

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

**RESPOSTA IMUNE E EFICÁCIA DE PEPTÍDEO SINTÉTICO
DESENVOLVIDO POR VACINOLOGIA REVERSA CONTRA
*Rhipicephalus sanguineus***

André de Abreu Rangel Aguirre

CAMPO GRANDE, MS

2014

2014	RESPOSTA IMUNE E EFICÁCIA DE PEPTÍDEO SINTÉTICO DESENVOLVIDO POR VACINOLOGIA REVERSA CONTRA <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	de Abreu Rangel Aguirre
------	--	----------------------------

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

**RESPOSTA IMUNE E EFICÁCIA DE PEPTÍDEO SINTÉTICO
DESENVOLVIDO POR VACINOLOGIA REVERSA CONTRA
*Rhipicephalus sanguineus***

Immune Response and Efficacy of Synthetic Peptide Designed by Reverse
Vaccinology against *Rhipicephalus sanguineus*

André de Abreu Rangel Aguirre

Orientador: Dr. Renato Andreotti e Silva

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

CAMPO GRANDE, MS 2014

Certificado de aprovação

ANDRÉ DE ABREU RANGEL AGUIRRE

RESPOSTA IMUNE E EFICÁCIA DE PEPTÍDEO SINTÉTICO DESENVOLVIDO POR
VACINOLOGIA REVERSA CONTRA *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS*

Immune Response and Efficacy of Synthetic Peptide Designed by Reverse Vaccinology against
Rhipicephalus sanguineus

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

Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado (a) em: 17/02/2014

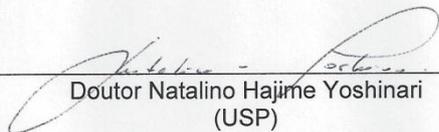
BANCA EXAMINADORA:



Doutor Renato Andreotti e Silva
(EMBRAPA/CNPGC) - (Orientador)



Doutora Lenita Ramires dos Santos
(EMBRAPA/CNPGC)



Doutor Natalino Hajime Yoshinari
(USP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Hugo e Lêda, que deram apoio imprescindível.

Agradeço ao meu orientador Dr. Renato Andreotti pela oportunidade dada.

Agradeço à minha tia Estela pelo exemplo de ser uma pessoa guerreira.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Carrapato pela ajuda nas atividades, em especial a Marcos e Rodrigo pelo conhecimento gratuito transmitido.

Agradeço à Simone, Moacyr, Lucas e Isabela pelo apoio nos momentos difíceis.

À minha mulher Lunna e minha filha Maria Eduarda, meus amores.

RESUMO

AGUIRRE, A. R. A. Seleção de peptídeo por meio de bioinformática e sua avaliação como imunógeno. 2014. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

Infestações por carrapatos podem causar muitos problemas à saúde de animais domésticos como bovinos, equinos e cães, transmitindo doenças e causando prejuízos nas cadeias de produção de carne e leite, entre outros. A principal medida de controle de carrapatos em animais domésticos ainda é por meio de acaricidas, mas cada vez mais estes vêm desenvolvendo resistência aos mesmos. Isso ocorre pela falta de uma política que trate com rigor o uso de acaricidas, e assim vão sendo selecionadas cepas resistentes a eles. A respeito do que foi descrito iniciaram, ao longo das últimas décadas, pesquisas por medidas alternativas para o controle da infestação por carrapatos, como por exemplo, o uso de vacinas. Existem vacinas comerciais validadas apenas para o controle do *Rhipicephalus microplus* em bovinos, e estas utilizam como antígeno a Bm86, uma glicoproteína presente na superfície de células do lúmen intestinal deste carrapato, assim, procuram provocar imunidade do hospedeiro contra este órgão. Assim, quando o carrapato ingere o sangue no seu repasto, este contém anticorpos que irão causar danos ao intestino, prejudicando o desenvolvimento da fêmea adulta. Todavia, a eficácia das vacinas comerciais varia de acordo com as diferentes cepas de *R. microplus* de diversos países, o que impulsiona a pesquisa por novos antígenos, que possuam sequências mais conservadas. Essas pesquisas ganharam um grande suporte da biotecnologia, biologia molecular, bioinformática, e, principalmente junto à elucidação dos genomas e transcriptomas. Desta maneira, cada vez mais informação está disponível na literatura e novos antígenos candidatos estão disponíveis. A vacinologia reversa permite a predição objetiva destes antígenos, como por exemplo simulando a ligação destes aos receptores de Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) por meio de algoritmos. Esta tecnologia permite a predição de domínios antigênicos presente nas proteínas, que em geral, possuem uma pequena cadeia de aminoácidos. Com base na vacinologia reversa, está sendo desenvolvido um programa de bioinformática que realiza análises de propriedades de proteínas candidatas a antígenos vacinais. Este programa detectou que a proteína ATAQ, que

está presente em intestinos e túbulos de Malpighi de diversas espécies do gênero *Rhipicephalus*, possui expressão extracelular e um epítipo antigênico exposto à superfície proteica. Este domínio é um peptídeo que foi construído sinteticamente para ser o antígeno vacinal deste estudo. A proteína ATAQ completa foi isolada, caracterizada e sequenciada recentemente e nossas análises mostraram identidade de 93,3% entre espécies do gênero *Rhipicephalus* e é um candidato à vacina, todavia sua eficácia nunca foi testada. A proposta deste trabalho foi verificar a resposta imune de camundongos, coelhos e bovinos a este peptídeo derivado da proteína ATAQ. Além disso, baseado nessa alta identidade, e como ainda não foi relatada a presença da proteína ATAQ em *Rhipicephalus sanguineus*, e por este se desenvolver bem em coelhos, foi verificada sua eficácia contra o carrapato do cão *R. sanguineus*. O resultado deste estudo mostrou que este peptídeo funciona como hapteno e foi incapaz de desencadear resposta imune por si só na maioria dos animais testados.

Palavras-Chave: Carrapatos, vacinologia reversa, ATAQ, resposta imune e peptídeo sintético.

ABSTRACT

AGUIRRE, A. R. A. Immune Response and Efficacy of Synthetic Peptide Designed by Reverse Vaccinology against *Rhipicephalus sanguineus*. 2013. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

Tick infestation may cause several problems on domestic animal health like cattle, horses and dogs, spreading diseases, and harming on meat and milk chain, among others. The main way to avoid tick infestation in domestic animals is still based on acaricides application, however ticks are becoming resistant to each more molecules. This due to lack of a policy that addresses rigorously the use of acaricides, thus are each more resistant strains are being selected. Due of described above, researches appeared over the past decades, on alternative measures for tick control, like vaccines. There are commercial vaccines available on market only to prevent *Rhipicephalus microplus* infestation in cattle. These vaccine use the glycoprotein Bm86 as antigen, which is present on the luminal surface of midguts cells of ticks, thus, aim to produce host immunity against this organ. This way, during the meal, the tick ingest the serum which have antibodies that will harm this organ, prejudicing the development of the adult female. However, the effectiveness of commercial vaccines varies with the different strains of *R. microplus* from different countries that drive for researches on new antigens, having more conserved sequences. These researches are efforted by the biotechnology, molecular biology, bioinformatics, and mainly by the genomes and transcriptomes development. Thus, the literature is improving each more with new data, and more candidate antigens are selected. Reverse vaccinology approaches allows objective predictions of this antigens, simulating the binding on Antigen Presenting Cells (APCs) receptors by algorithms. This approach permits the prediction of antigenic domains inside proteins, which are in general small aminoacid chains. On reverse vaccinology basis, a bioinformatic program is being developed to analyze proteins in order to predict antigenic regions for vaccine formulation. This software predicted that ATAQ protein, which is present in midgut and Malpighiam tubes of several species from the genus *Rhipicephalus*, have extracellular expression and an antigenic epitope is exposed on the membrane surface. This domain is a peptide that was synthesized for being the antigen of this study. ATAQ protein

was recently isolated, characterized and sequenced, and our *in silico* analyses showed identity of 93,3% among those species and is an antigen candidate. By the time the efficacy of this protein has not been tested, it is an antigen candidate. The proposal of this research was verify the immune response of this peptide in mouse, rabbits and cattle. Furthermore, based on high identity, and because ATAQ have not been proved present in *Rhipicephalus sanguineus*, and by the fact of this thck have good development on rabbits, was verified its efficacy against the brown dog tick. Our results showed that peptides behaves as haptens and incapable of triggering immune response by itself in the majority of animals tesed.

Keywords: Ticks, reverse vaccinology, ATAQ, imunization, rabbits, and synthetic pepitide.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Localização das propriedades preditas na proteína ATAQ de <i>R. microplus</i>	50
Figura 2 - Alinhamento entre genes codificadores da proteína ATAQ no gênero <i>Rhipicephalus</i>	51
Figura 3 - Estatística do alinhamento referente à figura 2.....	51
Figura 4 - Análise de antigenicidade da região do peptídeo.....	51
Figura 5 - Gráfico de probabilidade de acessibilidade à superfície.....	52
Figura 6 - Gráfico de probabilidade de epítomos serem lineares.....	52
Figura 7 - Alinhamento de proteínas ATAQ do gênero <i>Rhipicephalus</i> feito pelo ClustalW2.....	53
Figura 8 - . <i>Dot blot</i> comparando <i>pool</i> de soros dos animais de cada grupo no dia 0 e 21 dias após a terceira dose.....	53

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. <i>Rhipicephalus microplus</i>	2
2. <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	5
3. Controle e resistência de carrapatos em animais domésticos	7
4. Resposta imune contra carrapatos e relação parasito-hospedeiro	8
5. Bm86, vacinas comerciais e novos antígenos candidatos	11
6. Vacinações contra <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	14
7. Vacinologia reversa em vacinas contra carrapatos	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
ARTIGO CIENTÍFICO GERADO PELA PESQUISA	28
Abstract	28
Resumo	29
Introdução	29
Material e Métodos	32
<u>Colônia de <i>Rhipicephalus sanguineus</i></u>	32
<u>Animais</u>	33
<u>Análises de bioinformática e síntese do peptídeo</u>	34
<u>Inoculações em camundongos</u>	35
<u>Inoculações em coelhos</u>	35
<u>Inoculações em bovinos</u>	36
<u>Obtenção de anticorpos policlonais anti-extrato de larva de <i>R. microplus</i></u>	36
<u>Infestação de coelhos com <i>R. sanguineus</i></u>	36
<u>Dot Blot</u>	37
<u>Cálculo da eficácia do peptídeo em <i>R. sanguineus</i></u>	37
<u>Análises estatísticas</u>	39
Resultados	40
<u>Caracterização da sequência do peptídeo na proteína ATAQ</u>	40
<u>Avaliação da produção de anticorpos através de Dot Blot</u>	41

<u>Avaliação dos parâmetros de ciclo de vida em ínstares alimentados em coelhos imunizado</u>	41
<u>Cálculo da eficácia vacinal do peptídeo contra <i>R. sanguineus</i></u>	41
Discussão	42
Conclusão	45
Agradecimentos	45
REFERÊNCIAS	45
Figuras	50

INTRODUÇÃO

O indício mais antigo da presença do carrapato no mundo é um desenho de 1.500 a.C. em uma tumba egípcia de um animal semelhante à hiena com três protuberâncias no pavilhão auricular interno (ARTHUR, 1965). No mundo, aproximadamente mais de 896 espécies de carrapatos foram descritas, divididas em três famílias: Argasidae (193 espécies); Ixodidae (702 espécies) e, Nuttalliellidae, representada por uma espécie (GUGLIELMONE et al., 2010). No Brasil, até o momento, a fauna ixodídica é representada por 65 espécies (MARTINS et al, 2013)

Segundo Veronez (2010) os carrapatos que parasitam animais domésticos são os mais pesquisados no Brasil, principalmente a capacidade vetorial de patógenos e formas de controle, as principais espécies alvo de controle no país são o *Ripicephalus microplus* e o *R. sanguineus*.

O carrapato *R. microplus* é um dos ectoparasitos que acarretam maior impacto econômico, causando grandes perdas para bovinocultura, seja de maneira direta, pelo efeito da picada: irritabilidade, perda de sangue, perda de peso, diminuição na produção de leite, predisposição a miíases, danos no couro e transmissão dos agentes parasitários e infecciosos; como indireta, citando: o custo do controle químico e os resíduos deixados nos subprodutos e no ambiente, gerando grandes prejuízos a pecuária no Brasil (HORN, 1983).

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 sofrido um aumento no uso destas nos cruzamentos industriais ao longo do tempo. Desta forma, considerando que estas raças são mais susceptíveis à infestação por carrapato, é clara a necessidade do estabelecimento de um método de controle sistemático do carrapato e, para isso, é imprescindível a busca e proposição de novas ferramentas de controle (GOMES, 1995).

Já o *R. sanguineus*, popularmente conhecido como carrapato vermelho, tem causado problemas a outra espécie de animal domesticado, é um parasita trioxeno, que se alimenta principalmente em cães, mas ocasionalmente pode parasitar humanos (DANTAS-TORRES et al., 2006) . Causa prejuízos financeiros e à saúde do animal, sendo vetor de patógenos responsáveis por enfermidades como, por exemplo, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* e *Rickettsia*

conorii. O aumento no número de casos de humanos parasitados por *R. sanguineus* indica que a interação entre humanos e este carrapato é mais comum do que se pensava. Assim como o *R. microplus*, o *R. sanguineus* também vem sofrendo uma pressão de seleção semelhante em relação ao uso indiscriminado de acaricidas, resultando no surgimento de populações resistentes à maioria dos princípios ativos existentes. Isso reforça a necessidade de soluções alternativas para o controle destes carrapatos (DANTAS-TORRES, 2008).

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 pesquisadores. No Brasil, o uso de vacinas para o controle do carrapato associado ao controle químico pode abrir possibilidades para o controle integrado mais efetivo, diminuindo o problema com resíduos no ambiente e o desenvolvimento do fenômeno de resistência.

Dentro da perspectiva de procurar novas estratégias para o controle do carrapato, o objetivo deste trabalho foi a avaliação da eficácia de um peptídeo sintético, desenhado por meio de vacinologia reversa, como candidato a antígeno vacinal, com baixo custo, melhor desempenho e que possa servir como uma ferramenta adicional no manejo integrado do controle de carrapatos.

1. *Rhipicephalus microplus*

R. 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). Para a pecuária bovina brasileira, os agentes transmitidos de maior impacto são a rickettsia *Anaplasma* e o protozoário *Babesia*, responsáveis pelo complexo conhecido como “tristeza parasitária bovina” (TPB).

A classificação taxonômica do *R. microplus* (Figura 1), segundo o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – ID: 6941), dos Estados Unidos da América, é:

- Reino – Metazoa
- Filo – Arthropoda

- Classe – Arachnida
- Subclasse – Acari
- Superordem – Parasitiformes
- Ordem – Ixodida
- Superfamília – Ixodoidea
- Família – Ixodidae
- Subfamília - Rhipicephalinae
- Gênero – *Rhipicephalus*
- Subgênero – *Boophilus*
- Espécie – *R. (B.) microplus*

R. microplus tem origem asiática, mais precisamente da Índia e da 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. 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 o estado do Rio Grande do Sul (NUÑES et al., 1982).

R. microplus é um parasito 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, burros, ovinos, caprinos, cães, gatos, porcos, coelhos, veados, 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. A fase parasitária 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 e KEMP, 1979). As larvas infectantes, 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 às lambidas do hospedeiro (WAGLAND, 1978).

A principal fonte de alimentação para as larvas é o plasma. Após a alimentação, a larva muda duas vezes, para tornar-se ninfas e adultos. 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, seguido do rápido ingurgitamento com sangue, que precede a queda da teleógina (LONDT e ARTHUR, 1975). Estas fêmeas são consideradas “maquinas de condensar sangue”, uma vez que, tendo ingerido o sangue, separam a parte sólida – células vermelhas, células brancas e plaquetas – da parte líquida, que é o plasma, que é devolvida na forma de saliva (FURLONG, 2005). A ingestão nos seis primeiros dias de fixação da fêmea é de apenas 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).

