



Protocolos para o desenvolvimento de antígenos para vacinas contra o carrapato-do-boi

*Rodrigo Casquero Cunha
André de Abreu Rangel Aguirre
Fabio Pereira Leivas Leite
Renato Andreotti*



INTRODUÇÃO

O combate ao carrapato-do-boi, *Rhipicephalus microplus*, possui como ferramenta principal o controle com base em produtos químicos. Porém, a eficácia dos acaricidas existentes vem diminuindo gradativamente devido à seleção de populações de carrapatos resistentes às diversas gerações destes produtos. As consequências diretas disso decorrem da utilização mais frequente e do uso de produtos cada vez mais concentrada, agravando a contaminação do ambiente e dos produtos de origem animal; elevando os custos do controle e, conseqüentemente, causando impactos negativos na cadeia produtiva de bovinos.

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

O desenvolvimento de vacinas contra o carrapato vem sendo considerado como uma alternativa aos problemas de resistência a carrapaticidas e à contaminação ambiental. Existem no mercado vacinas de efeito parcial baseadas no antígeno Bm86 denominada GavacTM (HeberBiotec S.A., P.O. Box 6162, Havana, Cuba) (DE LA FUENIE et al., 1998) e TickGard^{PLUS} (IntervetAustraliaPty. Ltda., 91-105 Harpin Street Bendigo, EastVic.) (WILLADSEN, 1997).

Bm86 é uma proteína presente na superfície apical de células do intestino do *R. microplus* (GOUGH; KEMP, 1993) e por estar presente no tubo digestivo do carrapato, não entrando em contato com o sistema imunológico do hospedeiro, é classificada como antígeno “oculto” (WILLADSEN; KEMP, 1988).

Testes realizados na Embrapa Gado de Corte mostraram que estas vacinas apresentaram eficácia de proteção de 49,2% e 46,4% para GavacTM e TickGard^{PLUS}, respectivamente (ANDREOTTI, 2006). Tais resultados levam a crer que as vacinas representam um caminho possível, mas ainda com necessidades de desenvolvimento de um produto mais eficiente.

Um gene homólogo ao Bm86 foi isolado de *R. microplus* isolado em Campo Grande, MS (Bm86-CG), revelando diferenças na sequência aminoacídica predita para esta proteína em comparação com as sequências das proteínas Bm86 e Bm95 (ANDREOTTI et al., 2008).

Na Embrapa Gado de Corte são estudadas as propriedades de proteínas inibidoras de tripsina (Bm11s) provenientes de larvas de *R. microplus* (RmL11). A imunização de bovinos com uma associação de Bm11s nativas, purificadas em coluna de tripsina sefarose, apresentou 72,8% de eficiência na proteção contra o carrapato-do-boi (ANDREOTTI et al., 2002).

Apesar da alta eficiência encontrada, o processo de produção destes antígenos é caro e dispendioso, tornando a comercialização economicamente inviável. Desta maneira,

estudos foram desenvolvidos com peptídeo sintético (ANDREOTTI et al., 2007) e produção de proteína recombinante a partir de sequência de gene sintético e expressão em *Pichia pastoris* (IANAKA et al., 1999; ANDREOTTI et al., 2012).

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*, que é 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).

Dentro da perspectiva de procurar novas estratégias para o controle do carrapato, no Laboratório de Biologia Molecular do Carrapato, da Embrapa Gado de Corte, têm sido avaliados antígenos recombinantes de um isolado regional de *R. microplus*, em busca de uma ferramenta alternativa que possa ser utilizada em associação com o controle químico. Dentro desse contexto pretende-se aqui mostrar os protocolos gerais para o desenvolvimento de proteínas recombinantes para os estudos, como também, os desenhos de peptídeos com ênfase em vacinologia reversa.

PROTOSCOLOS UTILIZADOS PARA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE rBm86-CG

Carrapatos

Para o ensaio com desafio é necessário a manutenção de uma colônia de *R. microplus*. No desenvolvimento do antígeno r-Bm86-CG, estes foram obtidos a partir de uma colônia de laboratório mantida na Embrapa Gado de Corte. Os carrapatos foram coletados, originalmente, de bovinos infestados em Campo Grande, MS, Brasil. Bovinos sensíveis são infestados com larvas deste carrapato e, após o ingurgitamento, teleóginas são colhidas, incubadas em câmaras de umidade, a 28 °C e 95% de umidade relativa, para oviposição e incubação. As larvas são, então, utilizadas para infestação 18 dias após a eclosão.

Clonagem

Para a clonagem da sequência parcial do gene da Bm86-CG (número de acesso do GenBank: EU352677.1) (ANDREOTTI et al., 2008), um fragmento de DNA de 1.825 pb foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores EcoRI-BmCG-F1 (CGGAATTCATCAICCAATTCGCTC) e BmCG-KpnI-R2 (TGGAAAGICAAGTCCGGTACCCC), em termociclador MastercyclerPersonal (Eppendorf, Alemanha) utilizando Platinum®Iaq DNA polimerase de alta fidelidade, e clonado no vetor pPICZαA (Invitrogen), em grelha com o His-Iag do plasmídeo. 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 transformado por eletro-

poração. Para tal, uma alíquota de 80 μL da estirpe X33 de *P. pastoris* eletrocompetentes foi transformada utilizando 10 μg de pPICZ α A-BmCG linearizado com SacI, aplicando um pulso de 20 kV durante 5 ms. As células recombinantes foram selecionadas em placas de YPDS contendo ZeocinTM (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose, 1 M de sorbitol, 2% de agar, 100 μg / mL de zeocina).

DNAs dos clones foram extraídos utilizando o método de ruptura por esferas de vidro. Um mL de sedimento da cultura foi ressuscitado com 150 mL de SIES (2,42% de Iris 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 (0,425-0,600 mm) e 150 μL de fenol:clorofórmio:álcoolisoamílico (12:12:1 v/v) foram adicionados à mistura, que foi agitada em vórtex durante 1 minutos e centrifugada a 13.000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi precipitado com 300 mM de acetato de potássio; o sedimento recuperado e lavado com etanol 70%. O DNA foi seco ao ar e ressuscitado em água ultrapura esterilizada. O DNA foi quantificado utilizando um Espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific, EUA) 260 nm e armazenado à -20 °C.

Produção de anticorpos policlonais

Soros policlonais contra GavacTM, TickGard^{PLUS}, extrato de larvas de *R. microplus* e rBm86-CG podem ser produzidos utilizando camundongos BALB/c. Para se obter o extrato de larva, 8 g de larvas são congelados à -20 °C, macerados utilizando almofariz e pistilo em 150 mM de Iris-HCl, pH 7,4 adicionado a um volume final de 8 mL. O extrato fluido deve ser sonicado com dois pulsos de 200 w 10 s a 60% de amplitude e outros 4 pulsos de 10 s a 20%. O conteúdo final deverá ser filtrado em filtro de seringa (0,22 μm) e armazenado à -20°C. A proteína total do extrato de larvas deve ser quantificada e diluído 3 mg em 15 mL de 150 mM Iris-HCl, pH 7,4, e emulsionado em 15 mL de adjuvante completo de Freund, proporcionando 30 mL de emulsão de extrato das larvas para a imunização.

A vacina rBm86-CG é preparada com 500 μg de proteína rBm86-CG ressuscitado em 5 mL de 150 mM de Iris-HCl, pH 7,4 e emulsionada com 5 mL de adjuvante completo de Freund. Vinte e quatro camundongos BALB/c fêmeas são divididos em quatro grupos de 6 animais. Cada grupo recebe uma das quatro vacinas, a uma concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (GavacIM, TickGardPLUS ou rBm86-CG), ou 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (extrato de larvas), para cada dose de 100 μL inoculada. Três doses intramusculares devem ser aplicadas em intervalos de 21 dias. As amostras de soro são colhidas 21 dias após os camundongos receberem a última imunização.

