato do boi, é tentar reverter a constante perda de experiência nas áreas gerais de biologia do carrapato e desenvolvimento de vacinas, que tem sido considerável, particularmente no profissional da educação, e na disponibilidade de instalações experimentais adequadas, que também decaíram com a falta de investimentos

Uma afirmação muito comum é a que uma avaliação de formulações multi-antigênicas poderia aumentar a eficácia, mas a evidência experimental para isto é extremamente limitada. Outra, é a que vacinas e acaricidas podem ser utilizados em um programa integrado para alcançar o controle melhorado do carrapato, de uma maneira rentável e com uso de produtos químicos minimizado. Porém, a perspectiva para que isso aconteça não é, pelo menos, a curto prazo.

A primeira vacina comercial, TickGARD, foi lançada em 1994 e continha um antígeno recombinante produzida em *E. coli*, em uma formulação de adjuvante padrão. Um ano depois, em 1995, TickGARD<sup>Plus</sup> foi liberada. Nesta última, o antígeno recombinante de *E. coli* foi substituído por um produto de expressão de *P. pastoris* e a formulação adjuvante foi alterada.

Como resultado, a média de títulos de anticorpos em rebanhos vacinados foi de aproximadamente duas vezes mais elevada que a TickGARD. Parte do aumento nos títulos de anticorpos foi devido a redução do número de animais que apresentaram títulos de anticorpos muito baixas, isto é, o fenômeno de não-responder foi em grande parte removido pela mudança de adjuvante. A minimização do fenômeno não-resposta foi muito importante para o desenvolvimento da TickGARD<sup>Plus</sup>. Como em muitas populações de parasitas, a distribuição do número de carrapatos nos hospedeiros é muito variável, assim, uma grande proporção dos carrapatos infestam uma pequena proporção dos animais.

Estes últimos dados são particularmente importante para refletirmos sobre a eficácia alcançada pelos imunógenos rBm86-CG e rRmLTI, uma vez que existe uma forte correlação entre o título de anticorpos específicos e a eficácia da vacina. O quarto artigo aqui proposto teve o objetivo de associar estes imunógenos entre si e com um epítipo estimulador de linfócitos T auxiliares para tentar aumentar a imunogenicidade destes. Este aumento acarreteria maior produção de anticorpos nos bovinos vacinados e consequentemente uma maior proteção contra infestações de carrapatos.

O Brasil possui condições específicas no sistema de produção bovina como a especialização e intensificação dos sistemas de produção de bovinos, um clima predominantemente tropical que influencia diretamente nas gerações de carrapatos, uma tendência de manejo inadequado do carrapato nos bovinos por falta de uma política nacional para o problema, a crescente queixa de ineficiência dos produtos carrapaticidas disponíveis no mercado. Estes fatores reforçam a importância da implementação de medidas de controle integradas.

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o carrapato do boi traria inúmeros benefícios, não só à pecuária bovina, mas também a população em geral, que teria a sua disposição produtos de origem animal ecologicamente corretos, mais “verde”, devido a diminuição da contaminação ambiental. O produtor teria suas despesas com o controle do carrapato reduzidas e isso também teria um impacto no preço final para o consumidor. Um outro aspecto, não desprezível, seria o aumento da qualidade do couro brasileiro. Visto que, apesar da enorme produção, apenas uma porção muito diminuta dos couros produzidos a partir de peles do rebanho nacional pode ser utilizada na fabricação de artefatos de couro de alta qualidade.

Porém, mesmo que se desenvolva uma vacina com todas as características desejadas, a sua contribuição como uma ferramenta no controle integrado do carrapato do boi só será

efetiva quando existir a sua utilização adequada. Para isso, é preciso que haja uma política que estabeleça um programa de controle com recomendações e orientações técnicas adequadas das diferentes ferramentas, com uma logística de distribuição da vacina, vinculado a um programa nacional de manejo e, principalmente, um preço de comercialização adequado ao produtor.