A fase de vida livre, na qual o 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). Estando 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 em média três dias após sua queda ao solo, com período de postura em torno de 15 dias (dependendo da umidade e temperatura ambiente) 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 húmidos) a 120 dias (nos meses frios e secos). Após este período, a larva está pronta para subir nas pastagens por geotropismo negativo, estimulada pelos odor, vibrações, sombreamento, estímulo visual e diferenças no gradiente de concentração de CO₂ do hospedeiro (SONENSHIME, 1993). As larvas de *R. 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 *R. microplus* causa prejuízos diretos e indiretos à produção de bovinos. Os prejuízos diretos incluem: 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 a inapetência; a transmissão de agentes patogênicos como *Anaplasma* sp. e *Babesia* sp., responsáveis pela Tristeza Parasitária Bovina; e a redução da qualidade do couro do animal, devido às cicatrizes irreversíveis ocasionadas durante o repasto do artrópode, 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 banheiro, 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 com média de 40 carrapatos *Amblyomma americanum*, por bovino, pode causar perda na produção de quarenta dólares por animal (ERVIN et al., 1987). Um estudo realizado no Brasil estimou o prejuízo causado pelo *R. microplus* à pecuária brasileira, encontrando um valor que supera a dois bilhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2002). A nível mundial, a estimativa é que estes valores podem alcançar a cifra de sete bilhões de dólares anualmente (DE CASTRO, 1997).

2. *Rhipicephalus sanguineus*

A classificação taxonômica do *R. sanguineus*, segundo o *National Center for Biotechnology*

Information (NCBI – ID: 34632), dos Estados Unidos da América, é:

- Reino – Metazoa
- Filo – Arthropoda
- Classe – Arachnida
- Subclasse – Acari
- Superordem – Parasitiformes
- Ordem – Ixodida
- Superfamília – Ixodoidea
- Família – Ixodidae
- Subfamília - Rhipicephalinae
- Gênero – *Rhipicephalus*
- Espécie – *R. sanguineus*

Rhipicephalus sanguineus foi descrito pela primeira vez em 1806 por Latreille como *Ixodes sanguineus*. Sua origem é pouco conhecida, alguns autores sugerem que se trata de uma espécie africana (HOOGSTRAAL, 1956), outros, origem mediterrânea (MOREL & VASSILIADES, 1963).

O *R. sanguineus* é conhecido como carrapato vermelho de cão e tem como principal hospedeiro o mesmo. Este parasita pode ser encontrado em qualquer parte do mundo dentro das latitudes 35° Sul e 50° Norte. Além de cães, o *R. sanguineus* pode ser encontrado em diversas espécies de animais, inclusive o homem (ESTRADA-PEÑA & JONGEJAN, 1999).

Assim como outros ixodídeos, *R. sanguineus* possui quatro ínstares: ovo, larva, ninfa e adulto. Como é uma espécie trioxena, cada ínstar precisa se desprender do hospedeiro para passar para uma nova fase (PEGRAM et al., 1987). Cada fêmea completamente ingurgitada pode ovipor uma quantidade entre 4 a 7 mil ovos, geralmente entre frestas, em um nível bastante elevado do chão (KOCH, 1982).

O período de incubação dos ovos pode variar de 6 a 23 dias (KOCH, 1982). Após a eclosão, as larvas iniciam a busca por um hospedeiro. As larvas no hospedeiro completam seu ingurgitamento em um período dentro de três a dez dias. O período de ecdise para ninfas varia de cinco a 15 dias. Por sua vez, as ninfas levam de três a 11 dias para completar seu repasto, e nove a 47 dias para realizarem ecdise para adultos (PETROVA-PIONTKOVSKAYA, 1947;

PEGRAM et al., 1987).

Em condições laboratoriais, o *R. sanguineus* se desenvolve bem em diferentes temperaturas e níveis de umidade. O maior tempo de sobrevivência de ninfas acontece sob condições de 20°C e 85% de umidade relativa do ar. A temperatura mínima para que ocorra a ecdise é entre 10 a 15°C. Adultos são de modo geral mais resistentes a dessecação do que ninfas, isto ocorre pois o adulto possui maior tamanho, portanto menor capacidade de trocar umidade com o ambiente, além do fato de estes possuírem uma forte quitinização, o que dificulta a perda de água para o meio externo (KOCH & TUCK, 1986).

Para se alimentar, o carrapato insere seu hipostômio e as quelíceras na pele do hospedeiro com a finalidade de alcançar pequenos vasos sanguíneos para causar micro-hemorragias. Desta maneira, logo é secretado o cimento para que a fixação se estabeleça com mais firmeza (JAWORSKI et al., 1992)

Este carrapato é um importante vetor de patógenos, como *B. canis* e *Ehrlichia canis*, agentes responsáveis pela popular “doença do carrapato”, que consiste em duas enfermidades, a babesiose e erliquiose. Há também suspeitas que este parasita é também vetor de *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, responsáveis pela leishmaniose visceral canina (COUTINHO et al., 2005).

O *R. sanguineus* é também vetor de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa. Esse agente já foi isolado nesse carrapato em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Apesar de ter baixa afinidade a humanos, relatos deste parasitando humanos não são incomuns, o que implica sua importância tanto na área médica quanto veterinária (ALMEIDA et al. 2013).

Para pensar em controle deste carrapato, deve-se levar em consideração que apenas 5% dos parasitas se encontram no hospedeiro, e o restante (95%) está no ambiente. Portanto, estratégias para o controle populacional deveriam integrar o controle no animal e no ambiente principalmente. Medidas estas deveriam combinar ferramentas químicas e alternativas, como vacinas e manejo ambiental (DANTAS-TORRES, 2008).

3. Controle e resistência de carrapatos em animais domésticos

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). As drogas mais utilizadas têm sido as derivadas de piretróides, avermectinas, organofosforados e benzoil fenil uréia (VAZ JÚNIOR, 1997), sendo que os piretróides apresentam registro de resistência desde 1989 (ALVES-BRANCO et al., 1992).

O controle alternativo do carrapato vem sendo estimulado apesar de não possuir eficácia tão alta quanto ao uso de acaricidas. Os métodos são os mais variados: seleção de bovinos resistentes aos carrapatos; cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das larvas (SUTHERST et al., 1982); rotação de pastagens; manejo de predadores naturais, como a *Egretta ibis* – ou garça-vaqueira (ALVES-BRANCO et al., 1983), e formigas (GONZALES, 1995); uso de patógenos como o fungo *Metarhizium anisopliae* (GARCIA et al., 2011) e a bactéria *Cedecea lapagei* (BRUM, 1988); e inúmeros fitoterápicos.

O uso de maneira extensiva de acaricidas leva a problemas como o aumento do custo de produção, devido ao custo do manejo, ao custo da dose e à diminuição do período de proteção. Além disso, promove a seleção de linhagens de carrapatos geneticamente resistentes, que torna mais difícil o controle, aumentando ainda mais o custo de tratamento. Nos últimos anos, a resistência dos carrapatos aos princípios ativos vem sendo ampliada de forma mais intensa, comprometendo o uso de certas moléculas no manejo do controle de carrapato em determinadas regiões (ANDREOTTI et al. 2002).

A principal medida de controle do *R. sanguineus* em cães se remete ao químico, de diversas formas, assim como formulações sistêmicas *pour-on*, que são absorvidas pela pele, e agem sistemicamente no carrapato, colares, banhos com *shampoos* e *sprays* (GARRIS, 1991). Fipronil, amitraz e piretróides são os princípios ativos mais largamente utilizados (OTRANTO et al., 2005).

Assim como *R. microplus*, *R. sanguineus* também vem desenvolvendo resistência a acaricidas nos últimos anos, como sugerem estudos realizados no Panamá, Espanha e Brasil. Isso se deve a um uso indiscriminado dos acaricidas, e uma falta de política educativa em relação a este uso (ESTRADA-PEÑA, 2005).

4. Resposta imune contra carrapatos e interação parasito-hospedeiro

Carrapatos ixodídeos são ectoparasitas de alimentação lenta e temporária e, em sua maioria são heteroxenos, necessitando deixar o hospedeiro para realizarem ecdise e oviposição. O repasto destes parasitas pode levar vários dias, depende de uma interação complexa entre mediadores encontrados na saliva do carrapato e a resposta imune do hospedeiro e, quando a resultante desta interação favorece o parasita, é acompanhado de grande crescimento de seu corpo (BALASHOV, 1984).

A primeira linha de defesa do hospedeiro frente à picada do carrapato é a resposta imune inata, que consiste principalmente em resposta inflamatória e processos hemostáticos, como vasoconstrição, ativação de fatores de coagulação sanguínea e consequente agregação plaquetária (PEREIRA et al., 2008).

Outro mecanismo importante para retirada das larvas e ninfas de *R. microplus* acontece por lambadura. Foi esclarecido que bovinos considerados resistentes possuem este comportamento, que está ligado diretamente a uma reação de hipersensibilidade cutânea imediata aos antígenos do carrapato pela liberação local de histamina, que ativa nociceptores da pele, causando desconforto ao animal no local da picada, que faz o animal se lambem (RIEK, 1962). Dessa forma, foi posteriormente corroborada a relação entre animais resistentes e o aumento da migração de mastócitos no local da picada, em infestações sucessivas (ENGRACIA FILHO et al., 2006).

Szabó & Bechara (1999) relataram diferenças entre infiltrados celulares no ponto de fixação de carrapatos em hospedeiros resistentes e suscetíveis em diversas espécies. Entretanto, também foi descrito que animais resistentes produzem fatores de resposta imune causadores de danos à tecidos internos do carrapato, enquanto este realiza seu repasto sanguíneo, originando fêmeas menores e redução da oviposição e eclodibilidade dos ovos (HEWESTON, 1971)

A saliva do carrapato *Ixodes ricinus* é capaz de estimular culturas de células dendríticas a iniciarem a apresentação de antígeno a células TCD4+, as quais são estimuladas a se diferenciarem em células Th2, indicando que a modulação de resposta imune humoral pela saliva é importante para o estabelecimento da relação parasito-hospedeiro (MERJI & BROSSARD, 2007).

Quando a saliva é inoculada no hospedeiro, o mesmo desenvolve resposta imune produzindo anticorpos contra seus componentes. Estes anticorpos são capazes de sensibilizar basófilos, mastócitos, macrófagos e eosinófilos. Quando a porção Fc das imunoglobulinas se liga nos receptores Fcs dessas células, as mesmas aumentam seu poder de quimiotaxia, degranulação e fagocitose, levando a um aumento de resistência do hospedeiro ao carrapato (BROWN & ASKENASE, 1985).

Em um estudo, Yu et al. (2006) relataram a presença de uma proteína expressa na saliva de *Hyalomma asiaticum asiaticum*, e denominaram-na de *B-cell inhibitory factor* (BIF). Esta proteína mostrou-se responsável por inibir a proliferação de linfócitos B. Isto sugere que a saliva possui um papel importante na inibição de resposta imune humoral no local da picada, que pode facilitar a permanência deste parasita no hospedeiro, bem como a entrada de patógenos por este local.

Uma proteína de 16 quiloDaltons foi descoberta presente na saliva de *Ornithodoros moubata* e esta possui um papel inibidor da C5 convertase, uma enzima fundamental na cascata do sistema complemento, uma importante ferramenta de defesa do hospedeiro ao carrapato (ROVERSI et al., 2007).

A saliva também é responsável por facilitar a entrada de patógenos, como arbovirus, *Rickettsias*, espiroquetas e protozoários, que podem causar enfermidades em humanos e animais. Todos estes agentes são transmitidos durante seu repasto, que é longo e complexo, envolvendo uma extensa variedade de interações tanto da parte do parasita quanto do hospedeiro (KAUFMAN, 1989).

Infelizmente, os mecanismos efetores do hospedeiro e o alvo da reação imune eficaz nos carrapatos são ainda muitas vezes controversos, e os fatos já relatados sobre a eficiência da resposta imune são circunstanciais. Contudo, algumas conclusões podem auxiliar no esboço de estratégias de controle imunológico deste parasita (PEREIRA et al., 2008).

Atualmente, as pesquisas com vacinas contra carrapatos visam manipular os mecanismos de resistência de seus hospedeiros (NUTTALL et al., 2006). No entanto, mais pesquisas são necessárias afim de se elucidar a interação parasito-hospedeiro, para aumentar a gama de ferramentas úteis para se desenvolver uma vacina eficaz (WILLADSEN & JONGEJAN, 1999).

5. Bm86, vacinas comerciais e novos candidatos a antígenos

As vacinas surgem neste contexto como uma ferramenta alternativa para o controle do carrapato, podendo ser usadas em associação com o controle químico, diminuindo o número de aplicações dos acaricidas e, dessa forma, reduzindo o custo de produção. Em meio à grande procura por formas alternativas de controle do carrapato, as vacinas, induzindo resposta imune em bovinos contra os carrapatos, têm mostrado resultados promissores (ANDREOTTI et al., 2002), sendo que, suas principais vantagens sobre os acaricidas são, principalmente, por não serem agentes químicos, por terem um menor custo e porque o desenvolvimento de resistência é mais lento do que para os produtos químicos (WILLADSEN, 1997).

A inoculação de extratos de fêmeas adultas (teleóginas) de *R. microplus* em bovinos produziu resposta imune que seria mediada por anticorpos contra o tecido intestinal do carrapato (AGBEDE & KEMP, 1986; KEMP, et al., 1986). Foi, então, identificada uma glicoproteína, denominada Bm86, capaz de induzir imunoproteção (WILLADSEN et al., 1988; RAND et al., 1989).

Foram criadas vacinas comerciais de carrapatos para o gado bovino baseadas no antígeno Bm86, do intestino de *R. microplus*, para o controle deste carrapato, e oferecem alternativas econômicas e ambientais para evitar-se o uso de acaricidas. O desenvolvimento de vacinas aperfeiçoadas no futuro será consideravelmente fortalecido pelas novas e eficientes tecnologias de biologia molecular para a descoberta de antígenos (DE LA FUENTE et al., 2007).

Rand et al. (1989) isolaram e caracterizaram um fragmento de cDNA, com 1982 pares de bases, que codifica a Bm86, que possui 650 aminoácidos, incluindo a sequência de sinal inicial de 19 aminoácidos, e uma região hidrofóbica adjacente ao grupo carboxila terminal com 23 aminoácidos. Nesse estudo foi realizada uma fusão da Bm86, com 599 aminoácidos, com uma beta-galactosidase, de 651 aminoácidos, e expressaram-na em *Escherichia coli* como um corpúsculo de inclusão. Quando esses autores utilizaram esses corpúsculos de inclusão para vacinar o gado bovino, obtiveram uma resposta imune contra esse antígeno clonado, resultando numa modesta diminuição de 24% na sobrevivência de carrapatos alimentados em animais vacinados. Em contrapartida, a maior parte dos efeitos da vacina foi

na diminuição em 77% da capacidade reprodutiva (oviposição) dos carrapatos sobreviventes, pela mensuração no peso da massa de ovos comparada com o grupo controle.

Foi relatada pela primeira vez a expressão do antígeno Bm86 na levedura metiltrófica *Pichia pastoris* por Rodríguez et al. (1994). Portanto, foi desenvolvida uma vacina contra *R. microplus* empregando um antígeno recombinante da Bm86 nativa, o rBm86, utilizada para a preparação da GavacTM (Herber Biotec, Cuba), que foi demonstrada produzir imunidade em animais vacinados sob condições controladas. O grupo vacinado obteve menor taxa de infestação comparado com o grupo controle (RODRÍGUEZ et al., 1995).