Dot blotting para triagem de *P. pastoris* transformantes

Cada clone é 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 10⁻³% de biotina, 1% de glicerol) e incubado em agitador orbital a 220 rpm, 30°C, juntamente com os controles: um clone transformado com o mesmo plasmídeo e expressando albumina sérica humana (GS115/Albumin) e X33 não transformada. Após 24 h de incubação, as culturas são centrifugadas a 1.500 x g durante 5 minutos, o sobrenadante é desprezado e as células ressuscitadas em 5 mL de BMMY (1% de extrato de levedura, 2% de pep-

tona, fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0, 1,34% de YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ de biotina, 0,5% de metanol). As culturas são incubadas em agitador por mais 4 dias. Cada cultura é suplementada com 0,5% de metanol (v/v) a cada 24 h. As culturas são centrifugadas e os sobrenadantes colhidos em microtubos de 2 mL, tratados com PMSF 1 mM e armazenadas a -20°C .

Uma membrana de PVDF deve ser lavada por 10 s em metanol e, em seguida, 5 minutos em água ultrapura esterilizada. Uma alíquota de 5 μL de sobrenadante de cada clone selecionado é aplicada à membrana de PVDF pré-tratada e seca. Alíquotas de 5 mL de GavacTM e TickGard^{PLUS} são utilizadas como controles positivos. A membrana é bloqueada utilizando tampão fosfato salina (PBS) contendo 5% de leite em pó desnatado, com agitação durante 1 h a 30°C e, subsequentemente, lavadas duas vezes (5 minutos de cada vez) com PBS-I (PBS mais 0,1% de Tween 80, pH 7,4).

Cada membrana é então incubada com os anticorpos policlonais dos camundongos vacinados com GavacTM ou TickGard^{PLUS}, diluídos 1:150 em PBS, em agitação durante 1 hora a 30°C . As membranas são submetidas a três lavagens adicionais com PBS-I, seguidas por incubação com anticorpo secundário de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluído 1:1.000 em PBS-I. O processo é completado por três lavagens adicionais com PBS-I 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 é seguida por lavagem em água ultrapura esterilizada. As membranas processadas são fotodocumentadas.

Triagem de fenótipo e genótipo *Mut* em *P. pastoris* transformadas

Fenotipicamente, os clones recombinantes podem ser *Mut*⁺ ou *Mut*^S. O fenótipo *Mut*^S (utilização lenta 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*⁺, pois estas últimas mantêm ambos os genes. A transformação de X33, recomendada neste protocolo, pode resultar em transformantes de ambos os fenótipos. Dessa maneira, se torna imprescindível a determinação do fenótipo em função da determinação das concentrações de metanol a serem utilizadas nas induções dos diferentes clones.

Para a análise genotípica, o DNA extraído de cada clone e o DNA de GS115 (*Mut*⁺) e GS115/albumin (*Mut*^S) são submetidos a PCR utilizando dois pares de iniciadores (3'*AOX1* com 5'*AOX1* e 3'*AOX1* com α -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*⁺ e *Mut*^S) são sequenciados com os iniciadores para o promotor *P*_{*AOX1*}. Estas sequências e a sequência do gene *Bm86-CG* devem ser comparadas utilizando *software* ClustalW, para alinhamento de sequências.

Produção de rBm86-CG

Para expressar rBm86-CG, uma colônia isolada de cada clone *Mut*⁺ e *Mut*^S, assim como de cada controle, é inoculada, separadamente, em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 25 mL de meio BMGY. As mesmas são incubadas durante a noite em agitador

orbital a 220 rpm, 30 °C, até atingir $DO_{600\text{ nm}} = 4,0$ (aproximadamente 16 – 18 h). As culturas são posteriormente centrifugadas a 1.500 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos do clone *Mut⁺* e da X33 negativa são ressuspensos em aproximadamente 200 mL de meio BMMY, a uma $OD_{600\text{ nm}} = 1,0$. Cada cultura é 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^S* e da GS115/Albumin são ressuspensos em 250 mL de meio BMGY e incubados durante a noite. Estas culturas são novamente centrifugadas, ressuspensas em 200 mL de meio BMMY e incubadas. A indução é mantida pela suplementação com 0,5% de metanol a cada 24 horas, durante 96 horas. Após este período de indução, as culturas são centrifugadas a 3.300 x g a 4 °C, durante 5 minutos, e os sobrenadantes separados, tratados com PMSF 1 mM e congelados a -20 °C.

Purificação e quantificação de rBm86-CG

Os sobrenadantes do material expresso pelos clones *Mut⁺* e *Mut^S* são quantificados pelo método de curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) em SDS-PAGE. Aliquotas de 50 µL de uma solução de BSA (0,5 µg mL⁻¹) são utilizadas como padrões de quantificação em um gel de poliacrilamida a 7,5%. As bandas formadas no gel são quantificadas por meio de inspeção visual e pela utilização do *software* 2.0 TotalLab (Amersham / Biosciences, Reino Unido), o qual também serve para estimar a massa molecular aparente das bandas. Desta maneira, as intensidades de pixels das bandas referentes as proteínas recombinantes são comparadas as intensidades de pixels das bandas de BSA, com concentrações conhecidas (0,5 µg, 1 µg e 2 µg) sendo estimado um valor em µg para cada proteína recombinante proporcional as suas respectivas intensidades de pixels.

Vinte e cinco mL de sobrenadante do clone *Mut⁺* são incubados a 4 °C, durante 1 h, com metanol 1:1 (v / v) e as proteínas são precipitadas por centrifugação a 5.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Os precipitados de proteínas são eluídos por adição de tampão de ligação desnaturante (ureia 8 M, Na₃PO₄ 20 mM, pH 7,8, NaCl 500 mM). Esta solução é carregada em coluna de cromatografia de afinidade de íons Ni²⁺ (Ni-NIA, Qiagen, Hilden, Alemanha), previamente equilibrada com tampão de ligação desnaturante. A coluna é primeiramente lavada com tampão de ligação desnaturante seguido de cinco lavagens com tampão de lavagem desnaturante (mesmo tampão de ligação desnaturante, porém com pH 6,0). A proteína rBm86-CG é eluída em tampão de eluição desnaturante (mesmo tampão de ligação desnaturante, porém com pH 4,0). O processo de purificação é monitorado em SDS-PAGE 10%. As frações eluídas de elevadas purezas são reunidas e dialisadas contra 1L de PBS a 4 °C, em suave agitação, por 24 h, sendo trocado o PBS em intervalos de 8 h.

Eletroforese e Western blotting de r-Bm86-CG

Cinquenta µL de sobrenadante de cada um dos dois clones selecionados são misturados com 10 µL de tampão de SDS-PAGE (NuPAGE, Invitrogen) em separado. Estas amostras são incubadas durante 6 minutos a 95°C, deixadas esfriar e aplicadas (20 µL) em gel de poliacrilamida 7,5%. A eletroforese é executada por 1,5 h a 30 mA em um sis-

tema de eletroforese 1D. Outra eletroforese 1D é executada com 10 µL de sobrenadante *Mut*⁺ por poço para a realização do *Western blotting*. As proteínas são transferidas para membrana de PVDF pré-tratada com metanol durante 10 s e água ultrapura esterilizada durante 5 minutos.

A transferência é realizada com um sistema imerso em tampão de transferência (0,3% de base Iris, 1,44% glicina, 15% metanol, pH 8,4) a 100 mA durante 2 h, em câmara fria a 4°C. A membrana é 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 são bloqueadas com PBS contendo 5% de leite em pó desnatado em agitação a 30°C, durante 1 h, lavadas duas vezes com PBS-I, durante 5 minutos, e incubadas com soro primário diluídos 1:150 em PBS a 30°C, durante 1 h.

Uma tira é incubada com cada soro: anti-Gavac, anti-IickGard, anti-extrato de larva e anti-rBm86-CG. Cada tira é lavada duas vezes durante 5 minutos com PBS-I e incubada com anticorpo secundário de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:1000 em PBS-I a 30°C, durante 1 h. Segue-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 NH₄) até que bandas bem definidas apareçam sobre a membrana de PVDF.

Imunoproteção em bovinos

A proteína rBm86-CG expressa por *P. pastoris Mut*⁺ é emulsificada com Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris), seguindo recomendações do fabricante, para produzir doses de 2 mL com 100 µg de antígeno. Um ensaio controlado é realizado para avaliar a capacidade imunogênica e protetora do antígeno rBm86-CG. Bovinos de um ano de idade da raça Holandesa são ambientados antes da experimentação e recebem cuidados veterinários adequados durante o estudo. Os bovinos são distribuídos aleatoriamente em dois grupos de seis animais cada.

Um grupo é imunizado com o antígeno rBm86-CG, seguindo o protocolo descrito abaixo. Os outros seis animais servem de grupo controle e são tratados conforme o protocolo, exceto que recebem injeções de 2 mL de adjuvante sem antígeno. Cada animal é injetado por via intramuscular nas semanas 0, 2 e 4. Amostras de soro de cada animal são colhidas semanalmente antes e após a imunização. Vinte e um dias após a última dose, os animais são desafiados com 15.000 larvas de *R. microplus*, liberadas ao longo do dorso do animal em três aplicações, durante uma semana.

A coleta de carrapatos é realizada diariamente, logo que as fêmeas ingurgitadas começaram a se desprender espontaneamente dos animais controle. Os carrapatos são levados para o laboratório, pesados e incubados a 29°C em 85% de umidade relativa até concluírem a postura. As massas de ovos são pesadas e incubadas para determinar a taxa de eclosão, ou seja, a fertilidade.

Colheita e análise do soro dos bovinos

Amostras de sangue são obtidas dos animais imediatamente antes da imunização e, após, semanalmente, por punção jugular. O sangue é incubado à temperatura ambiente por 4–6 h e centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos, separando-se o soro, que fica no

sobranadante, das células sanguíneas. O soro obtido é congelado a -20°C para posterior análise por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). As amostras de soro são agrupadas por grupo de tratamento e data de colheita antes do teste. Placas de microtitulação são revestidas com uma solução de 1 mg mL^{-1} de rBm86-CG em tampão carbonato bicarbonato (Na_2CO_3 1,59% p/v, NaHCO_3 2,39% p/v, pH 9,6) durante a noite a 4°C . As placas são bloqueadas com 2% de BSA em PBS-I (200 μL por poço) e depois lavadas cinco vezes com 200 μL de PBS-I. As placas são incubadas com soro bovino diluído a 1:100 em PBS-I (100 μL por poço) durante 45 minutos 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 são adicionados e a placa é, então, incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se mais três lavagens com PBS-I. Ao final, são adicionados 50 μL do substrato cromógeno com o-fenilenediamina (1,0 mM em tampão citrato) e peróxido de hidrogênio (1:1.000 v/v). A reação é interrompida após 15 minutos com 100 μL de NaOH (0,2 M). Um leitor de microplacas é utilizado para fazer a leitura da absorbância a 490 nm.

Análise estatística e de eficácia

Os efeitos de vacinação sobre a biologia do carrapato e sua porcentagem de eficácia são determinados como descrito por Garcia-Garcia et al. (1999) e Andreotti (2006). Resumidamente, são calculadas as taxas de redução associadas à imunização com Bm86-CG em relação ao grupo não vacinado de fêmeas adultas (% DI), e de capacidade de postura (% OD) e de fertilidade (% DF). A eficácia da vacina é calculada como $100 \times [1 - (\text{CRI} \times \text{CRO} \times \text{CRF})]$, em que CRI, 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 é utilizado para comparar os dados biológicos e avaliar a eficácia da vacina. Os níveis médios de absorbâncias são determinados para cada grupo e comparados utilizando ANOVA, como descrito anteriormente (ANDREOTTI, 2006).

RESULTADOS OBTIDOS EM EXPERIMENTOS JÁ REALIZADOS COM rBm86-CG

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

A partir desta metodologia, um plasmídeo recombinante é construído com a inserção da sequência do gene da proteína Bm86-CG no local de múltipla clonagem do plasmídeo pPICZ α , entre os locais de restrição EcoRI e KpnI (Figura 6.1). A sequência da inserção é confirmada por sequenciamento e alinhamento com o gene Bm86-CG (número de acesso do GenBank: EU352677.1) com 100% de identidade. Esta sequência é clonada considerando o cassete de expressão controlada pelo promotor do gene AOX1. O local de múltipla clonagem é mantido antes da sequência do gene Bm86-CG, o que permite uma futura clonagem de outras sequências de interesse.

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

Os clones *Mut*⁺ e *Mut*^S são selecionados e induzidos para a expressão. Espera-se que o rendimento total de proteína no sobrenadante, incluindo rBm86-CG expressa pelos

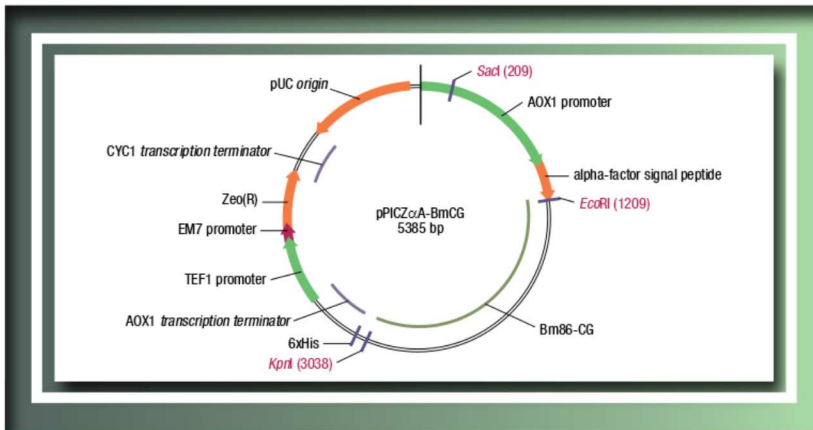


FIGURA 6.1. Mapa do plasmídeo pPICZ α A-BmCG utilizado para transformar *Pichia pastoris*. O mapa foi criado no software Vector NTI 8; AOX1 promoter: promotor fortemente induzido por metanol; SacI: enzima utilizada para linearizar o plasmídeo antes da transformação em *P. pastoris*; alpha-factor: sequência 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 zeocinaTM, permitindo a seleção de *P. pastoris* transformantes; pUC origin: origem de replicação de *Escherichia coli*. Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.

clones *Mut*⁺ e *Mut*^S, seja em torno de 870 mg L⁻¹. A análise do sobrenadante da expressão da proteína em SDS-PAGE 7,5% revela uma banda de aproximadamente 80 kDa. O peso molecular esperado para a proteína rBm86-CG expressa neste sistema é de 79,1 kDa, correspondendo à banda de SDS-PAGE observada (Figura 6.2).

Recuperação e purificação da proteína rBm86-CG

Na análise da eletroforese dos sobrenadantes das culturas, os níveis recuperados de rBm86-CG são em torno de 62,5 e 32 mg L⁻¹ para *Mut*⁺ e *Mut*^S, respectivamente. A purificação em coluna de níquel seguida por SDS-PAGE revela uma proteína com um peso molecular de aproximadamente 80 kDa (Figura 6.3).

Caracterização da proteína rBm86-CG

Camundongos são 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 camun-

FIGURA 6.2. Expressão de rBm86-CG por *Pichia pastoris*. SDS-PAGE 7,5% da fração obtida pelo processo de cromatografia em coluna de níquel do sobrenadante da cultura dos clones *Mut*⁺ e *Mut*^S. M: Marcador BenchMark™ LoaderProtein que varia em peso molecular de 10 a 220 kDa. *Mut*⁺ e *Mut*^S: 10 µg por poço de rBm86-CG expressa pelos clones *Mut*⁺ e *Mut*^S, respectivamente. Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.