Uma análise de custo-benefício da vacina GavacTM, realizada por De La Fuente et al. (1998), mostrou que com o uso da vacina, houve diminuição em 60% no uso de acaricidas, e juntamente com o controle da babesiose, houve economia de US\$23,4/animal/ano, mostrando uma vantagem na vacinação com essa vacina de antígeno recombinante no controle de carrapatos. A vacina TickGard, que parte do mesmo princípio, foi desenvolvida pela *Common-wealth Scientific and Industrial Research Organisation* (CSIRO), em colaboração com a *Biotech Australia Pty. Ltd.*, e lançada pela *Hoechst Animal Health* na Austrália em 1994 (DE LA FUENTE et al., 2007).

Canales et al. (1997) descreveram protocolos para a produção de GavacTM em larga escala realizando clonagem e expressão de Bm86 na levedura *P. pastoris*. Cunha et al. (2011) realizaram a subclonagem do gene da proteína Bm86 de cepas de carrapatos de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, no vetor (plasmídeo) de expressão pPIC9, para ser transformado em levedura, *P. pastoris*. Essa proteína foi caracterizada pela expressão da cepa recombinante que expressou maior quantidade de proteína. A proteína expressa, rBm86-CG, foi reconhecida no ensaio de Western-blot pelos soros policlonais anti-Gavac, anti-TickGard, anti-extrato de larva e anti-rBm86-CG. O soro produzido em bovinos vacinados com o antígeno rBm86-CG apresentou altos títulos de anticorpo e reconheceu a proteína nativa. A rBm86CG possui potencial relevância como imunógeno para formulação vacinal contra o carrapato de bovino, com eficácia de 31% (CUNHA et al., 2012).

Entretanto, o processo tecnológico para essa produção tem sido cara. Considerando isso, Canales et al. (2010) realizaram uma análise econômica na comparação dessa tecnologia com outros processos descritos. Neste trabalho, desenvolveu-se dois processos alternativos para produzir vacinas contra o carrapato, uma baseada na rBm86 expressa intracelular em *P.*

pastoris e outra exibindo peptídeos antigênicos na membrana de *E. coli* (antígeno Bm95-MSP1a). O custo de produção da vacina de rBm86 intracelular em *P. pastoris* foi de US\$0,92/dose, a vacina desenvolvida de rBm86 secretada extracelular pela *P. pastoris* foi US\$0,72/dose e a de Bm95-MSP1a expressa como corpúsculo de inclusão em *E. coli* US\$0,56/dose.

Vargas et al. (2010) fizeram um experimento reduzindo as doses iniciais recomendadas de GavacPLUS, avaliando o tempo e a resposta de produção de anticorpos contra Bm86 em bovinos, e analisaram o efeito desta vacina em fêmeas de carrapatos ingurgitadas de sangue de gado imunizado. Seguindo três esquemas de imunização diferentes, os bovinos desenvolveram uma resposta imune forte e específica contra Bm86. Estes autores concluíram que a administração das duas doses iniciais de GavacPLUS contendo 100 microgramas de antígeno Bm86 é suficiente para afetar o peso e a capacidade reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. De acordo com esses resultados, os custos de manipulação e de vacinação podem ser consideravelmente reduzidos, com implementação de programas de controle integrados contra *R. microplus*.

Vacinas, desenvolvidas na Austrália e Cuba, baseadas no antígeno Bm86 de *R. microplus*, possuem eficácias variáveis contra distintas cepas ao redor do mundo. Uma possível explicação para esta variação na eficácia vacinal é a divergência entre componentes da sequência de aminoácidos das vacinas recombinantes de Bm86 e da Bm86 nativa expressa em carrapatos de diferentes regiões geográficas do mundo, que foi demonstrada por Freeman et al. (2010), quando compararam a sequência de aminoácidos de Bm86 de cepas de *R. microplus* de infestações do sul do Texas com a de Yeerongpilly, na Austrália e de Camcor, em Cuba, obtendo identidade de 89,8% e 90%, respectivamente.

Sossai et al. (2005) compararam o gene da Bm86 de *R. microplus* provenientes de 30 cepas distintas de várias regiões geográficas do Brasil, Argentina, Uruguai, Venezuela e Colômbia, e observaram variações de 1.76 a 3.65% entre sequências do gene nestas cepas.

Andreotti et al. (2008) relataram que diferença entre a sequência dos antígenos de TickGardPLUS, da Austrália, e GavacTM, de Cuba, (Bm86 e Bm95, respectivamente) com a sequência de Bm86 cepa Campo Grande foi de 3,5% e 3,7% respectivamente, o que conclui a razão pela qual a vacina possui eficácia distinta em cepas distintas.

Esse problema estimula grupos de pesquisas a tentarem buscar uma maneira de

construam uma vacina que possua uma eficácia mais padronizada em qualquer lugar do mundo. Portanto, estudos vêm focando na busca de novos antígenos. Outras proteínas também conferem algum grau de imunoproteção ou induzem a produção de anticorpos que interferem no sucesso reprodutivo do carrapato, como por exemplo, Merino et al. (2011), que relataram que o uso de *subolesin* segmentada (um antígeno do carrapato que possui função semelhante à Bm86, porém presente em outros órgãos do carrapato) na vacinação de gado bovino reduzem a infecção de *R. microplus* por *Anaplasma marginale* e *B. bigemina*. Esse resultado é provavelmente obtido pelo efeito da *subolesin* na alimentação do carrapato, afetando a expressão gênica, desenvolvimento e funcionamento das glândulas salivares e do intestino.

Em bezerros de sete meses vacinados com rHaa86, uma proteína de *Hyalomma anatolicum anatolicum* ortóloga à Bm86, obtido como proteína de membrana expressa em *E. coli*, apenas 26% dos carrapatos puderam completar o repasto sanguíneo. Houve também redução no peso das fêmeas ingurgitadas e na massa de ovos obtida após a oviposição (AZHAHIANAMBI et al., 2009).

Estudos revelaram que peptídeos de Bm95, da glândula salivar do carrapato, fundidos com a proteína de superfície maior (MSP) de *A. marginale*, formando Bm95-MSP1a, para apresentação na membrana de *Escherichia coli*, foi eficiente na proteção de coelhos contra *R. microplus*. Contudo, Almazán et al. (2012) testaram o mesmo mecanismo de expressão com as proteínas SUB, EF1a e UBQ, fundidos com a mesma MSP1a, apresentadas na membrana de *E. coli* e desta vez, avaliaram seus desempenhos contra *R. microplus* e *R. annulatus*. A eficácia destas quimeras foram superiores a 60% contra ambas espécies de carrapatos estudadas.

Uma proteína, chamada ATAQ, com alguma similaridade na estrutura primária com a Bm86, foi descrita sendo um potencial antígeno, uma vez que é presente também em Túbulos de Malpighi, e por estar presente com mais constância nos diversos ínstares do carrapato (NIJHOF et al, 2010)

6. Vacinações contra *Rhipicephalus sanguineus*

Os primeiros ensaios com vacinas contra o carrapato vermelho do cão, *R. sanguineus*, foram feitos com extrato total de adultos não alimentados do mesmo, por via subcutânea, e não foi observado aumento na resistência de cães desafiados com o carrapato, mas apenas em hamsters e cobaias e, mesmo assim, a resistência ainda não foi maior do que a adquirida com sucessivas infestações (BECHARA et al, 1994). Soro de cobaias imunizados com este extrato, quando utilizado como anticorpo primário em imunohistoquímica de *R. sanguineus*, mostrou forte pigmentação em intestino médio (células epiteliais, lúmen e membrana basal), células da hemolinfa, ductos das glândulas salivares, túbulos de Malpighi e ovários, o que indica que o hospedeiro produziu anticorpos contra estas estruturas (FERREIRA et al, 1996).

Foi relatada diminuição da recuperação, do peso de adultas ingurgitadas, conversão alimentar em massa de ovos e eclodibilidade de teleógenas alimentadas em cobaias vacinados com extratos de intestino e glândula salivar de *R. sanguineus*. O mesmo efeito só foi observado em cães, quando utilizado adjuvante de Freund, o que sugere que este estimule o hospedeiro a produzir uma resposta predominantemente Th1, o que sugere que a resposta celular esteja intimamente ligada ao processo de resistência do hospedeiro ao parasita (SZABÓ & BECHARA, 1997).

Foram demonstrados e caracterizados inibidores de serinoproteases presente em saliva de *R. sanguineus*, e sua estrutura é similar à do *R. microplus*, o que indica que eles possuem papel semelhante no sucesso da alimentação destes carrapatos no hospedeiro (AZZOLINI et al, 2003).

Um experimento mostrou diminuição na fixação, sobrevivência, alimentação e oviposição de *R. sanguineus* quando tratados com RNA *interference* para silenciar genes para 4D8 e Rs86 (homóloga à Bm86, de *R. microplus*) (DE LA FUENTE & KOCAN, 2006).

Quando vacinados com Bm86, proteína presente nas principais vacinas comerciais contra o *R. microplus*, cães desenvolveram anticorpos e mostraram valores reduzidos de recuperação de ínstares ingurgitados, diminuição no peso de fêmeas alimentadas, na massa de ovos e na taxa de conversão alimentar em massa de ovos (PÉREZ-PÉREZ et al, 2010).

Uma descoberta recente elucidou um grande caminho à descoberta de antígenos candidatos à vacina, que foi o sialotranscriptoma, ou seja, a elucidação de todos os genes transcritos durante a alimentação de *R. sanguineus* pela glândula salivar. Esta glândula é o

principal órgão do carrapato responsável pelo repasto sanguíneo, e os antígenos produzidos por ela são um dos principais alvos candidatos a vacinas. (ANATRIELLO et al, 2010).

7. Vacinologia reversa em vacinas contra carrapatos

As pesquisas em vacinas foram tomando um novo rumo no século XXI, na era pós-genômica. A estratégia de busca de novos antígenos candidatos a vacinas tiveram uma transformação com a evolução da tecnologia em informática e a elucidação de genomas de diversos organismos. Programas de computadores permitiram o aumento na agilidade nessa busca, pois são capazes de detectar, dentro do genoma, o perfil de expressão gênica de antígenos, assim como seus epítomos e como são expressos no agente alvo. Essa estratégia é denominada vacinologia reversa (RAPPOULI, 2000; ADU-BOBIE et al., 2003).

O método convencional de produção de vacinas envolve o cultivo do microorganismo em questão, o qual é laborioso e muito demorado. Este método convencional de produção de vacinas leva em média de cinco a 15 anos. Com o auxílio de ferramentas de bioinformática, este tempo pode ser reduzido para um a três anos. Agentes causadores de doenças graves, que até então não possuíam meio de controle eficaz, e caminhavam vagarosamente no caminho das vacinas, passaram a ter um avanço muito grande nesta área, como a pioneira na vacinologia reversa meningite B, malária, tuberculose, sífilis e hepatite C (RAPPOULI, 2000; ADU-BOBIE et al., 2003).

A fim de detectar epítomos antigênicos, programas de bioinformática utilizam modelo de predição de ligação de antígenos em MHC II humano, codificados pelos *loci* de genes denominados *Human Leukocyte Antigen* (HLA). Em vacinas para bovinos, já foi descrito que o mesmo modelo é viável para ligação de antígenos no MHC II desta espécie, expressa pelos *loci* denominados *Bovine Leukocyte Antigen* (BoLA) (SITTE et al., 2002; VONDERMEIER et al., 2003).

Em vacinas contra carrapatos, a vacinologia reversa tem sido pouco estudada, alguns resultados foram obtidos, contudo necessitam de mais consistência. Em 2002, Patarroyo et al. desenvolveram três peptídeos sintéticos derivados da glicoproteína Bm86, chamados de SBm4912, SBm7462 e SBm19733. Para a construção destes peptídeos, um programa de computador foi utilizado para avaliar propriedades da glicoproteína Bm86, que levou em

consideração sua capacidade antigênica, estrutura secundária, e propriedades de hidrofiliçidade e hidrofobicidade desta. Estes peptídeos foram inoculados em bovinos por via subcutânea utilizando saponina como adjuvante e um carreador (dados não mostrados), contudo, apenas um deles, SBm7462 obteve eficácia acima de 80% (81,05%) contra *R. microplus*.

Com base no resultado acima, foi realizada a síntese de nucleotídeo que codifica para a sequência do peptídeo SBm7462, criando o gene chamado seq1, que foi inserido no vetor de expressão pCIneo, afim de construir uma vacina de DNA. O vetor de expressão foi inoculado em camundongos BALB/c, porém, não obteve uma titulação de anticorpos alta como nos ensaios utilizando o peptídeo por via subcutânea (MEDEIROS et al., 2008).

Além da Bm86, uma proteína ortóloga Bd86, de *R. decoloratus*, foi analisada por meio de bioinformática, e assim foram identificados dois epítomos lineares ligantes de células B. Com base na sequência destes epítomos, foram sintetizados dois peptídeos, chamados de Bd86-1 e Bd86-3. Estes peptídeos foram carregados em virossomas, os quais foram inoculados por via intramuscular em camundongos BALB/c, para a produção de anticorpos por meio de hibridomas, contendo células de baço destes camundongos imunizados. Anticorpos monoclonais anti-Bd86-3 foram capazes de se ligar nos intestinos de, além do próprio *R. decoloratus*, de *R. microplus*, *R. appendiculatus* e *Hyalomma anatolicum anatolicum*, por meio de imuno-histoquímica. Estes resultados indicam que peptídeos desenvolvidos por vacinologia reversa, se possuírem sequência conservada entre proteínas ortólogas de diversas espécies de carrapatos, podem ser utilizados como candidatos a vacina contra estes (KOPP et al., 2010).

Maritz-Olivier et al. (2012) realizaram o transcriptoma de todos os estágios de vida de *R. microplus*, de uma cepa de Moçambique. Desta forma, foi relatada a presença de 4.394 proteínas transcritas em todos os estágios de vida. Utilizando o algoritmo VaxiJen, foi indicada a presença de 791 proteínas com potencial antigênico, e destas, 176 são associadas a membrana de intestino. Peptídeos sintéticos foram desenvolvidos a partir de domínios antigênicos destas proteínas e utilizados como antígeno em ELISA. De 25 peptídeos testados, três foram reconhecidos por soro contendo anticorpos policlonais produzidos em camundongos imunizados com extrato de intestino de *R. microplus*, sendo prováveis candidatos à vacina.

Uma proteína ribossomal, chamada de P0, foi clonada e sequenciada de *R. microplus* e *R. sanguineus*. O alinhamento entre elas mostrou 99% de identidade com a P0 de *R. appendiculatus*. Análises de bioinformática levaram a um peptídeo pertencente a um domínio de baixa hidrofobicidade, assim, com grande probabilidade de ser exposta à superfície proteica. Ademais, esta região foi caracterizada como potencial ligante à epítomos de células B. Este domínio foi sintetizado em forma de um peptídeo, que foi conjugado ao *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH). Este antígeno foi eficaz em 90% contra *R. sanguineus* alimentado em coelho (RODRIGUEZ-MALLON et al., 2012).

Apesar de existirem diversas substâncias químicas acaricidas, carrapatos continuam sendo um problema à saúde e produção animal, por causarem prejuízos econômicos tanto para os animais quanto para os criadores, e ainda são um problema para saúde pública disseminando zoonoses. Vacinas existem, mas ainda são pouco usuais, e pesquisas se direcionam no entendimento da relação parasito-hospedeiro para a busca de novos antígenos. Com a evolução da biotecnologia, biologia molecular e bioinformática, cada vez mais dados são coletados em grandes volumes e são processados de maneira simultânea. Os projetos genomas e transcriptomas permitem elucidar os antígenos e receptores de antígenos no sistema imune, e, juntamente com a bioinformática, é possível simular por meio de computadores a interação destes sistemas, prevendo com mais agilidade quais antígenos que são mais prováveis de desencadear resposta imune eficaz. Portanto, pesquisas e ensaios de vacinações em busca de novos antígenos serão cada vez menos necessários, e serão direcionados apenas para validar antígenos já desenvolvidos.