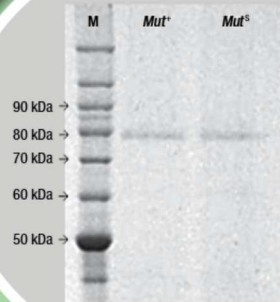
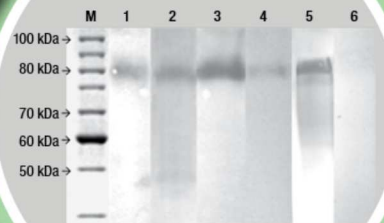


FIGURA 6.3. Western blotting da proteína rBm86-CG expressa pelo clone *Mut*⁺. 1: soro anti-Gavac™; 2: soro anti-TickGard^{PLUS}; 3: soro anti-extrato de larvas; 4: soro anti-rBm86-CG; 5: extrato de larva como antígeno reconhecido pelo soro de bovino imunizado com rBm86-CG; 6: controle negativo; M: Marcador de proteína BenchMark™ para eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida que varia de peso molecular de 10 a 220 kDa. Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.



dongos imunizados com Gavac™, TickGard^{PLUS}, extrato das larvas de *R. microplus* e rBm86-CG revela afinidade para uma proteína de aproximadamente 80 kDa. Estes resultados indicaram que a proteína rBm86-CG contém epítopos com o potencial para proteger os animais contra infestação por *R. microplus*.

Soroconversão dos bovinos vacinados com rBm86-CG

Ao contrário dos animais controle, os bovinos vacinados desenvolvem uma resposta imune humoral significativa contra rBm86-CG (Figura 6.4) ($p < 0,05$). Os níveis de IgG atingem um pico 21 dias após a terceira imunização. A resposta imune humoral de bovinos para o antígeno rBm86-CG mostra uma correlação negativa em relação ao número de teleóginas. Uma diminuição no nível de anticorpos contra rBm86-CG nos animais vacinados é observada uma semana após a infestação, igualando-se ao nível observado na semana anterior a que os carrapatos são colocados nos mesmos animais (Figura 6.4). A cinética da resposta de anticorpos entre bovinos vacinados com rBm86-CG é semelhante a dos animais imunizados com GavaTM (RODRÍGUEZ et al., 1994) e TickGard^{PLUS} (WILLADSEN et al., 1989).

Imunoproteção

A coleta diária das teleóginas é encerrada 15 dias após o início do desprendimento. As dinâmicas de desprendimento e de produção de ovos mostram 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 deve reduzir o número de fêmeas adultas sobre eles em 28%. Não é observada diminuição

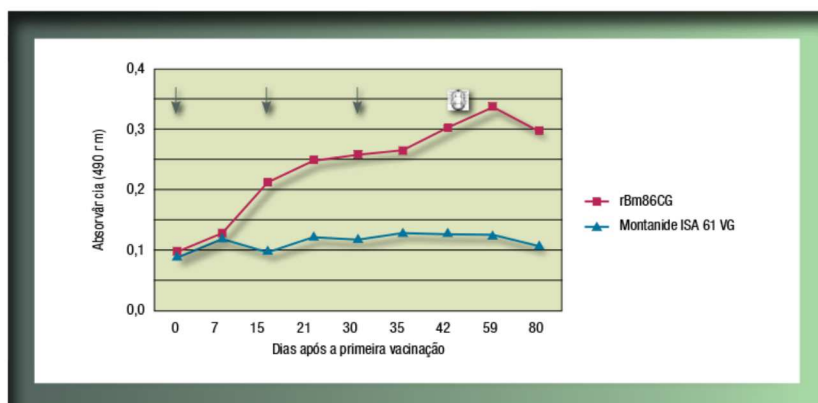


FIGURA 6.4. Perfil de resposta de anticorpos de bovinos vacinados com o antígeno rBm86-CG. Os animais controle foram injetados somente com adjuvante Montanide ISA 61 VG. As absorbâncias de anticorpos de bovinos imunizados estão representadas pelo valor da $DO_{490\text{ nm}}$. As amostras de soro foram 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. *Fonte:* Rodrigo Casquero Cunha.

TABELA 6.1. 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 ^A (VACINADOS/CONTROLES)			Eficácia (%) ^B
	DT	DO	DF	
rBm86-CG	28	-5	8	31
	(3.305/4.594)	(0.138/0.145)	(88.66/96.63)	

^AA porcentagem de redução foi calculada em relação ao grupo controle não vacinado: DT, fêmeas adultas; DO, capacidade de oviposição; DF, fertilidade.

^BEficácia (%) = $100 \{1 - (CRT \times CRO \times CRF)\}$; onde CRT: redução do número de fêmeas adultas; CRO: redução da capacidade de postura; CRF: redução da fertilidade.

na capacidade de postura. A fertilidade é reduzida em torno de 8% (Tabela 6.1). A vacinação do gado com o antígeno rBm86-CG proporciona 31% de eficácia contra a infestação por *R. microplus*.

PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE RRMLTI

Síntese, clonagem e análise das sequências

Para a construção do plasmídeo, o ESI (expressed sequence tag) que codifica para RmL11 (GenBank ID: CK186726 [21,24]) foi otimizado para códons usuais de *P. pastoris* e sintetizado pela EpochBiolabs, Inc. A otimização de códons foi feita utilizando software proprietário EpochBiolabs, Inc., fixado em 15% de *cut off* para a eficiência de códons. O fragmento de DNA de RmL11 sintético foi clonado no pPICZαA, dando origem ao plasmídeo pPICZαRmL11. O plasmídeo recombinante codifica uma cauda de seis histidinas que é adicionada à porção N-terminal da proteína produto.

Comparações do alinhamento, similaridade e discordância com base em técnicas de bioinformática foram conduzidos entre as sequências de aminoácidos preditas para: rRmL11, ESI CK186726, BM11-6 de cDNA de ovário (GenBank ID: P83606.2) e as sequências de aminoácidos N-terminais das BM11-A (GenBank ID: P83609), BM11-D (GenBank ID: P83607), BM11-2 (GenBank ID: P83603) e BM11-3 (GenBank ID: P83604). A ferramenta ClustalW do BioEdit e o software Vector NTI® (Invitrogen) foram utilizados para a realização das análises de bioinformática. A sequência de aminoácidos da rRmL11 foi submetida as análises *in silico* de função e de superfamília de proteínas utilizando o software InterProScan, que identifica domínios de proteínas.

Expressão, quantificação e purificação de rRmL11 e produção de anticorpos murinos

A expressão e quantificação de proteínas no sobrenadante de cultura de *P. pastoris* são realizadas como descrito para rBm86-CG (Itens 1.6 e 1.7). As proteínas são precipitadas com metanol e ressuspendidas em tampão de ligação desnaturante (Ureia 8 M, fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8, NaCl 500 mM). A rRmL11 é purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni²⁺ (Ni-NIA; 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 é monitorado por SDS-PAGE 7,5%. As frações eluídas de elevadas purezas devem ser reunidas e dialisadas contra PBS, pH 7,4.

A utilização e os cuidados com os animais devem ser realizados de acordo com diretrizes institucionais e deverá ser aprovado pelo respectivo órgão de regulamentação de utilização de animais em pesquisa sendo aprovados pelo comitê de ética da referida instituição.

Soros policlonais contra extrato de larvas de *R. microplus* ou rRmL11 são produzidos utilizando camundongos BALB/c como descrito no item 1.3, sendo que a vacina é preparada com 500 µg de rRmL11 ressuspensos em 4 mL de Iris-HCl 150 mM, pH 7,4 e emulsificados com 6 mL de Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris).

Eletroforese e Western blotting da rRmL11

A eletroforese do material é realizada em gel de poliacrilamida 10% com 10 µL de sobrenadante de cultura por poço contendo 0,55 µg mL⁻¹ de proteína. O *Western blotting* é realizado como descrito anteriormente, no item 1.8.

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

O antígeno rRmL11 expresso em *P. pastoris* é emulsificado com adjuvante Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris) e são preparadas doses de 2 mL contendo 100 µg da proteína recombinante. Bovinos de um ano de idade da raça Holandesa são distribuídos aleatoriamente em dois grupos de seis animais cada. Um grupo é imunizado com o antígeno rRmL11 purificado e formulado como descrito acima. O segundo grupo (controle negativo) é injetado com adjuvante/salina apenas. Amostras de soro são colhidas e processadas. Todos os procedimentos que envolvem o *stalltest* são realizados de acordo com métodos descritos para produção de rBm86-CG (itens 1.9, 1.10 e 1.11). Os soros obtidos de cada um dos seis animais, antes da primeira vacinação e após, periodicamente, dos grupos vacinados e controle são reunidos e armazenados em ultra-freezer até a realização do ELISA.

Para a realização do ELISA, placas de microtitulação são revestidas com uma solução de 1 µg mL⁻¹ de rRmL11 em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6), 50 µL por poço, e incubadas durante a noite a 4°C. São testadas duplicatas das amostras de soros agrupadas por grupo e data de coleta. Os procedimentos subsequentes são realizados como descrito no item 1.10.

Alimentação ex vivo de carrapatos com IgGanti-rRmL11 e avaliação da taxa de eclosão

As amostras de soro de bovinos imunizados com rRmL11 são colhidas imediatamente antes da infestação por carrapatos e submetidas a cromatografia em proteína A sepharose para purificar IgG, seguindo recomendações do fabricante. A IgG eluída da coluna tem um rendimento esperado de 5 mg mL⁻¹. Quatro grupos, cada um constituído por dez fêmeas adultas de carrapatos, são utilizados para o tratamento. Cada carrapato, do respectivo grupo, é alimentado com a mistura de anticorpos contendo 0, 25, 50 ou 100 µg de IgG purificada em 20 µL por meio da colocação de um tubo capilar

no seu hipostômio. Depois disso as teleóginas são incubadas a 28°C, 80% de umidade até a postura. O efeito sobre a eclosão é avaliado como descrito no item 1.11.

RESULTADOS JÁ OBTIDOS PARA PRODUÇÃO DE RRMLTI

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

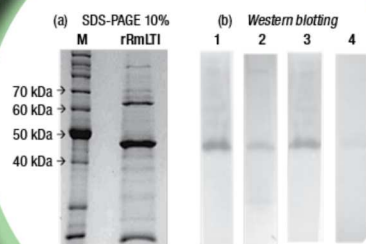
A identidade da inserção de DNA no pPICZ α RmLTI é confirmada por sequenciamento e alinhamento com a sequência de nucleotídeos do ESI da RmLTI. Um clone *Mut*⁺ é selecionado e a análise da expressão da proteína recombinante revelará uma banda de aproximadamente 46 kDa. O peso molecular calculado para rRmLTI é de 37,9 kDa. Resta ainda ser validado se a modificação pós-traducional por meio de glicosilação, potencialmente adicionando 8-9 manoses e duas moléculas de N-acetil-glucosamina, pode ter causado a discrepância entre os pesos moleculares calculados e observados do produto da expressão por *P. pastoris*.

Quantificações diretas de rRmLTI a partir de sobrenadantes de culturas revelam níveis de produção de 550 mg L⁻¹. A análise do produto da purificação em coluna de níquel mostra uma proteína de 46 kDa e, após a purificação, o rendimento será de aproximadamente 870 mg L⁻¹. *Western blotting* da proteína rRmLTI realizado com soros de camundongos (primário anti-extrato de larvas de *R. microplus* e anti-rRmLTI) e com anticorpo monoclonal anti-Histidina, revela uma proteína de aproximadamente 46 kDa (Figura 6.5).

Imunoproteção de bovinos contra a infestação de *R. microplus*

O perfil da resposta de anticorpos dos bovinos imunizados com a formulação vacinal contendo RmLTI é apresentado na Figura 6.6. Os níveis de anticorpos contra

FIGURA 6.5. Identificação do inibidor de tripsina presente em larvas de *R. microplus* expresso por *Pichia pastoris* por eletroforese e *immunoblotting*. O sobrenadante da cultura de *P. pastoris* transformada com pPICZ α RmLTI foi processado para realização de: (a) eletroforese (SDS-PAGE 10%), onde o gel foi carregado com M (marcador de peso molecular [BenchMark™ProteinLadder, 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.
Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.



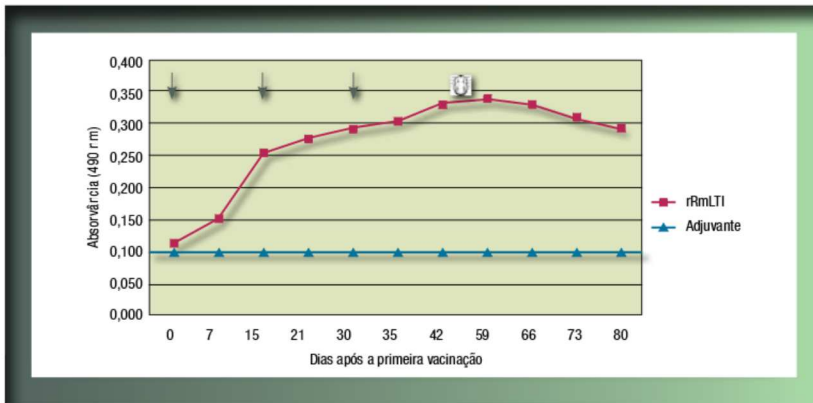


FIGURA 6.6. Perfil de resposta imune humoral em bovinos vacinados com rRmLTI. As leituras de absorvância são do ELISA das amostras de soros semanais coletadas dos dois grupos de seis bovinos imunizados nos dias 0, 15 e 30 (setas) com rRmLTI (linha quadriculada) ou adjuvante/salina (linha triangular). O ícone carrapato indica o dia 51 após a primeira vacinação, que é quando os bovinos foram infestados. As absorvâncias de anticorpos de bovinos imunizados estão representadas 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. *Fonte:* Rodrigo Casquero Cunha.

rRmLTI têm um pico cerca de 31 dias após a segunda imunização de reforço (3ª dose). A infestação de carrapatos se estabelece 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 fica evidente até o nono dia do período de coleta (Figura 6.7).

Com exceção dos dias 2 e 4, o peso médio de teleóginas recolhidas do grupo vacinado é significativamente inferior até o nono dia (Figura 6.7, $p < 0,05$). A equivalência de peso médio de teleóginas entre os grupos a partir do dia 9 do período de coleta é associada com a referida redução nos níveis de anticorpos anti-rRmLTI (Figura 6.6). Uma tendência semelhante é observada na taxa de eclosão de larvas de carrapatos que se desprenderam de bovinos vacinados (Figura 6.8).

A contagem acumulada de teleóginas até o dia 13 após o início do desprendimento é utilizada para calcular os efeitos da vacinação com rRmLTI (Tabela 6.2). Bovinos vacinados têm 30% menos carrapatos desprendendo-se deles quando comparados aos animais injetados com apenas adjuvante/salina. Embora a capacidade de postura seja afetada, há um efeito significativo associado com a vacinação no peso dos carrapatos e na eclodibilidade larval (Tabela 6.2, $p < 0,05$). Em termos gerais, a vacina formulada com rRmLTI oferece 32% de imunoproteção aos bovinos contra a infestação de carrapatos (Tabela 6.2).

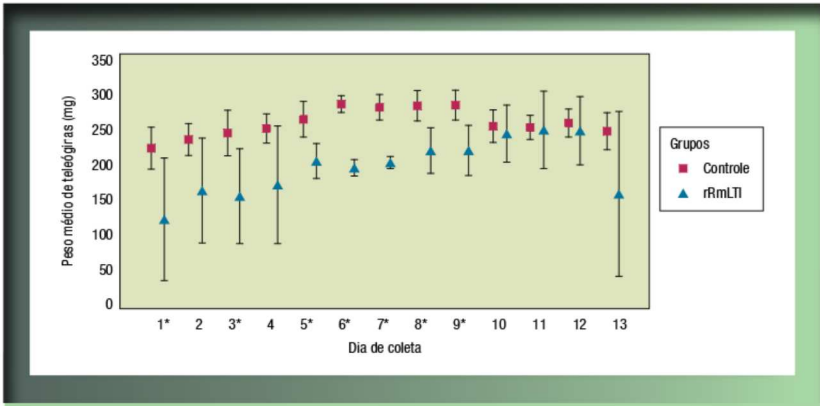


FIGURA 6.7. Redução de peso de teleóginas de *R. microplus* que se alimentaram em bovinos vacinados com rRmLTI. Média do grupo \pm Desvio Padrão. *Dia de coleta com asterisco indica que o peso médio entre as teleóginas que se alimentaram de bovinos vacinados ou de bovinos controles foram significativamente diferentes ($p < 0,05$).
 Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.