Com intuito de validar este sistema para o desenvolvimento de vacina contra carrapatos, este projeto teve como foco utilizar a vacinologia reversa para buscar novos antígenos candidatos à vacina. Apesar de o peptídeo em questão ter sido desenvolvido com base na proteína ATAQ de *R. microplus*, foi testado sua eficácia em *R. sanguineus*, pois este se desenvolve bem em coelhos, que é um modelo animal de fácil acesso para este estudo. No entanto, a proteína ATAQ ainda não foi descrita nesta espécie, porém possui alta identidade entre todas as espécies pelas quais esta proteína foi pesquisada do gênero *Rhipicephalus*. Além disso, esta proteína está presente também em outros gêneros de carrapatos como *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Hyalomma*, que são mais distantes

filogeneticamente do *R. microplus* do que o *R. sanguineus*, o que nos faz crer que a probabilidade de o *R. sanguineus* expressar esta proteína é muito grande.

REFERÊNCIAS

- ADU-BOBIE, J.; CAPECCHI, B.; SERRUTO, D.; RAPPOULI, R.; PIZZA, M. Two years into reverse vaccinology. **Vaccine**, v. 21, p. 605-610, 2003.
- 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. 35-40, 1986.
- ALMAZÁN C.; MORENO-CANTÚ, O.; MORENO-CID, J. A.; GALINDO, R. C.; CANALES, M. VILLAR, M. DE LA FUENTE, J. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. **Vaccine**, v. 30, p. 265-272, 2012.
- ALMEIDA, R. F. C.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; MATIAS, J.; E SILVA, E. A.; DE FATIMA CEPA MATOS, M.; ANDREOTTI, R. Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 60, n. 1, p. 63-72, 2013.
- 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. Anais. **Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, 242 p., 1992.
- 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**, 4 p., 1983.
- ANATRIELLO, E.; RIBEIRO, J. M. C.; MIRANDA-SANTOS, I. K. F.; BRANDÃO, L. G.; ANDERSON, J. M. VALENZUELA, J. G.; MARUYAM, S. R.; SILVA, J. S.; FERREIRA, B. R. An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 540, 2010.
- 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, p. 93-8, 2008.
- ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K. C.; SASAKI, S. D.; SAMPAIO, C. A. M.; TANAKA, A. S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 557-563, 2002.
- ARTHUR, D. R. **Ticks. A monograph of the Ixodoidea. On the genera Dermacentor, Anocentor, Cosmiomma, Boophilus and Margaropus**. London: Cambridge University Press, 374 p., 1960.
- ARTHUR, D. R. Feeding in ectoparasitic acari with special reference to tick. **Advances in Parasitology**, v. 3, p. 249-298, 1965.
- AZHAHIANAMBI P.; RAY, D. D.; CHAUDHURI, P.; GUPTA, R.; GHOSH, S. Vaccine efficacy of Bm86 ortholog of *H. a. anatolicum*, rHaa86 expressed in prokaryotic expression system. **Parasitology Research**, v. 2009; p. 7, 2009.

- AZZOLINI, S. S.; SASAKI, S. D.; TORQUATO, R. J. S.; ANDEOTTI, R.; ANDREOTTI, E.; TANAKA, A. S. *Rhipicephalus sanguineus* trypsin inhibitors present in the tick larvae: isolation, characterization, and partial primary structure determination. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, p. 176-182, 2003.
- BALASHOV, Y. S. Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. **Annual Reviews**, v. 29, p. 137-156, 1984.
- BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; MUKAI, L. S.; ROSA, P. C. S. Immunization of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unfed adult tick extracts. **Veterinary Parasitology**, v. 52, 79-80, 1994.
- BENNET, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). II. Influences of temperature, humidity and light. **Acarologia**, v. 16, p. 250-257, 1974.
- BROWN, S. J.; ASKENASE, P. W. *Amblyomma americanum*: Requirement for host Fc receptors in antibody-mediated acquired immune resistance to ticks. **Experimental Parasitology**, v. 59, p. 248-256, 1985.
- BRUM, J. G. W. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* (Grimont et al., 1981): etiopatogenia e sazonalidade. 95 f. **Tese de Doutorado em Parasitologia - Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, 1988.
- CANALES M.; MORENO-CID, J. A.; ALMAZÁN, C.; VILLAR, M.; DE LA FUENTE, J. Bioprocess design and economics of recombinant Bm86/Bm95 antigen production for anti-tick vaccines. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 79-90, 2010.
- CANALES M.; ENRÍQUEZ, A.; RAMOS, E.; CABRERA, D.; DNDIE, H.; SOTO, A.; FALCÓN, V.; RODRÍGUEZ, M.; DE LA FUENTE, J. Large-scale production in *Pichia pastoris* of recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. **Vaccine**; v. 15, n. 4, p. 414-422, 1997.
- COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A., FUJIWARA, R. T., BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M., 2005. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 149-155, 2005.
- CUNHA, R.C.; PÉREZ DE LEÓN, A. A.; LEIE, F. P. L.; PINTO, L. S.; SANTOS JÚNIOR, A. G.; ANDREOTTI, R. 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.
- CUNHA R C; ANDREOTTI R; LEITE F P L. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: expression and characterization of Bm86-CG in *Pichia pastoris*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 103-110, 2011.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**. v. 152, p. 173-185, 2008.

- DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.
- DE CASTRO, J. J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 77-97, 1997.
- DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; CANALES, M.; DE LA LASTRA, J. M. P.; KOCAN, K. M.; WILLADSEN, P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestation on cattle. **Animal Health Research Review**, v. 8, n. 1, p. 23-28, 2007.
- DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 275-283, 2006.
- DE LA FUENTE, J. RODRÍGUEZ, M.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; GARCÍA-GARCÍA, J. C.; MÉNDES, L.; SERRANO, E.; VALDÉS, M. ENRIQUEZ, A.; 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.
- 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**, v. 9, p. 449-454, 1979.
- ENGRACIA FILHO, J. R.; BECHARA, G. H.; TEODORO, R. L. Dermal mast cell counts in F2 Holstein x Gir crossbred cattle artificially infested with the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1081, p. 476-478, 2006.
- ESTRADA-PEÑA, A. Etude de la résistance de la tique brune du chien, *Rhipicephalus sanguineus* aux acaricides. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 156, p. 67-69, 2005.
- ESTRADA-PEÑA, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodidea with special reference to pathogen transmission. **Experimental and Applied Acarology**, v. 23, p. 685-715, 1999.
- 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**; p. 80:443-45, 1987.
- FARIAS, N. A. R. **Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina**. Guaíba: Agropecuária, 80 p., 1995.
- FERREIRA, B. R.; MACHADO R. Z.; BECHARA, G. H. Western-blot analysis of tick antigens from a *Rhipicephalus sanguineus* unfed larval extract and identification of antigenic sites in tick sections between resistant and susceptible host species. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 161-174, 1996.
- FREEMAN, J. M.; DAVEY, R. B.; KAPPMAYER, L. S.; KAMMLAH, D. M.; OLAFSON, P. U. Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 101, 2010.
- FURLONG, J. Carrapato: problemas e soluções. Juiz de Fora-MG. EMBRAPA Gado de leite, 65p., 2005.

- GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J.; MOCHI, D. A.; SIMI, L. D.; CARVALHO, W. M.; TSURUTA, S. A.; BARBOSA, J. C. Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 267-273, 2011.
- GARRIS, G. I. Control of ticks. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, p. 173-183, 1991.
- GOMES, A. Dinâmica populacional de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1987) (Acari: ixodidae) em bovinos nelore (*Bos indicus*) e cruzamentos em infestações experimentais. **Tese de Doutorado em Parasitologia – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, 120 f., 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., 235 p., 1995.
- GRISI, L. et al. Impacto das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 125, p. 8-10, 2002.
- GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, RENFU, S.; BARKER, S. The argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari:Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, p. 1-28, 2010.
- HEWESTON, R. W. Resistance by cattle to cattle tick *Boophilus microplus* III. The development of resistance to experimental infestations by purebred sahival and australian illawara shortorn cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.22, p. 331-342, 1971.
- HITCHCOCK, L. F. Studies on the parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). **Australian Journal of Zoology**, v. 3, p. 145-155, 1955.
- HOOGSTRAAL, H. African Ixodidae. I. Ticks of the Sudan (with Special Reference to Equatoria Province and with Preliminary Reviews of the Genera *Boophilus*, *Margaropus*, and *Hyalomma*. **Research report NM 050.29.07 of the Bureau of Medicine and Surgery**, c.1, p. 1-1105, 1956.
- HORN, S. C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, 29 p., 1983.
- JAWORSKI, D.C.; ROSELL, R.; COONS, L. B.; NEEDHAM, G. R. Tick (Acari: Ixodidae) attachment cement and salivary gland cells contain similar immunoreactive polypeptides. **Journal of Medical Entomology**, v. 29, p. 305-309, 1992.
- KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, 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**; p. 119-167, 1982.
- KEMP, D.H.; AGBEDE, R. I. S.; JOHNSTON, L. A. Y.; GOUGH, J. M. 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.
- KOCH, H. G.; TUCK, M. D. Molting and survival of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) under different temperatures and humidities. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 79, p. 11-14, 1986.
- KOCH, H. G. Oviposition of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) in laboratory. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 75, p. 583-586, 1982.
- KOPP, N.; DIAZ, D.; AMACKER, M.; ODONGO, D. O.; BEIER, K.; NITSCH, C.; BISHOP, R. P.; DAUBENBERGER, C. A. Identification of a synthetic peptide inducing cross-reactive antibodies binding to *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Rhipicephalus appendiculatus* Bm86 homologues. **Vaccine**, v. 28, p. 261-269, 2010.
- 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**, v. 38, p. 321-340, 1975.
- 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, p. 179-187, 2012.
- MARTINS, T.F.; VENZAL, J.M.; TERASSINI, F.A.; COSTA, F.B.; MARCILI, A.; CAMARGO, L.M.A.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 62, n. 1, p. 121-128, 2013.
- MERINO, O.; ALMAZÁN, C.; CANALES, M.; VILLAR, M.; MORENO-CID, J. A.; GALINDO, R. C.; DE LA FUENTE, J. Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. **Vaccine**, v. 29, p. 8575-8579, 2011.
- MERJI, N.; BROSSARD, M. Splenic dendritic cells pulsed with *Ixodes ricinus* tick saliva prime naïve CD4+T to induce Th2 cell differentiation *in vitro* and *in vivo*. **International Immunology**, v. 19, n. 4, p. 535-543, 2007.
- MEDEIROS, C. L.; MENDONÇA, B. G.; TAVARES, L. C.; GIRÃO, F. A.; SOSSAI, S.; PECONICK, A. P.; CAVALHO, G. D.; PATARROYO, J. H. Elaboração e avaliação de um candidato à vacina de DNA utilizando-se genes sintéticos derivados do peptídeo SBm7462 contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, supl. 1, p. 30-34, 2008.
- MOREL, P. C.; VASSILIADES, G. Les *Rhipicephalus* du groupe sanguineus: especes africaines (Acariens: Ixodidae). **Revue d'Elevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, v. 15 p. 343-386, 1963.

- NIJHOF, A. M.; BALK, J. A.; POSTIGO, M.; RHEBERGEN, A. M.; TAOUFIK, A.; JONGEJAN, F. Bm86 homologues and novel ATAQ proteins with multiple epidermal growth factor (EGF)-like domains from hard and soft ticks. **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 1587-1597, 2010.
- NUÑES, J. L.; MUÑOZ COBENAS, M. E.; MOLTEDO, H. L. **Boophilus microplus, la garrapata comun del ganado vacuno**, Buenos Aires: Hemisfério Sur., 19 p., 1982.
- NUTTAL, P. A.; TRIMNELL, A. R.; KAZIMIROVA, M.; LABUDA, M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 155-163, 2006.
- OTRANTO, D.; LIA, R. P.; CANTACESSI, C.; GALLI, G.; PARADIES, P.; MALLIA, E.; CAPELLI, G. Efficacy of a combination of imidacloprid 10%/permethrin 50% versus fipronil 10%/(S)-methoprene 12%, against ticks in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 293-304, 2005.
- PATARROYO, J. H.; PORTELA, R. W.; DE CASTRO, R. O.; PIMENTEL, J. C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; VARGAS, M. I.; PRATES, A. A.; MENDES, M. A. D. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, p. 163-172, 2002.
- PÉREZ-PÉREZ, D. BECHARA, G. H.; MACHADO, R. Z.; ANDRADE, G. M. DEL VECCHIO, PEDROSO, M. S.; HERNÁNDEZ, M. V.; FARNÓS, O. Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 321-326, 2010.
- PEGRAM, R.G.; KEIRANS, J. E.; CLIFFORD, C. M.; WALKER, J. B. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea). II *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. **Systematic Parasitology**, v. 10, p. 27-44, 1987.
- PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência**. MedVet, São Paulo, 2008.
- PETROVA-PIONTKOVSKAY, S. P. Comparative data on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* Latr. And *Rhipicephalus turanicus* Pom. under laboratory conditions. **Zoologicheskii Zhurnal**, v. 25, p. 173-176, 1947.
- RAND, K. N.; MOORE, T.; SRISKANTHA, A.; SPRING, K.; TELLAM, R.; WILLADSEN, P.; COBON, G. S. 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.
- RAPPOULI, R. Reverse vaccinology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 445-450, 2000.
- RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. VI. Resistance of cattle to infestations with the tick *Boophilus microplus*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 13, p. 532-550, 1962.
- 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**, v. 54, p. 657-662, 1968.
- RODRIGUEZ, M. PENICHER, M. L.; MOURIS, A. E.; LABARTA, V.; LUACES, L. L.; RUBIERA, R.; CORDOVÉS, C.; SÁNCHEZ, P. A.; RAMOS, E.; 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, 1995.
- RODRIGUEZ, 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**, v. 33, p. 135-146, 1994.
- RODRIGUEZ-MALLON, A.; FERNÁNDEZ, E.; ENCINOSA, P.; BELLO, Y.; MÉNDEZ-PÉREZ, L.; RUIZ, L. C.; PÉREZ, D.; GONZÁLEZ, M.; GARAY, H.; et al. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Vaccine**, v. 30, p. 1782-1789, 2012.
- ROVERSI, P.; LISSINA, O.; JOHNSON, S; AHMAT, N.; PAESEN, G. C.; PLOSS, K; BOLAND, W. The structure of OMCI, a novel lipocalin inhibitor of the Complement System. **Journal of Molecular Biology**. v. 369, p. 784-793. 2007.
- SITTE, K.; BRINKWIRTH, R.; EAST, I. J.; JAZWINSKA, E. C. A single amino acid deletion in the antigen binding site of BoLA-DRB3 is predicted to affect peptide binding. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 85, p. 129-135, 2002.
- SONENSHIME, D. E. **Biologia of ticks**. New York: Oxford University Press, 316 p., 1993.
- SOSSAI, S.; PECONICK, A. P.; SALES-JUNIOR, P. A.; MARCELINO, F. C.; VARGAS, M. I.; NEVES, E. S.; PATARROYO, J. H. Polymorphism of the Bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 37, p. 199-214, 2005.
- SUTHERST, R. W.; JONES, R. J.; SCHNITZERLING, H. J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, v. 295, p. 320-321, 1982.
- SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. **Experimental and Applied Acarology**, v. 23, p. 915-928, 1999.
- SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H. Immunization of dogs and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* ticks using gut extract. **Veterinary Parasitology**, v. 68, p. 283-294, 1997.
- TATCHELL, R. J.; CARNELL, R.; KEMP, D. H. Electrical studies on the feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Zeitschrift fuer Parasitenkunde**, v. 38, p. 32-44, 1972.
- VARGAS, M.; MONTERO, C.; SÁNCHEZ, D.; PÉREZ, D.; VALDÉS, M.; ALFONSO, A.; JOGLAR, M.; MACHADO, H.; RODRÍGUEZ, E.; et al. Two initial vaccinations with the Bm86-based GavacPLUS vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. **Veterinary Research**, v. 6, p. 43, 2010.

- VAZ JÚNIOR, I. S. Caracterização de proteínas de *Boophilus microplus* como imunógeno em vacina contra o carrapato. 95 f. **Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 1997
- VERONEZ, V. A.; ZANOLLI, B. F.; OLEGARIO, M. M. M.; CARVALHO, W. M.; TOLESANO, G. V.; THORGA, K.; GARCIA, M. V.; SZABO, M. P. J. Ticks (Acari: Ixodidae) within various phytophysiognomies of a Cerrado reserve in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Experimental Applied Acarology**, v. 50, n. 2, p. 169–179, 2010.
- VONDERMEIER, M.; WHELAN, A. O.; HEWINSON, R. G. Recognition of mycobacterial epitopes by T Cells across mammalian species and use of a program that predicts human HLA-DR binding peptides to predict bovine epitopes. **Infection and Immunity**, p. 1980-1987, 2003.
- 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**, v. 29, p. 401-409, 1978.
- 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. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 209-222, 1997.
- 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.
- YU, D.; LIANG, J.; YU, H.; WU, H.; XU, C.; LIU, J.; LAI, R. A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, *Hyalomma asiaticum asiaticum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, p. 585-590, 2006.

ARTIGO CIENTÍFICO GERADO PELA PESQUISA

AVALIAÇÃO DE RESPOSTA IMUNE A PEPTÍDEO SINTÉTICO DESENVOLVIDO POR VACINOLOGIA REVERSA E CÁLCULO DE EFICÁCIA PARA CARRAPATOS HETEROXENOS

Immune Response to Synthetic Peptide Designed by Reverse Vaccinology and its Efficacy Calculation against Heteroxen Ticks

André de Abreu Rangel Aguirre¹; Francisco Pereira Lobo²; Rodrigo Casquero Cunha¹; Marcos Valério Garcia³; Renato Andreotti³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Informática Agropecuária, Campinas, SP, Brasil

³Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Sanidade Animal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil

Correspondência: Laboratório de Sanidade Animal, Embrapa Gado de Corte, Av. Radio Maia, 830, Vila Popular, Campo Grande, MS, Brasil e-mail: andreaguirrevet@hotmail.com

Abstract

Tick infestation may cause several problems on domestic animal health, reducing the production of meat and milk, among others. Ticks can become resistant to acaricides, because of this, started researches for alternative measures, such as vaccines against ticks. The commercially available vaccines aim of produce immunity on host against the tick gut, so these vaccines are composed of gut antigens. Reverse vaccinology approaches have being showing positive results in new generation of vaccines, on this basis, a synthetic peptide from ATAQ protein, which is present in the intestines and Malpighi tubes of *Rhipicephalus microplus* was designed and synthesized. The ATAQ protein was isolated, characterized and sequenced from several species of the genus *Rhipicephalus*. Our alignment showed 93,3% of

identity between ATAQs from these species. Because of this, immunization trials with this peptide were conducted on cattle, mouse and rabbits, to evaluate immune response by antibodies. Furthermore, we check its effectiveness against the dog tick, *R. sanguineus*, specie from which this protein has not been studied. These results conclude that peptides are haptens by itself and incapable of being recognized by the immune system, needing carriers or adjuvants for helping its presentation.

Keywords: ATAQ, immunization, rabbits, *R. sanguineus* and synthetic peptide.

Resumo

Infestações por carrapatos podem causar muitos problemas à saúde de animais domésticos, redução na produção de carne e leite, entre outros. Carrapatos vêm desenvolvendo resistência a acaricidas, e por conta disso iniciaram-se pesquisas por medidas alternativas para seu controle, como vacinas. As vacinas comerciais visam estimular imunidade no hospedeiro contra células do intestino do carrapato, portanto estas vacinas são compostas por antígenos deste órgão. O uso da vacinologia reversa vem mostrando resultados favoráveis para a nova geração de vacinas. Com base nisso, foi selecionado e desenvolvido um peptídeo sintético derivado da proteína ATAQ, a qual está presente em intestino e túbulos de Malpighi de *Rhipicephalus microplus*. A proteína ATAQ foi isolada, caracterizada e sequenciada a partir do DNA de diversas espécies de carrapato do gênero *Rhipicephalus*. Foi então realizado um alinhamento destas proteínas que mostrou 93,3% de identidade entre as espécies estudadas. Assim, foram conduzidos ensaios de imunização em bovinos, camundongos e coelhos com esse peptídeo, para avaliar a indução resposta humoral nestas espécies. Como o *R. sanguineus* se desenvolve bem em coelhos, e a proteína ATAQ a não foi relatada nesta espécie de carrapato, sua eficácia foi testada. O resultado deste estudo mostrou que peptídeos por si só se comportam como haptenos e incapazes de serem reconhecidos pelo sistema imune, necessitando de carreadores ou adjuvantes para auxiliar sua apresentação.

Palavras-Chave: ATAQ, imunização, coelhos, *R. sanguineus* e peptídeo sintético.

Introdução

Rhipicephalus microplus, ou carrapato do boi, é um ectoparasito de bovinos. Está presente nas áreas tropicais e subtropicais, sendo responsável por grandes perdas econômicas (WILLADSEN; JONGEJAN, 1999). O controle de carrapatos tem sido feito principalmente por aplicação de acaricidas, o que resultou na seleção de carrapatos resistentes a eles e contribuiu para a poluição ambiental (DE LA FUENTE; KOCAN, 2006).

Por conta destes problemas citados, iniciaram-se pesquisas por medidas alternativas, o uso de vacina contra o carrapato tem sido muito estudado. O principal antígeno vacinal utilizados em vacinas contra o *R. microplus* é a proteína Bm86 (WILLADSEN; KEMP, 1988; WILLADSEN et al., 1988; WILLADSEN et al., 1989). A Bm86 é uma glicoproteína localizada predominantemente na membrana de células do intestino do carrapato (GOUGH; KEMP, 1993). É uma glicoproteína ligada à membrana de células do epitélio do intestino presente em baixa quantidade em extratos de fêmeas adultas parcialmente ingurgitadas, o que indica ser um bom candidato à vacina, uma vez que os anticorpos do hospedeiro podem ter acesso a este antígeno (WILLADSEN et al., 1989), e também porque, estas células provavelmente estão envolvidas no mecanismo de endocitose (RIDING et al., 1994).

Esta proteína é a base da formulação das vacinas comerciais TickGARD e GavacTM (RODRIGUEZ et al., 1995; DE LA FUENTE et al., 2007). Várias vacinas já foram formuladas com a Bm86 recombinante (DE LA FUENTE et al., 1999; PATARROYO et al., 2002; RAND et al., 1989; RODRIGUEZ et al., 1995), porém, com eficácias variáveis contra cepas de carrapato bovino encontradas em diferentes áreas geográficas, que podem ser devido a variações alélicas naturalmente presentes no gene da Bm86 (DE LA FUENTE; KOCAN, 2006). Diferenças nas sequências de aminoácidos superiores a 3,4% entre Bm86 e Bm86-CG seriam suficientes para conferir ineficiência na vacinação contra cepas de carrapatos diferentes (GARCIA-GARCIA et al., 1999).

A eficácia dessas vacinas em *Stall test* com isolados regionais de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi de 46,4% e 49,2%, respectivamente (ANDREOTTI, 2006). Este percentual encontrado está abaixo do que foi demonstrado em diferentes regiões mundiais (DE LA FUENTE et al., 1999, PATARROYO et al., 2002; RAND, et al., 1989, RICHARDSON et al., 1993). Há duas diferenças na sequência da Bm86-CG em regiões hidrofóbicas que têm grande potencial para interferir na dinâmica do reconhecimento de

anticorpos, o que poderia justificar a baixa eficácia observada da GavacTM em proteger o gado criado na região de Campo Grande contra a infestação por *R. microplus* isolados da mesma região (ANDREOTTI, 2006).

Em virtude dos últimos relatos sobre deficiência na eficácia das vacinas comerciais em diferentes cepas de *R. microplus*, a busca por novos antígenos vem sendo estimulada nos últimos anos. Diversas estratégias de ação imunológica no parasita resultaram em estudos em diversos antígenos como: inibidores de tripsina (BmTIs), subolesina, aquirina, calicreína, inibidore de elastase, ATAQ, RNA de interferência e peptídeos desenvolvidos por vacinologia reversa na era pós-genômica (TANAKA et al., 1999; DE LA FUENTE et al., 2005; SASAKI; TANAKA, 2008; NIJHOF et al, 2010; PRUDENCIO et al., 2010; ANDREOTTI et al., 2012; CARREÓN et al., 2012).

A vacinologia reversa consiste no método mais moderno para a detecção de potenciais candidatos a vacinas, a qual surgiu há pouco mais de uma década. A novidade dessa metodologia é a identificação e seleção do antígeno com mais agilidade antes de testar em animais. Tal seleção ocorre graças ao surgimento das ferramentas de bioinformática que processam uma grande quantidade de dados resultantes da era pós-genômica. Assim é possível identificar quais proteínas e seus domínios são expressos em localização extracelular, ancoradas à membrana plasmática e reconhecidos pelos complexos maiores de histocompatibilidade (MHC) das células apresentadoras de antígeno (APCs), objetivando a seleção de antígenos e reduzindo testes desnecessários. Agentes causadores de doenças graves, que até então não possuíam meio de controle eficaz, e caminhavam vagarosamente no caminho das vacinas, passaram a ter um avanço muito grande nesta área, como a meningite B, assim como para malária, tuberculose, sífilis e hepatite C (RAPPOULI 2000; ADU-BOBIE et al., 2003).

Algoritmos permitem avaliar propriedades de proteínas, como a capacidade antigênica, estrutura secundária, e propriedades de hidrofiliidade e hidrofobicidade. Assim a fizeram com a glicoproteína Bm86, chegando a um domínio específico, um peptídeo denominado Bm7462, que obteve eficácia de 81,05% contra *Rhipicephalus microplus* (PATARROYO et al., 2002).

Maritz-Olivier et al. (2012) realizaram o transcriptoma do *R. microplus*. Assim, com todos os RNAm sequenciados, utilizaram o algoritmo VaxiJen para analisar propriedades

das proteínas e chegaram a 25 peptídeos com grandes propriedades antigênicas. Destes, três foram reconhecidos por soro contendo anticorpos policlonais anti-extrato de intestino através de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*.

Com base nos estudos de reação cruzada na vacinação de Bm86 contra outras proteínas ortólogas de diversas espécies de carrapatos (PEREZ-PEREZ et al, 2010), KOPP et al. (2010) utilizaram um peptídeo sintético derivado da Bd86 de *R. decoloratus* para produção de anticorpos em camundongos, e demonstraram que houve ligação destes anticorpos em intestinos de outras espécies do gênero *Rhipicephalus*. Cães, quando vacinados com Bm86, de *R. microplus*, desenvolvem alguma resistência à *R. sanguineus*, confirmando assim a reação cruzada entre anticorpos anti-Bm86 em ortólogas de outras espécies, fato provavelmente causado pela grande identidade entre os diferentes ortólogos de Bm86 (PEREZ-PEREZ et al, 2010).

Uma proteína, denominada ATAQ, similar em estrutura primária e secundária com a Bm86, foi descrita sendo um potencial antígeno, uma vez que é presente além do intestino, também em Túbulos de Malpighi, e por estar presente com mais constância nos diversos ínstares de carrapatos do gênero *Rhipicephalus*, como *R. microplus*, *R. annulatus*, *R. decoloratus* e *R. evertsi* (NIJHOF et al, 2010).

Este trabalho objetivou em caracterizar a resposta imune contra um peptídeo oriundo da proteína ATAQ, de *R. microplus*, detectado como antigênico através do uso da vacinologia reversa, em camundongos, coelhos e bovinos. Pela facilidade de manejo, coelhos foram utilizados também como modelo para um ensaio de eficácia vacinal deste peptídeo contra *R. sanguineus*, espécie que se desenvolve bem neste animal, e provavelmente possui uma ATAQ ortóloga, com base em ensaios anteriores.

Material e Métodos

Colônia de *Rhipicephalus sanguineus*

Fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* foram obtidas de cães mantidos no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), pertencente à Prefeitura Municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS), Brasil, e foram mantidas em estufa com temperatura e umidade relativa

do ar controladas, 28°C e 85% respectivamente, até a oviposição. Após a oviposição, os ovos foram aliquotados e armazenados à estufa até o término da eclosão, nas mesmas condições. A colônia foi mantida em coelhos sem raça definida e sem contato prévio com este carrapato, para obter os três ínstares do carrapato. Todos os procedimentos foram realizados no biotério pertencente ao Departamento de Sanidade Animal, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Brasil.

Animais

Vinte e quatro camundongos, fêmeas, com idade entre 45 e 60 dias, foram utilizados para a análise imunológica com o peptídeo. Estes animais foram obtidos de uma colônia BALB/c que é mantida no biotério do Departamento de Sanidade Animal, Embrapa Gado de Corte. Estes foram mantidos em gaiolas com ventilação individual, com lotação máxima de três camundongos por gaiola, temperatura controlada (22°C), exaustão e sistema de fotoperíodo (12 horas de luz e 12 horas de ausência de luz). Os camundongos foram alimentados com ração comercial e água estéreis *ad libidum*.

Treze coelhos, sem raça definida, fêmeas, com idade entre 12 a 20 semanas, com peso aproximado de dois quilogramas foram adquiridos de um produtor no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração peletizada comercial e água autoclavada *ad libidum* durante todo o experimento. O experimento foi conduzido no biotério do Departamento de Sanidade Animal, da Embrapa Gado de Corte, com temperatura controlada (22°C), exaustão e sistema de fotoperíodo.

Foram utilizados dois bovinos no experimento, sendo um da raça caracu e um da raça nelore, para averiguar se estes produzem imunidade contra o peptídeo. Estes animais se encontraram disponíveis na Embrapa Gado de Corte e foram mantidos em baias, estrutura pertencente à área de Sanidade Animal, Embrapa Gado de Corte. Os animais foram alimentados com silagem de milho e água *ad libidum*.

Os ensaios foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Análises de Bioinformática e Síntese do Peptídeo

Para a detecção de peptídeos imunogênicos na proteína ATAQ, de 605 aminoácidos, de *Rhipicepalus microplus* (número de acesso GenBank: ADR01301.1), visando ensaios sorológicos procedeu-se a busca por possíveis peptídeos imunogênicos através da execução de diversos programas de bioinformática que acrescentam informação sobre a imunogenicidade potencial de um peptídeo visando a resposta imune humoral. Assim, a tarefa de detectar peptídeos potencialmente imunogênicos pode ser definida como trechos de uma proteína que possuem diversas propriedades que aumentam a imunogenicidade de um peptídeo e que possuem poucas ou nenhuma propriedade que diminua a imunogenicidade de um peptídeo. Para a detecção de propriedades que aumentam a probabilidade de imunogenicidade de um peptídeo foram utilizadas as informações de predição de possíveis epítomos lineares de linfócito B (programa bepiped, cutoff de 1.0 para 9 aminoácidos sequenciais), predição de localização extracelular (programas signalp, tmhmm e GPI, cutoff de 0.5 para todos) e predição de regiões intrinsecamente desordenadas (IUPs, programa IUPred, cutoff de 0.3). Para a detecção de propriedades que diminuem a imunogenicidade foi utilizado o programa BLAST para detectar possíveis trechos da proteína ATAQ que possuem alta similaridade com proteínas preditas de *Bos taurus* (e-value menor que 0.5), de modo a evitar possíveis reações cruzadas com proteínas do hospedeiro, bem como trechos intracelulares através do uso do software tmhmm, uma vez que estes trechos estariam menos expostos à resposta imune humoral.