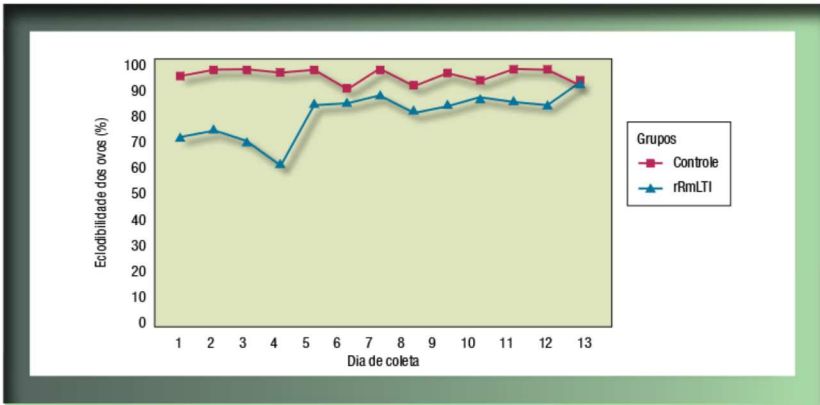


FIGURA 6.8. Porcentagem de eclosão de larvas por teleóginas alimentadas em bovinos vacinados com rRmLTI em comparação aos animais controles. Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.

TABELA 6.2. 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 ^a	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 ^b	DT = 30,15		DW = 24,66		DO = -7,27		DF = 8,97	
Eficácia = 100 [1 - (535/766 x 148/138 x 88/97)] = 32 %								

^aMédia aritmética ± desvio padrão; estão mostrados os valores p do teste-t para amostras independentes.

^bAs 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.

Efeito de IgG anti-rRmLII purificada na eclodibilidade larval

O efeito da resposta de anticorpos anti-rRmLII na eclosão de larvas é também investigada *ex vivo*. Uma relação dose/resposta inversa é observada entre a eclosão de larvas e a quantidade de IgG ingerida pela teleóquina (Figura 6.9). A viabilidade dos ovos postos por teleóginas que ingeriram anticorpos IgG purificados de bovinos vacinados com rRmLII é significativamente comprometida, chegando a uma diminuição de 75,6% na postura de carrapatos alimentados com 100 µg de IgG (p < 0,05).

Identificação de RmLII como um membro da família de ITPB tipo Kunitz

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

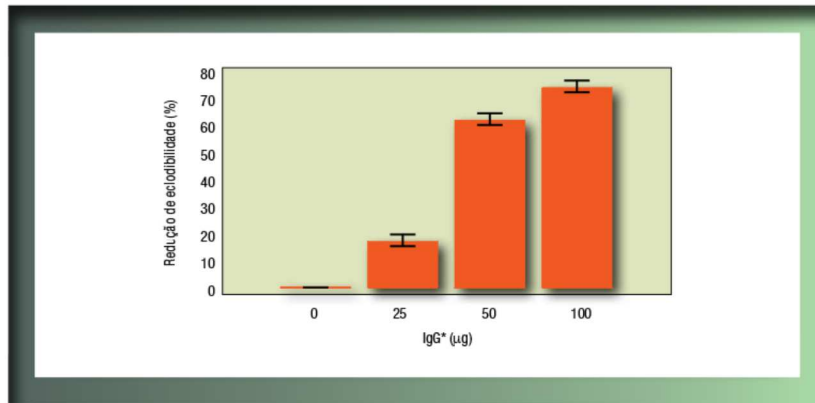


FIGURA 6.9. IgGanti-rRmLTI ingerida por teleóginas inibe a eclosão de larvas de maneira dose-dependente. *Quatro grupos de dez carrapatos receberam 0, 25, 50 e 100 µg de IgG purificada. Cada teleóquina foi alimentada com a quantidade especificada de IgG num volume de 20 µL utilizando um tubo capilar. O gráfico mostra a média dos tratamentos ± desvio padrão. A porcentagem média de inibição de eclosão foi significativamente diferente entre os diferentes grupos de tratamentos ($p < 0,01$). *Fonte:* Rodrigo Casquero Cunha.

A Figura 6.10 representa o alinhamento das sequências de aminoácidos previstas para rRmLTI, ES1 CK186726 e BM11-6 de cDNA de ovário com as sequências N-terminais informadas para BM11-A, BM11-D, BM11-2, e BM11-3. As sequências de aminoácidos deduzidas de rRmLTI, ES1 CK186726 e BM11-6 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 sugere que RmLTI em larvas é um membro da família de IIPB-Kunitz, assim como a BM11-6 no ovário de fêmeas adultas de carrapatos.

Uma análise melhor da suposta função de RmLTI é apresentada na Figura 6.11. Relevantes características proteicas identificadas na sequência de aminoácidos deduzida para a sequência CK186726 incluem três prováveis domínios de IIPB-Kunitz e dois prováveis sítios de inibidores de proteinase 12 tipo Kunitz conservados.

Como observado na BM11-6, 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.

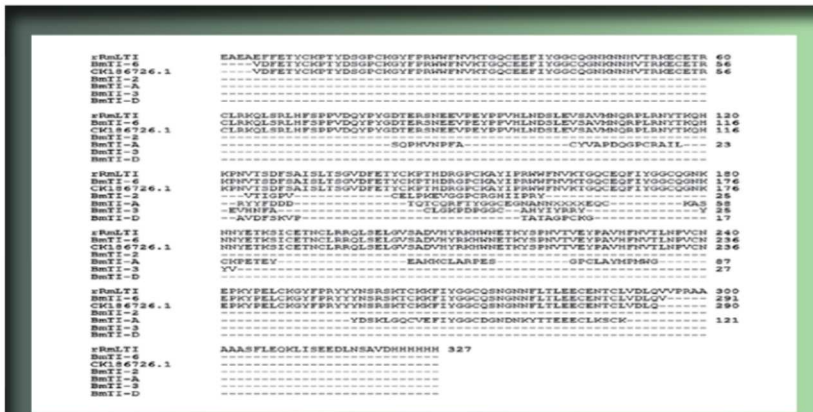


FIGURA 6.10. Alinhamento das sequências de aminoácidos previstas para rRmLT1, EST CK186726, BmTI-6 de cDNA de ovário e as sequências de aminoácidos N-terminais de BmTI-A, BmTI-D, BmTI-2 e BmTI-3. *Fonte:* Rodrigo Casquero Cunha.

PROTÓTIPO DE PREDIÇÃO, POR BIOINFORMÁTICA, DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS EM PROTEÍNAS DE CARRAPATOS

A Vacinologia Reversa e o uso da bioinformática no estudo de vacinas vêm ganhando espaço à medida que a era pós-genômica vai depositando a cada ano mais informações sobre genomas, transcriptomas e proteomas de carrapatos (GARCIA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2013; BAIISSIA et al., 2008).

Assim, ferramentas de bioinformática vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de analisar estes dados em conjunto com informações já disponíveis sobre moléculas do sistema imunológico (MHCs e receptores de linfócitos B e T), tanto da espécie humana quanto de animais (principalmente camundongos). Isso permite o acesso de pesquisadores em todo o mundo a realizar ensaios *in silico*, visando uma triagem de antígenos ou suas subunidades de interesse imunogênico, para que sejam selecionados candidatos a uma vacina com maior precisão, acurácia e, menor tempo e custo (RAPPOULI, 2000).

Carrapatos são seres eucariotos, e ao contrário dos procariotos, largamente utilizados no início da vacinologia reversa na era pós-genômica, possuem genomas muito extensos, o que os faz serem organismos complexos (com uma complexa interação com seus hospedeiros), dificultando a seleção de um antígeno em específico. Neste caso, cabe a cada pesquisador definir qual estratégia utilizar para selecionar proteínas ou famílias de proteínas alvos para serem candidatas a uma vacina para algum hospedeiro, humano ou animal, contra uma determinada espécie de carrapato. De fato, essa estratégia só será possível se o genoma, transcriptoma ou proteoma do carrapato a ser estudado for conhecido.

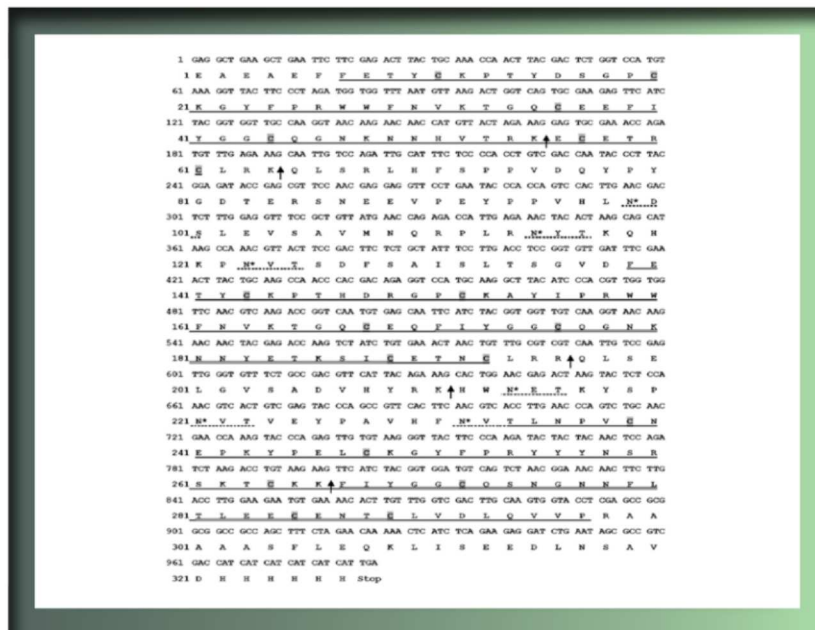


FIGURA 6.11. Um inibidor de tripsina em larvas de *R. microplus* é codificado pelo EST CK186726. A sequência de aminoácidos deduzida a partir do DNA sintetizado para codificar RmLTI e otimizado para códons usuais de *P. pastoris* foi analisada para as características de proteínas utilizando a ferramenta 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. *Fonte:* Rodrigo Casquero Cunha.

Atualmente existem distintos algoritmos que possuem finalidades específicas em análises de proteínas, como por exemplo: a probabilidade de uma determinada proteína possuir hélice transmembrana e possuir âncora GPI, que são características de proteínas associadas à membrana celular, desejadas para alvos em intestino, principalmente; possuir epítopos lineares de superfície ou conformacionais (neste caso para proteínas que estiverem depositadas em bancos de dados como Protein Data Base, e nas quais a estrutura terciária for conhecida por cristalografia por raio-X, por exemplo); epítopos para receptores de células B ou T (para alelos murinos ou humanos); regiões intrinsecas

mente desordenadas, nas quais os epítopos são apresentados de maneira aleatória, uma vez que nessas regiões a estrutura terciária não é constante, entre outros.

Algumas ferramentas de bioinformática já foram utilizadas como estratégias de vacinologia reversa para carrapatos (MARIUZ-OLIVIER et al., 2012; PATARROYO et al., 2002), e aqui listaremos alguns algoritmos livres e disponíveis online já utilizados e outros que podem ser úteis em prever características antigênicas, bem como a maneira de realizar essas análises. Quase todos os algoritmos exigem que as proteínas estejam em formato FASTA, que precisa ser inserido no campo solicitado:

Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>); determina vias metabólicas baseadas na relação entre os genes que são mais ou menos expressos. Isso indica alvos que possam ter maior importância para o sucesso do repasto sanguíneo pelo carrapato.

Geneious (<http://www.geneious.com/>): analisa várias características integradas dentro de uma proteína, como ponto isoelétrico predito, estrutura secundária, regiões antigênicas, etc.

IEDB Analysis Resource (http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input): este servidor disponibiliza de uma gama de algoritmos que predizem distintas características dentro de uma proteína, como predição de regiões de superfície na estrutura terciária, epítopos lineares, hidrofobicidade, flexibilidade e etc. (Figura 6.12).

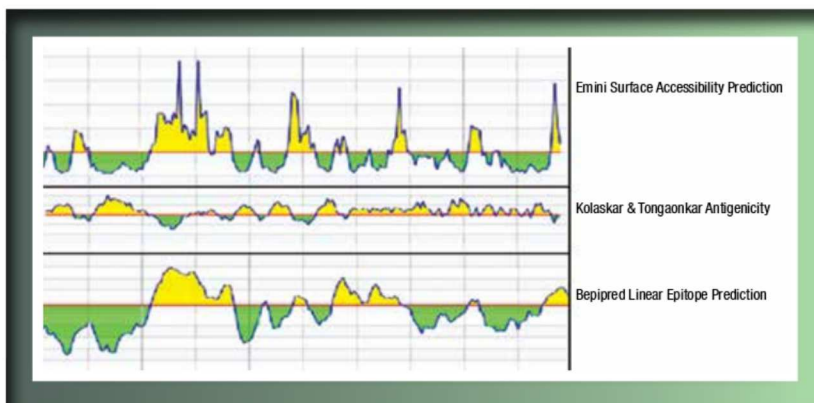


FIGURA 6.12. O exemplo da Figura 6.12 mostra alguns resultados de análise usando distintas ferramentas do mesmo servidor, de uma mesma proteína, baseada em sua estrutura primária. Os resultados são mostrados em forma de gráfico, onde, o eixo horizontal (x) representa a estrutura primária da proteína, ou seja, a sequência de aminoácidos, e o eixo vertical (y) representa o escore que cada determinada região da proteína adquiriu, baseado nas características do teste desejado, onde a linha vermelha é o limiar escolhido. Dessa forma, as regiões do gráfico que estiverem acima desta linha possuem alta probabilidade de possuir a característica desejada.

Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.

IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>): algoritmo designado para prever regiões intrinsecamente desordenadas dentro da estrutura terciária de uma proteína (IUPs). Essa característica é interessante principalmente por consistir de regiões nas quais a estrutura terciária não é definida ou constante, resultando em possíveis epítopos que podem ser constantemente expostos, independente da região estar na superfície proteica (Figura 6.13).

MHC II binding predictions (http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html): prevê regiões na estrutura terciária da proteína que possuem grande probabilidade de se ligarem à molécula de MHC de classe II (Figura 6.14).

MODELLER v9.15 (<https://salilab.org/modeller/9.15/release.html>): realiza modelagem de estrutura 3D, destacando regiões que podem ser possíveis epítopos, inclusive conformacionais (Figura 6.15).

SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>): este algoritmo indica a presença de peptídeos sinais, indicando se a proteína é secretada pela via clássica, assim, indica se pode ser importante para o estabelecimento da relação parasito-hospedeiro.

Swiss-PDB Viewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>): realiza análises de várias proteínas ao mesmo tempo. Trabalha no sentido de dedução de alinhamentos estruturais e compara seus sítios ativos ou outra região relevante.

TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>): algoritmo que prevê regiões de hélices transmembranas, indicando se a proteína possui característica de proteína de superfície celular (interessante no caso de glicoproteínas de intestino (Figura 6.16).

UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>): programa que realiza análises de estruturas moléculas e dados relacionados, como mapa de densidade, arranjos supramoleculares, alinhamentos de sequências, trajetórias, resultados de acoplamento (*docking*), e conjuntos conformacionais em imagens de alta qualidade.