Também foram realizadas análises da proteína ATAQ utilizando os programas e algoritmos já existentes: Geneious Pro 4.8.5 (Biomatters), MHC-II *Binding Predictions*, *Emini Surface Accessibility Scale* e *Bepiped Linear Epitope Prediction* (IEDB Analysis Resource – <http://tools.iedb.org>), ProPred – MHC Class-II *Binding Prediction Server* (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/index.html>) e ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk>) com a finalidade de avaliar regiões antigênicas, apresentação de epítomos de superfície lineares na estrutura terciária e alinhamento com proteínas ortólogas, respectivamente, confirmando assim, através de programas já publicados, as mesmas propriedades que o programa em desenvolvimento acusou.

A região antigênica detectada pela estratégia de vacinologia reversa adotada consistiu em uma sequência peptídica de 17 aminoácidos. Este peptídeo foi então sintetizado pela Mimotopes (Melbourne, Austrália), com a sequência NH₂-PQPPHHQKWPFPTTPMA-COOH. Uma quantidade total de 6 mg de peptídeo liofilizado, foi solubilizado em 600 µL água Milli-Q, para uma concentração final de 10 µg/µL, e mantido em congelador à -18°C até sua utilização nos ensaios imunológicos.

Inoculações em Camundongos

Vinte e quatro camundongos da linhagem BALB/c foram selecionados e divididos em quatro grupos: seis inoculados, com peptídeo somente (P), seis inoculados, via intramuscular, com peptídeo e Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris) (M), seis inoculados, via subcutânea, com peptídeo e adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, Saint Louis) (F) e seis somente tampão fosfato-salino (PBS) (C). O volume final de cada dose foi de 100 µL, contendo 10 µg de peptídeo. Animais do grupo M receberam proporção de adjuvante/antígeno de 60/40 e do grupo F receberam na proporção 50/50, seguindo as recomendações dos fabricantes. Foram administradas três doses, grupos P, M e C via intramuscular e F via subcutânea, com intervalo entre doses de 21 dias. Foi considerado dia 0 (zero) o dia da primeira dose.

Inoculações em Coelhos

Para a preparação da dose vacinal, o peptídeo foi diluído em PBS e foi emulsificado com adjuvante oleoso Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris), na proporção final de 60/40, adjuvante/peptídeo diluído em PBS respectivamente, obtendo-se a dose final de 200 µg/ml, em um total de 500 µL de dose vacinal, sendo 100 µg por coelho. Um total de 13 coelhos, sem raça definida, com idade entre 12 a 20 semanas, foram randomizados em dois grupos, sendo oito para o grupo inoculado com o peptídeo (CI) e cinco inoculados apenas com PBS, como controle (CC). Assim, os animais receberam três doses, por via intramuscular, no quadríceps femoral, com intervalo entre doses de 21 dias. Foi considerado dia 0 (zero) o dia da primeira dose.

Inoculações em Bovinos

Foram selecionados dois bovinos para esta fase, sendo um taurino da raça caracu e um zebuino da raça nelore. Estes animais foram inoculados com 200 µg de peptídeo em volume final de 2 mL, contendo o peptídeo e Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris) na proporção 60/40, para o grupo I, e somente PBS para o grupo C. Foram administradas três doses com intervalo de 21 dias entre as doses, por via intramuscular.

Obtenção de anticorpos policlonais anti-extrato de larva de *R. microplus*

Foi produzido anticorpos policlonais anti-extrato de larva de *R. microplus* em três camundongos BALB/c segundo metodologia descrita por Cunha et al. (2012). Para tal, 8 gramas de larva desta espécie foram resfriadas a -20°C, maceradas com bastão e pistilo, e ao final foi adicionado 8 mililitros de Tris-HCl a 150 mM, pH 7.4. A eluição foi então sonicada com 2 pulsos, com intervalo de 10 segundos, com amplitude de 60%, seguido por 4 pulsos com amplitude de 20% e intervalo de 10 segundos. O fluido sonicado foi filtrado com filtros de 0,22 µm e estocados a -20°C. Cada camundongo recebeu 3 doses deste extrato, por via subcutânea, com intervalo de 21 dias, contendo 100 µg de extrato de larva em 100 µL de dose, as quais constituíram em proporção com adjuvante completo de Freund de 50/50.

Infestação de coelhos com *R. sanguineus*

No dia 63 (21 dias após a última dose vacinal), foi feita tricotomização na região torácica dorsal de cada coelho para a colocação de câmaras, que foram fixadas diretamente na pele 24 horas antes do desafio. Paralelamente, foram feitas alíquotas com aproximadamente 250 larvas, 70 ninfas e dez casais de adultos de *R. sanguineus*, para cada coelho. Cada coelho recebeu essas três alíquotas, todas juntas na mesma câmara, e posteriormente foram fechadas com tampa contendo orifícios. As câmaras foram checadas diariamente, durante 20 dias para avaliar a recuperação dos ínstares ingurgitados. Os distintos ínstares ingurgitados foram recolhidos, pesados e transferidos a recipientes tampados com orifícios e levados à estufa com

28°C e 85% de umidade até a ecdise, oviposição ou eclosão, com finalidade de se avaliar a eficácia do imunógeno nesses diferentes estágios de vida.

Dot Blot

Para a realização destas análises, amostras de soro dos animais foram obtidas semanalmente até 21 dias após a terceira dose vacinal, sendo 100 µL via plexo orbital em camundongos, com pipetas Pasteur, 2 mL via jugular em coelhos e 5 mL via jugular em bovinos. Análises em *Dot Blot* foram utilizadas para verificar se houve resposta imune contra o peptídeo em soro de animais 21 dias após a última dose, em comparação com soros do dia zero. Este ensaio foi baseado em Prudencio et al. (2010), com algumas modificações. Assim, pequenos pedaços de membrana de nitrocelulose (Hybond Nitrocellulose Membrane, Amersham Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) foram adsorvidas com 2 microlitros de peptídeo, contendo 20 µg, e deixados secar. Logo após, as membranas foram incubadas com leite em pó desnatado Mollico (Nestlé) a 5% em PBS-T por 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas três vezes com PBS-T e em seguida, cada pedaço foi incubado por 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente, com seu respectivo soro contendo o anticorpo primário, diluído 300 vezes em PBS-T. Cada pedaço de membrana foi incubado individualmente, comparando-se o *pool* de soro de cada grupo de animais inoculados, citados acima, no dia zero e 21 dias após a terceira dose. As membranas foram novamente lavadas três vezes com PBS-T e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-IgG de camundongo, para o grupos M, F e anti-extrato de larvas, anti-IgG de coelhos, para o grupo CI e anti-IgG de bovinos, para o grupo BI. Estes foram diluídos 2000 vezes em PBS-T. As membranas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos e em seguida lavadas com PBS-T por cinco vezes. A revelação foi feita com todos os pedaços de membrana incubados com DAB diluído em PBS com peróxido de hidrogênio por 1 minuto. Em seguida as membranas foram lavadas com água Milli-Q e deixadas secar.

Cálculo da eficácia do peptídeo em *R. sanguineus*

O cálculo de eficácia foi baseado em Rodríguez-Mallon et al. (2012), para carrapatos trioxenos. Assim, o efeito da eficácia nessa espécie levou em consideração cada estágio de seu ciclo. Foram consideradas para o cálculo as variáveis de número total de carrapatos recuperados, capacidade destes de avançar para o próximo estágio, quantidade de ovos e larvas eclodidas. Estes parâmetros foram avaliados para larvas, ninfas, adultos e ovos. A taxa de eclodibilidade foi calculada da seguinte forma: após 40 dias do início das oviposições as larvas foram congeladas a -18°C. Foi realizada uma amostragem em triplicata da massa de ovos correspondente a cada coelho. As cascas/ovos foram diluídos em água e distribuídos em três fileiras em placas de *Petri*. Com uma lupa e um contador de células, foram contabilizados 100 indivíduos, entre larvas e ovos de cada fileira, estes números foram somados e a partir dele foi feita uma média ponderada da triplicata. O valor final representa a eclodibilidade em percentagem, e este valor é multiplicado pela quantidade de ovos, convertida da razão de 1 grama de ovos correspondente a 20 mil ovos (PEREIRA, 1985).

Cada variável da fórmula foi estabelecida pela razão entre a média do grupo vacinado com a do controle. Todos os parâmetros interrelacionados são multiplicados, obtendo-se três valores: efeito na viabilidade das larvas, ninfas e adultos. Essas três variáveis são somadas para realizar uma média ponderada final. Estas variáveis foram consideradas independentes entre si, e possuem proporções distintas dentro da fórmula. Pelo fato de haverem mais parâmetros de adultos do que de larvas e ninfas para serem avaliados, este foi considerado com peso 2, assim, foi multiplicado pela mesma quantia. O valor final da média ponderada é subtraído de 1 e multiplicado por 100, para obter o valor de redução no ciclo de vida do carrapato heteroxeno em percentagem. Desta forma permite-se determinar a capacidade em diminuir a carga parasitária no ambiente.

A fórmula final obtida foi:

$$E (\%) = 100 \times \{ 1 - [(RL \times VL) + (RN \times VN) + (RA \times VA \times OA \times FE)] / 3 \}$$

onde

RL é o efeito do imunógeno na recuperação de larvas ingurgitadas. Essa variável foi calculada pela razão entre larvas ingurgitadas recuperadas do grupo vacinado (rlv) em relação ao grupo controle (rlc). $RL = (rlv/rlc)$

VL é o efeito na viabilidade das larvas ingurgitadas. Essa variável foi calculada com base na razão do número de larvas recuperadas que sofreram ecdise para ninfas do grupo vacinado (vlv) em relação ao grupo controle (vlc). $VL=(rlv/rlc)$

RN é o efeito do imunógeno na recuperação de ninfas ingurgitadas. Essa variável foi calculada pela razão entre ninfas ingurgitadas recuperadas do grupo vacinado (rnv) em relação ao grupo controle (rnc). $RN=(rnv/rnc)$

VN é o efeito na viabilidade das ninfas ingurgitadas. Essa variável foi calculada com base na razão do número de ninfas recuperadas que sofreram ecdise para adultos do grupo vacinado (vnv) em relação ao grupo controle (vnc). $VN=(rnv/rnc)$

RA é o efeito do imunógeno na recuperação de adultas ingurgitadas. Essa variável foi calculada pela razão entre adultas ingurgitadas recuperadas do grupo vacinado (rav) em relação ao grupo controle (rac). $RA=(rav/rac)$

VA é o efeito na viabilidade das adultas ingurgitadas. Essa variável foi calculada com base na razão do número de adultas recuperadas que foram ábeis a oviporem do grupo vacinado (vav) em relação ao grupo controle (vac). $VA=(rav/rac)$

OA é o efeito do imunógeno na oviposição das fêmeas. Essa variável foi calculada pela razão entre a média de peso da massa de ovos por coelho do grupo vacinado (ewv) comparado com a do grupo controle (ewc). $OA=(ewv/ewc)$.

FE é o efeito do imunógeno na fertilidade dos ovos. Essa variável foi calculada com base na razão entre as percentagens eclodibilidade dos ovos provenientes de fêmeas alimentadas em coelhos do grupo vacinado (hlv) em relação aos do grupo controle (hlc). $FE=(hlv/hlc)$

Análises estatísticas

Foram obtidos no total 18 variáveis: peso total das larvas, ninfas e teleóginas ingurgitadas, total de larvas, ninfas e adultas recuperadas, total de larvas e ninfas que sofreram ecdise para ninfas e adultos respectivamente, total de adultos que iniciaram a oviposição, período de ingurgitamento das larvas, ninfas e adultos, período de incubação para larvas e ninfas realizarem ecdise, e adultos para iniciarem a oviposição, peso total da massa de ovos (convertida em massa de ovos), número total de novas larvas (obtida através da eclodibilidade) e período de incubação para a eclosão dos ovos. Para comparação das médias

de cada parâmetro entre os grupos inoculado (CI) e controle (CC) foi realizado teste-t, para duas variáveis presumindo variâncias diferentes. Foi determinado também um intervalo de confiança de cada grupo a fim de verificar a dispersão dos dados.

Resultados

Caracterização da sequência do peptídeo na proteína ATAQ

Como resultado das análises em busca de domínios antigênicos através da estratégia de vacinologia reversa descrita foi determinado que um peptídeo de 17 aminoácidos, entre os aminoácidos 531 e 548 da proteína ATAQ (Figura 1). O gráfico na Figura 1 indica as regiões que concentram propriedades que aumentam ou diminuem a imunogenicidade. As análises revelaram que a proteína possui em sua porção N-terminal um peptídeo sinal (Figura 1, caixa laranja), seguido de uma longa região extracelular (Figura 1, caixa amarela) que é ancorada à membrana em sua porção C-terminal por uma âncora GPI (Figura 1, losango verde). Ao longo da proteína detectamos três possíveis epítopos de linfócito B, sendo que o que possui maior valor de predição colocaliza-se com uma região de IUPs na região C-terminal da proteína. Ao longo da região extracelular ocorrem diversos trechos com similaridade com proteínas de *Bos taurus* acima do ponto de corte escolhido (0.5), trechos estes localizados especialmente na porção N-terminal, o que responde pela diminuição da curva do gráfico nesta região. O peptídeo de 17 aminoácidos escolhido consiste na interseção entre o epítipo de linfócito B de maior valor de predição e da região de IUP. Adicionalmente, esta região também não contém nenhuma similaridade significativa com proteínas de *B. Taurus*.

O *software* Geneious Pro 4.8.5 (Biomatters) mostrou que há identidade de 93,3% entre genes que codificam ATAQ de *R. microplus* e ATAQs ortólogas no mesmo gênero, e o mesmo programa também permitiu identificar que a região do peptídeo em questão é antigênica (Figuras 2, 3 e 4).

Os algoritmos *Emini Surface Accessibility Scale* e *Bepipred Linear Epitope Prediction* (IEDB Analysis Resource – <http://tools.iedb.org>) mostraram que o domínio pertencente a este peptídeo possui localização externa em relação à estrutura terciária da ATAQ, bem como mostra ser uma região linear (Figuras 5 e 6).

Os algoritmos para predição de afinidade de peptídeos ao MHC classe II de humanos MHC-II *Binding Predictions* (IEDB Analysis Resource – <http://tools.iedb.org>) e MHC Class-II *Binding Prediction Server* (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/index.html>), mostraram nenhuma probabilidade de ligação do peptídeo em questão com os alelos HLA-DBR1*01:01 e HLA-DBR1*03:01 (RODRIGUEZ-VALLE et al., 2013)

A alta identidade genética também reflete na alta identidade entre as proteínas ortólogas, como mostra o resultado de alinhamento no algoritmo ClustalW2 (Figura 7).

Avaliação da produção de anticorpos através de *Dot Blot*

Como resultado das análises em *dot blot*, em todos os grupos não houve indícios de produção de anticorpos contra o peptídeo nas três espécies inoculadas (camundongo, coelho e bovino), tampouco com os adjuvantes testados, como pode ser demonstrado na figura 8.

Avaliação dos parâmetros de ciclo de vida em ínstares alimentados em coelhos imunizados

O *R. sanguineus*, por ser um carrapato que depende de três hospedeiros para realizar seu ciclo de vida, possui parâmetros que são independentes entre larvas, ninfas e adultos. Portanto, foram utilizados os 3 ínstares do carrapato para a avaliação da eficácia. Ao todo, 18 parâmetros foram avaliados, e destes, oito compuseram o cálculo de eficácia. Destes, apenas a variável Total de Larvas Eclodidas apresentou diminuição significativa entre o grupo CI e o grupo CC no teste-t para amostras presumindo variâncias diferentes, unicaudal, com 5% de significância (dados não mostrados). Já o mesmo teste sendo realizado bicaudal não apresentou diferença significativa. Todos os outros 17 parâmetros avaliados não apresentaram diferença significativa entre ambos os grupos.