FIGURA 6.13. Neste exemplo, observamos que ao longo da estrutura primária desta proteína, apenas as regiões amino e carboxi terminais, e uma região situada entre o amino terminal e intermediária possuem escores que estão acima do limiar escolhido, ou seja, que possuem alta probabilidade de ser uma região intrinsecamente desordenada.

Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.

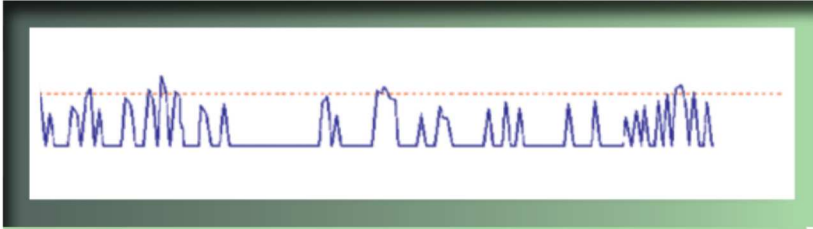


FIGURA 6.14. Pode-se observar a presença de seis picos no gráfico que ultrapassam o limiar (linha pontilhada vermelha). Esses pontos representam regiões ao longo da proteína com alta probabilidade de se ligarem a um receptor MHC de classe II humano oriundo de um determinado alelo, que pode ser escolhido previamente à análise, após a proteína ter sido processada e apresentada via uma célula apresentadora de antígeno (APC).

Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.

Vaxijen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/Vaxijen/Vaxijen.html>): este algoritmo tem como objetivo informar se determinada proteína é ou não imunogênica, baseada na sua sequência em homologia com proteínas de seres humanos. Utilizado para determinar se proteínas virais, bacterianas, parasitárias, fúngicas ou tumorais são antigênicas.

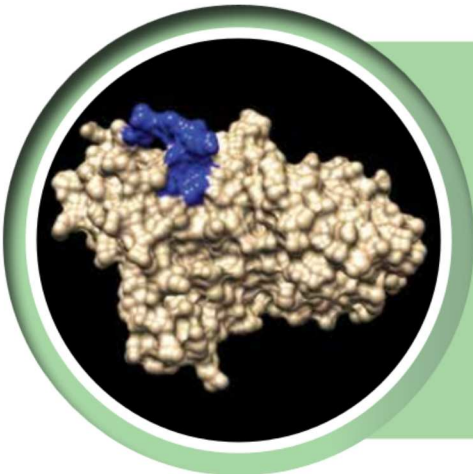


FIGURA 6.15. Este é o resultado de uma imagem em 3D de uma modelagem de uma determinada proteína (traduzida do mRNA) da glândula salivar de *Amblyomma cajennense* (GARCIA et al., 2014). O destaque em azul representa a região do epítipo alvo de natureza linear. Note a localização do epítipo em região exposta à nível de estrutura terciária. Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.



FIGURA 6.16. Neste gráfico, regiões com características de hélice transmembrana são representadas com traços vermelhos na vertical. A região pode ser considerada hélice transmembrana caso a curva formada pelos traços vermelhos ultrapasse o limiar (linha rosa) que está paralelo ao eixo horizontal (x). Note que apesar de este exemplo possuir uma região com algum escore, não ultrapassou o limiar, sendo assim, pouco provável de ser uma hélice transmembrana, o que traz indícios de ser uma proteína secretada pela via clássica ou ancorada à membrana por outra estrutura que não seja uma alfa hélice.
Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, 1983, 4 p. Comunicado Técnico 1.
- ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K. C.; SASAKI, S. D.; SAMPAIO, C. A.; TANAKA, A. S. BmTI antigen induce as bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International Immunopharmacology*, v. 2, n. 4, p. 557-563, 2002.
- ANDREOTTI, R. Performance of two Bm86 antigen vaccine formulations against tick using crossbreed bovines in stall test. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.15, n.3, p. 97-100, 2006.
- 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.; PEDROSO, M. S.; CAETANO, A. R.; MARTINS, N. F. Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants Bm86 Campo Grande strain, Bm86 and Bm95. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 2, 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*, v. 197, n. 1-2, 341-345, 2013.
- BATISTA, I. F. C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARIA, F.; SIMONS, S. M.; BARROS-BATESTTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; LEÃO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon*, v. 51, n. 5, p. 823-834, 2008.
- BRUM, J. G. W. *Infecção em teleóginas de Boophilus microplus (Acari: Ixodidae) por Cedecce 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.
- CORDOVÉS, C. O. *Carrapato: controle ou erradicação*. 2. ed. Guaíba: Agropecuária, 1997, 177 p.

- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23-52, 2000.
- DE LA FUENTE, J. L.; RODRÍGUEZ, M.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; GARCÍA-GARCÍA, J. C.; MÉNDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDÉS, M.; ENRIQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUÉ, O.; MACHADO, H.; LLEONART, R.; DE ARMAS, C. A.; REY, S.; RODRÍGUEZ, J. L.; ARTILES, M.; GARCÍA, L. 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.
- ELDER, J. K.; KEARNAN, J. F.; WATERS, K. S.; DUNDWELL, G. H.; EMMERSON, F. R.; KNOTT, S. G.; MORRIS, R. S. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistance cattle and pasture spelling. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 56, n. 5, p. 219-231, 1980.
- GARCÍA-GARCÍA, J. C.; GONZALEZ, I. L.; GONZÁLEZ, D. M.; VALDÉS, M.; MÉNDEZ, L.; LAMBERTI, J.; D'AGOSTINO, B.; CITRONI, D.; FRAGOSO, H.; ORTIZ, M.; RODRÍGUEZ, M.; DE LA FUENTE, J. 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.
- GARCIA, G. R.; GARDINASSI, L. G.; RIBEIRO, J. M.; ANATRIELLO, E.; FERREIRA, B. R.; MOREIRA, H. N. S.; MAFRA, C.; MARTINS, M. M.; SZABÓ, M. P. J.; MIRANDA-SANTOS, I. K. F.; MARUYAMA, S. R. The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 430, 2014.
- GELLISSSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 6, p. 741-750, 2000.
- GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995. 235 p.
- 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, n. 6, p. 900-907, 1993.
- HOHENBLUM, H.; GASSER, B.; MAURER, M.; BORTH, N.; MATTANOVICH, D. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 85, n. 4, p. 367-375, 2004.
- MARITZ-OLIVIER, C.; ZYL, W. V.; STUTZER, C. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 3, n. 3, p. 179-187, 2012.
- OLIVEIRA, C. J.; ANATRIELLO, E.; MIRANDA-SANTOS, I. K.; FRANCISCHETTI, I. M.; SÁ-NUNES, A.; FERREIRA, B. R.; RIBEIRO, J. M. C. Proteome of *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva induced by secretagogues pilocarpine and dopamine. **Ticks and Tick-borne diseases**, v. 4, p. 469-477, 2013.
- 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, n. 1, p. 54-60, 2013.
- PATARROYO, M. E.; PORTELA, R. W.; DE CASTRO, R. O.; PIMENTEL, J. C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; VARGAS, M. I.; PRATES, A. A.; MENDES, M. A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, n. 3-4, p. 163-172, 2002.
- RAPPOULI, R. Reverse vaccinology. **Current opinion in microbiology**, v. 3, n. 5, p. 445-450, 2000.
- RODRÍGUEZ, M.; RUBIERA, R.; PENICHER, M.; MONTESINOS, R.; CREMATA, J.; FALCÓN, V.; SÁNCHEZ, G.; BRINGAS, R.; CORDOVÉS, C.; VALDÉS, M.; LLEONART, R.; HERRERA, L.; DE LA FUENTE, J. 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, n. 2, p. 135-146, 1994.
- 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.
- 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.

- 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.
- WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. Vaccination with “concealed” antigens for tick control. **Parasitology Today**, v. 4, n. 7, p. 196-198, 1988.
- WILLADSEN, P.; RIDING, G. A.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H.; TELLAM, R. L.; NIELSEN, J. N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G. S.; GOUGH, J. M. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 143, n. 4, p. 1346-1351, 1989.
- WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, n. 2-3, p. 209-222, 1997.