Cálculo da eficácia vacinal do Peptídeo contra *R. sanguineus*

Com a finalidade de calcular a eficácia do peptídeo como vacina, e propor um modelo definitivo para cálculo de eficácia vacinal em carrapatos trioxenos, foram realizadas modificações na fórmula de Rodríguez-Mallon et al. (2012). A fórmula final para o cálculo consistiu em:

$$E (\%) = 100 \times \{ 1 - [(RL \times VL) + (RN \times VN) + (RA \times VA \times OA \times FE)] / 3 \}$$

Conforme os resultados, o cálculo de eficácia consiste na percentagem de redução entre os parâmetros dos grupos inoculado (CI) e controle (CC). O resultado do cálculo foi de 7,1% de eficácia.

Discussão

Análises *in silico* atualmente fornecem ferramentas que aceleram o processo de identificação de novos antígenos para vacinas, uma vez que o próprio algoritmo faz uma pré-análise do ensaio imunológico, poupando ensaios desnecessários com antígenos que não irão ser eficazes. Porém, são necessários subsequentes ensaios usando proteínas recombinantes ou peptídeos recombinantes ou sintéticos, para não somente validar esta abordagem, mas também para melhorar a predição de novos antígenos candidatos a vacina contra carrapatos por estes algoritmos (MARITZ-OLIVER et al., 2012).

Neste ensaio, foi observado nenhum *pool* de soro dos animais, dentre as três espécies inoculadas, desenvolveu resposta imune humoral contra o peptídeo, nem quando utilizados os distintos adjuvantes por distintas vias de inoculação. Para discutir este assunto, devem ser levados em consideração ao menos três pontos. O primeiro remete a peptídeos se comportarem como haptenos e necessitarem de adjuvantes e carreadores moleculares específicos para apresentá-los ao sistema imune do hospedeiro (BRIAND et al., 1985), apesar de as análises *in silico* mostrarem que este tenha propriedades antigênicas e alta afinidade por receptores do complexo MHC. Este estudo corrobora com resultados obtidos anteriormente, onde peptídeos são tão pequenos que passam despercebidos pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), sendo incapazes de induzirem resposta imune por si mesmo (FRIEDE, et al. 1993). É por este motivo que estudos utilizando peptídeos como antígeno vacinal vêm acompanhados, principalmente, por conjugação a moléculas carreadoras como *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH), ovoalbumina, derivado proteico purificado (PPD) e proteossomas (DE SILVA et al., 1999; PRINZ et al., 2004). Outros sistemas de apresentação de peptídeos têm mostrado resultados interessantes, como o uso deste em liberação por lipossomas, virossomas, adenovírus e o sistema de liberação em fagos (*phage-displayed*) (FRIEDE et al., 1993; TOES et al., 1996; VAN HOUTEN et al., 2006; KOPP et al., 2010).

Alguns destes sistemas já foram utilizados em ensaios vacinais contra carrapatos e mostraram algum efeito. Prudencio et al. (2010) exploraram o sistema *phage-displayed*, assim utilizaram nove clones de fagos apresentando nove distintos peptídeos de proteínas (dados não revelados) de *R. microplus*, como carreadores destes, e utilizaram como antígeno vacinal, associando com adjuvante completo de Freund nas primeiras doses e incompleto nas duas doses de reforço. Como resultado, foi obtido apenas influência no desenvolvimento da teleóquina, que apresentou alterações morfológicas similares a hemorragia (sangue na hemolinfa) e diminuição na ovipostura. Rodríguez-Mallon et al. (2012) construíram um peptídeo sintético derivado da proteína ribossomal P0, de *R. microplus* e *R. sanguineus*, e o conjugaram com o carreador KLH. Este antígeno foi administrado em coelhos utilizando Montanide VG 888 como adjuvante. Foi relatada eficácia de 90% contra *R. sanguineus*.

Por outro lado, Andreotti (2007) selecionou um peptídeo de 29 aminoácidos, com peso molecular de 3,5 kDa, pertencente à região N-terminal da proteína BmTI e utilizou como antígeno para vacinação de bovinos, utilizando apenas saponina como iadjuvante. Este estudo mostrou pico que anticorpos contra o peptídeo começaram a ser produzidos duas semanas após a primeira dose e com pico de produção de anticorpos com três semanas após a terceira dose. Entretanto, diferentemente do peptídeo aqui estudado, esse demonstrou alta afinidade pelo complexo MHC II humano, com os mesmos alelos citados anteriormente. Porém, sua eficácia foi de apenas 18,4% contra *R. microplus*, ainda maior do que os 7,1% obtidos neste estudo.

Outra questão a ser levada em consideração é justamente a ausência de afinidade do domínio peptídico em questão com receptores de MHC-II, como foi mostrado nos resultados utilizando os algoritmos *MHC-II Binding Predictions* e *MHC Class-II Binding Prediction Server*, já validados e disponíveis ao público, contestando a alta afinidade predita pelo programa em desenvolvimento aqui avaliado. Porém, este programa de bioinformática condiz com os já validados em relação à exposição de epítomos em superfície proteica e linearidade destes.

O terceiro ponto é se realmente existe a proteína ATAQ em *R. sanguineus*. Existe uma grande suspeita dessa existência pelo fato de esta proteína estar presente em cinco espécies do gênero *Rhipicephalus*, e possuem grande identidade, porém, nenhum resultado concreto ainda foi encontrado.

O cálculo de eficácia vacinal para *R. microplus* já está bem descrito e esclarecido na literatura (CANALES et al., 1997; FRAGOSO et al., 1998; ANDREOTTI et al., 2006; ANDREOTTI et al., 2007; DE LA FUENTE et al., 2010; PATARROYO et al., 2012). Entretanto, não se pode extrapolar seu uso para um carrapato como o *R. sanguineus*, que por se tratar de um parasita heteroxeno, possui parâmetros de interferência em larvas e ninfas, que não podem ser avaliados no carrapato monoxeno, uma vez que as ecdises são realizadas no hospedeiro.

Existe um modelo proposto para calcular a eficácia vacinal em parasita heteroxeno, que foi descrito por Rodríguez-Mallon et al. (2012). Porém, estes autores desconsideraram a quantidade de ninfas que sofreram ecdise para adultos e utilizaram em duplicidade o número de teleóginas recuperadas em sua fórmula. Além disso, eles utilizaram o elemento multiplicação entre variáveis independentes entre larvas, ninfas e adultos, tornando-as assim dependentes. Portanto, propomos uma modificação para essa fórmula neste trabalho, que leva em consideração variáveis dependentes entre si, consistindo na relação entre a capacidade de cada ínstar conseguir não somente completar seu repasto, mas como sua capacidade em atingir o próximo estágio. No caso de adultos, a interferência de anticorpos na alimentação pode atingir desde a capacidade deste completar o repasto, passando pela capacidade em iniciar a oviposição, completar a oviposição até a eclosão dos ovos, por este motivo que ela possui peso maior em relação às variáveis de larvas e ninfas. Desta forma é realizada uma média ponderada entre variáveis independentes entre larvas, ninfas e adultos/ovos. Assim, propomos a independência entre os parâmetros de larvas, ninfas e adultos, a fim de tornar uma fórmula mais acurada.

Rodríguez-Mallon et al. (2012) avaliaram o desempenho de *R. sanguineus* alimentados em coelhos imunizados com o antígeno Bm86 e um peptídeo recombinante derivado da proteína ribossomal pP0, associado ao modulador de resposta imune celular *Keyhole Limpet Hemocyanin*, e, segundo o cálculo de eficácia descrito, obtiveram 51% e 90% de eficácia respectivamente, para cada antígeno. Quando utilizamos o mesmo cálculo, obtivemos 51% quando comparamos CIXCC, em um peptídeo que não provocou resposta imune. Assim, eficácia fica superestimada, uma vez que omite variáveis como o número de ninfas que atinge a fase adulta, e utiliza variáveis em duplicidade, como o total de adultas recuperadas. Já, utilizando a fórmula aqui proposta obtivemos 7% quando comparamos CIXCC, ou seja,

valores abaixo da fórmula “superestimada” e condizentes com uma vacina que não surtiu eficácia.

Conclusão

Os resultados deste experimento nos permite concluir que este peptídeo por si só não é capaz de produzir resposta imune específica, se comportando como hapteno, portanto havendo a necessidade de se utilizar, além de adjuvantes, carreadores que apresentem de maneira eficiente estes às APCs, e que também modulem a resposta imune visando concluir a estratégia vacinal desejada. Novos estudos precisam ser realizados a fim de utilizar diversas ferramentas de predição de antígenos, diversos peptídeos de proteínas que desempenham distintas funções, objetivando aumentar a eficácia vacinal.

Agradecimentos

À EMBRAPA Gado de Corte, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (FAMEZ/UFMS), ao CNPq (Brasil) e CAPES, pela estrutura oferecida, apoio financeiro e por tornarem possíveis estes ensaios.

REFERÊNCIAS

- ADU-BOBIE J, CAPECCHI B, SERRUTO D, RAPPOULI R, PIZZA M. Two years into reverse vaccinology. *Vaccine* 2003; v. 21:605-610.
- ANDREOTTI R, CUNHA RC, SOARES MA, GUERRERO FD, LEITE FPL, PÉREZ DE LEÓN AA. Protectine immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine* 2012; v. 30:6678-6685.
- 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.
- 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.

- BRIAND JP, MULLER S, VAN REGENMORTEL MHV. Synthetic peptides as antigens: Pitfalls of conjugation methods. *J Immunol Meth* 1985; 78: 59-69.
- CANALES M, ENRIQUEZ A, RAMOS E, CABRERA D, DANDIE H, SOTO A, FALCÓN V, RODRÍGUEZ-VALLE M, DE LA FUENTE J. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. *Vaccine* 1997; 15(4): 414-422.
- CARREÓN D 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(20): 273-279.
- CUNHA RC, PÉREZ DE LEÓN AA, LEIE FPL, PINTO LS, SANTOS JÚNIOR AG, ANDREOTTI R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21(3): 254-262.
- DE LA FUENTE J et al. Identification of protective antigens by RNA interference for control of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Vaccine* 2010; 28:1786-1795.
- DE LA FUENTE J. et al. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestation on cattle. *Anim Health Res Rev* 2007; 8(1): 23-28.
- DE LA FUENTE J, KOCAN KM. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Paras Immunol* 2006; 28: 275-283.
- DE LA FUENTE J, ALMAZÁN C, BLOUIN EF, NARANJO V, KOCAN KM. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitol Res* 2005; 96:137-141.
- DE LA FUENTE JL et al. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.); the experience with the Bm86-based vaccine Gavac™. *Genetic Analysis* 1999; 15 (3):143-148.
- DE SILVA BS, EGODAGE KL, Wilson GS. Purified Protein Derivative (PPD) as an Immunogen Carrier Elicits High Antigen Specificity to Haptens. *Bioconjug Chem* 1999; 10(3):496-501.
- FRAGOSO H, RAD PH, ORTIZ M, RODRÍGUEZ-VALLE M, REDONDO M, HERRERA L, DE LA FUENTE J. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm 86-containing vaccine Gavac™. *Vaccine* 1998; 16(20):1990-1992.
- FRIEDE M, MULLER S, BRIAND JP, VAN REGENMORTEL MHV, SCHUBER F. Induction of immune response against a short synthetic peptide antigen coupled to small neutral liposomes containing monophosphoryl lipid A. *Mol Immunol* 1993; 30(6): 539-547.

- GARCIA-GARCIA JC 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: 883-895.
- 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: 900-907.
- KOPP N, DIAZ D, AMACKER M, ODONGO DO, BEIER K, NITSCH C, BISHOP RP, DAUBENBERGER CA. Identification of a synthetic peptide inducing cross-reactive antibodies binding to *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Rhipicephalus appendiculatus* Bm86 homologues. *Vaccine* 2010; 28(1): 261-269
- MARITZ-OLIVIER C, ZYL WV, STUTZER C. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick-borne Diseases* 2012; 3:179-187.
- NIJHOF AM et al. Bm86 homologues and novel ATAQ proteins with multiple epidermal growth factor (EGF)-like domains from hard and soft ticks. *Int. J. Parasitol* 2010, 40: 1587-1597.
- PATARROYO JH, PORTELA RW, DE CASTRO RO, PIMENTEL C, GUZMAN F, PATARROYO ME, VARGAS MI, PRATES AA, DIAS MENDES MA. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88: 163-172.
- PEREIRA MC. Estudos de numerosos diários médios de ovos de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), em confronto com os pesos médios das massas de tais ovos. *Ver Fac Med Vet Zootec* 1985, 22(1):37-51.
- PEREZ-PEREZ D, BECHARA GH, MACHADO RZ, ANDRADE GM, DEL VECCHIO RE, PEDROSO MS, HERNÁNDEZ MV, FARNÓS O. Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 2010; 167(2-4): 321-326.
- PRINZ DM, SMITHSON SL, WESTERINK M.A. J. Two different methods result in the selection of peptides that induce a protective antibody response to *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J Immunol Meth* 2004; 285: 1-14.

- PRUDENCIO CR, MARRA AOM, CARDOSO R, GOULART LR. Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol* 2010; 172(1-2): 122-131.
- RAND KN, MOORE T, SRISKANTHA A, SPRING K, TELLAM R, WILLADSEN P, COBON GS. 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.
- RAPPOULI R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol* 2000; 3:445-450.
- RICHARDSON MA et al. 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* 1993; 1: 139-147.
- RIDING GA et al. A protective “concealed” antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization and possible function. *J Immunol* 1994; 153: 5158-5166.
- RODRÍGUEZ-MALLON A et al. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine* 2012; 30(10): 1782-1789.
- RODRIGUEZ-VALLE M, MOOLHUIJZEN P, PIPER EK, WEISS O, VANCE M, BELLGARD M, LEW-TABOR A. *Rhipicephalus microplus* lipocalins (LRMs): Genomic identification and analysis of the bovine immune response using in silico predicted B and T cell epitopes. *Int J Parasitol* 2013; 43: 739-752.
- RODRIGUEZ M et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet Parasitol* 1995; 57(4): 339-349.
- SASAKI SD, TANAKA A. S. rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick *Boophilus microplus*, its cloning, expression and biochemical characterization. *Vet Parasitol* 2008; 155: 133-141.
- 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*. *Immunopharmacol* 1999; 45: 171-177.
- TOES REM, OFFRINGA R, BLOM RJJ, MELIEF CJM, KAST WM. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7855-7860.

VAN HOUTEN NE, ZWICK MB, MENENDEZ A, SCOTT JK. Filamentous phage as an immunogenic carrier to elicit focused antibody responses against a synthetic peptide. *Vaccine* 2006; 4(19):4188-200.

WILLADSEN P, KEMP DH. Vaccination with "concealed" antigens for tick control. *Parasitol Today* 1988; 4(7): 196-198.

WILLADSEN P, MCKENNA RV, RIDING GA. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *Int J Parasitol* 1988; 18(2): 183-189.

WILLADSEN P et al. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J Immunol* 1989; 143:1346-1351.

WILLADSEN P, JONGEJAN F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol Today* 2011; 15 (7): 258-62.

Figuras

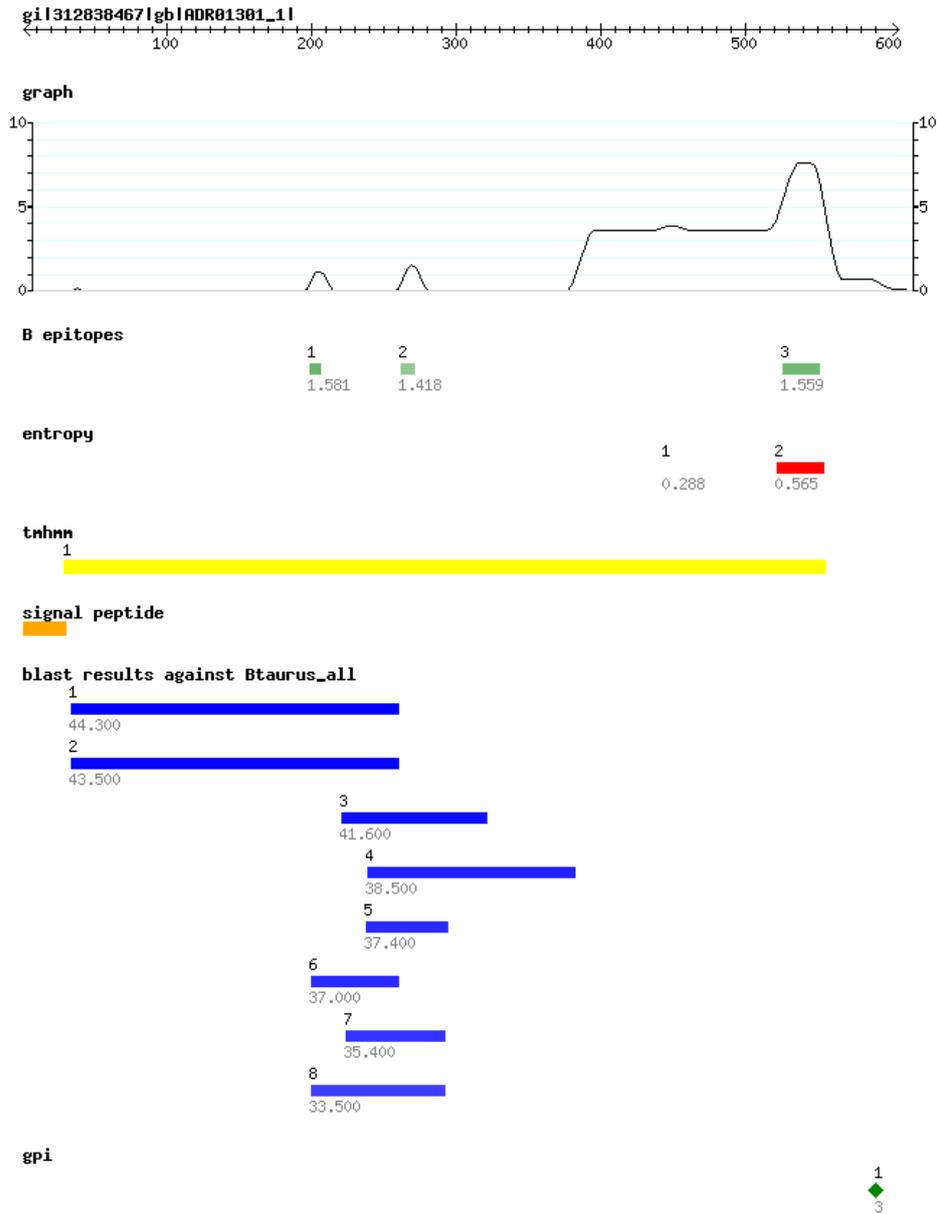


Figura 1. Localização das propriedades previstas na proteína ATAQ de *R. microplus*. As caixas/losango indicam a localização de algum trecho de interesse para a imunogenicidade daquele trecho. Caixas verdes – possíveis epítomos de linfócito B previstos pelo programa bepiped, caixas vermelhas, possíveis trechos intrinsecamente desordenados previstos pelo programa iupred, caixas amarelas – regiões extracelulares previstas pelo programa tmhmm, caixas laranjas – peptídeo sinal previsto pelo programa signalp, caixas azuis – regiões de similaridade com proteínas de *B. taurus*, losango verde – sítio de adição da âncora GPI.

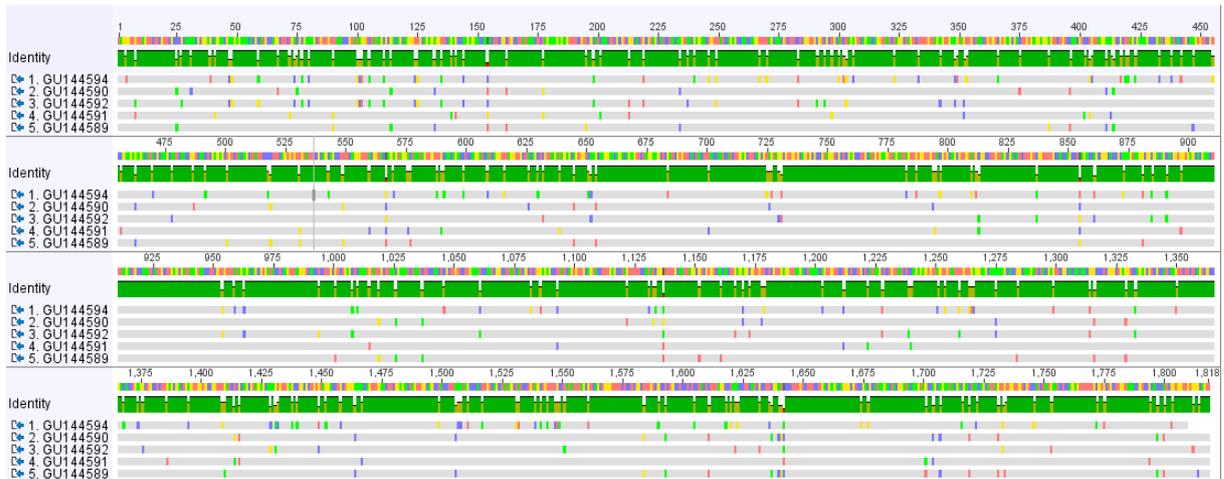


Figura 2. Alinhamento do software Geneious Pro 4.8.5 (Biomatters) entre genes codificadores da proteína ATAQ em: (1) *R. microplus*; (2) *R. annulatus*; (3) *R. decoloratus*; (4) *R. evertsi evertsi*; (5) *R. appendiculatus*. As regiões em verde significam de 100% de homologia.

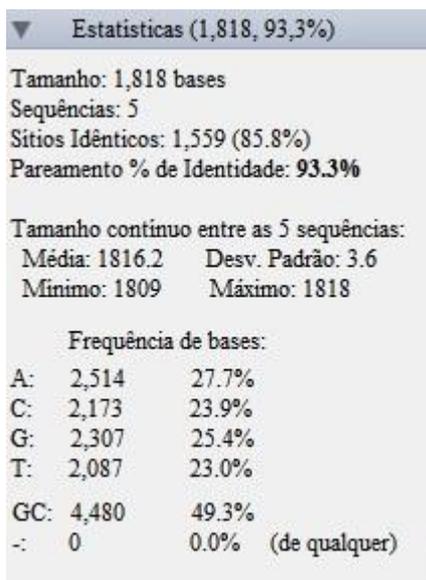


Figura 3. Estatística do alinhamento: referente à Figura 2 mostrou 93,3% de identidade entre as 5 espécies do gênero *Rhipicepalus*

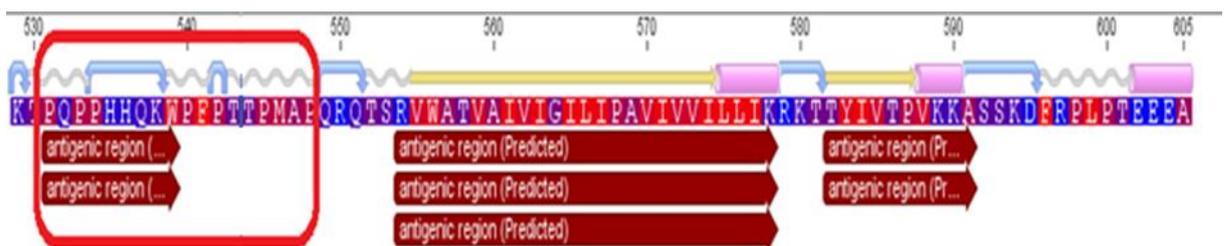


Figura 4. Sequência da proteína ATAQ que corresponde ao peptídeo em questão (circulada): as setas vermelhas indicam antigenicidade. Ademais, apresenta uma região próxima ao N terminal que é mais hidrofóbica (aminoácidos em tons de azul) e uma região próxima ao C terminal mais hidrofílico (aminoácidos em tons de vermelho).

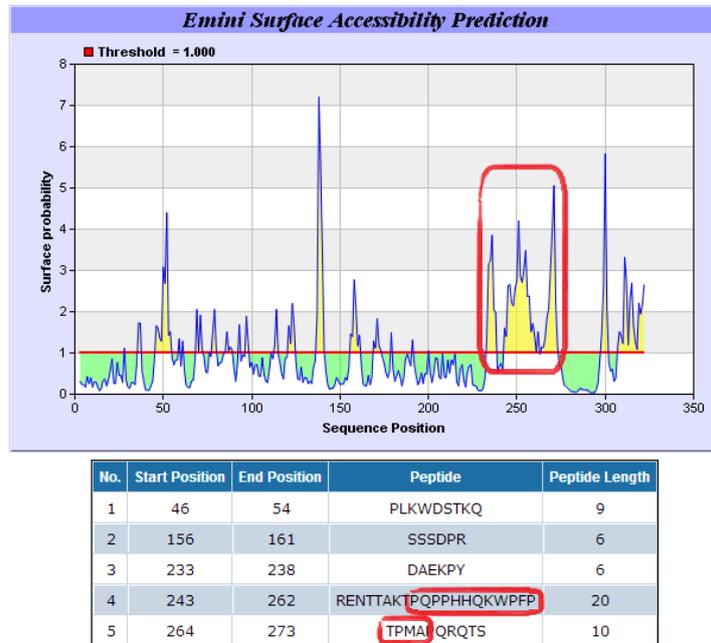


Figura 5. Gráfico de probabilidade de acessibilidade à superfície. Este gráfico mostra a probabilidade de domínios proteicos estarem expostos na superfície, sendo então acessíveis a anticorpos. Desta forma, o algoritmo traça um limiar de probabilidade de regiões externas por uma linha horizontal. Qualquer região do gráfico que estiver acima do limiar traçado possui alta probabilidade de ser exposta na superfície proteica. A região circulada corresponde ao peptídeo sintetizado, assim, este possui alta probabilidade de estar na superfície da proteína ATAQ.

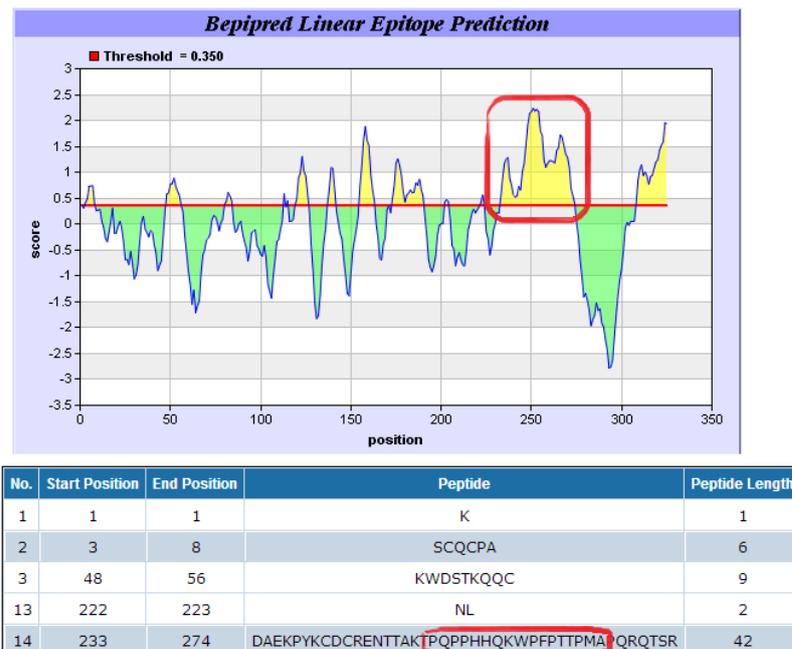


Figura 6. Gráfico de probabilidade de epítomos serem lineares. Este algoritmo analisa a proteína na sua estrutura primária e traça um limiar (linha horizontal) de probabilidade de epítomos serem lineares dentro da estrutura terciária. Toda a região do gráfico que estiver acima do limiar traçado possui alta probabilidade de ser um epítopo linear. A região circulada corresponde à região do peptídeo utilizado neste estudo, obtendo alta

probabilidade deste ser linear, o que significa que uma resposta imune gerada contra o peptídeo, que é linear, pode ser gerada contra esta mesma região na proteína nativa.

```

gi|312838467|gb|ADR01301.1| PNLCPQDCICIPDAEKPYKDCRENTTAKTEQPPHHQKWPFFTFMAEQR 550
gi|312838469|gb|ADR01302.1| PNLCPQDCICIPDAEKPYKDCRENTTAKTEQPPHHQKWPFFTFMAEQR 550
gi|312838471|gb|ADR01303.1| PNLCPQDCICIPDAEKPYKDCRENTTAKTEQPPHHHKWPFFTFPTVIQR 550
gi|312838473|gb|ADR01304.1| PNLCPQDCICIPDAEKPYKDCRENTTAKTEQPPHHHKWPYPTTFPTVSQR 550
gi|312838477|gb|ADR01306.1| PNPYPDLCICEPDVVTISYKCNCRENTTAKTEQPPHHHKWLSLPTTPPVSQR 550
** * **** *. .*****:**********:*. **** .**

```

Figura 7. Alinhamento feito pelo ClustalW2. De cima para baixo, são representadas sequências do domínio onde se encontra o peptídeo (quadrado) de *R. microplus*; *R. annulatus*; *R. decoloratus*; *R. evertsi evertsi* e *R. appendiculatus*, respectivamente. Dentre os 17 aminoácidos, há homologia entre 12, o que resulta em 71% de identidade

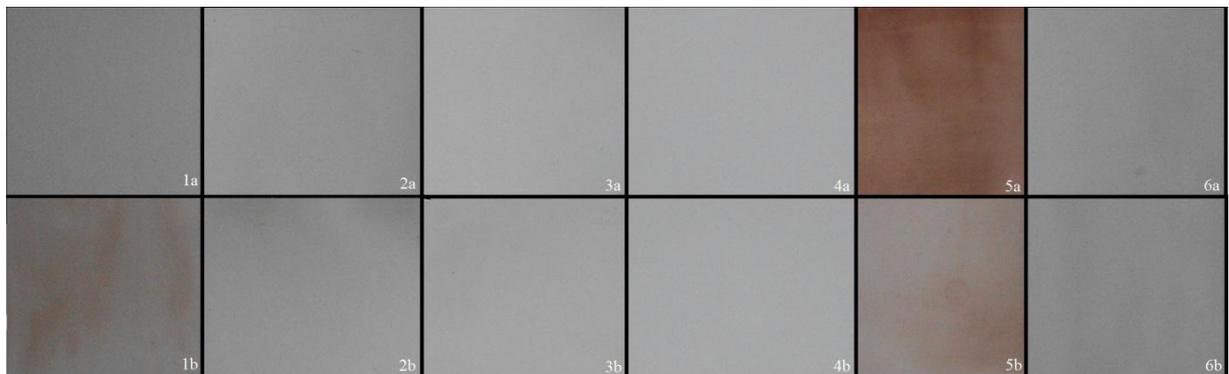


Figura 8. *Dot blot* comparando *pool* de soros dos animais de cada grupo no dia 0 e 21 dias após a terceira dose. 1a – Grupo P dia 0; 1b – Grupo P 21 dias pós 3ª dose; 2a – Grupo M dia 0; 2b – Grupo M 21 dias pós 3ª dose; 3a – Grupo F dia 0; 3b – Grupo F 21 dias pós 3ª dose; 4a – Grupo CI dia 0; 4b – Grupo CI 21 dias pós 3ª dose; 5a – Grupo BI dia 0; 5b – Grupo BI 21 dias pós 3ª dose; 6a – Grupo anti-extrato de larva dia 0; 6b – Grupo anti-extrato de larva 21 dias pós 3ª dose.