

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

MARIA LÚCIA SCHIAFFINO MEDEIROS

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA BYCr
(*Boophilus Yolk pro-Cathepsin*) EXPRESSADA POR VETORES
EUCARIOTOS**

**Porto Alegre
2008**

Maria Lúcia Schiaffino Medeiros

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA BYCr (*Boophilus Yolk pro-Cathepsin*) EXPRESSADA POR VETORES EUCARIOTOS

Dissertação como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr.
Co-orientadora: Dra. Sandra Estrazulas Farias

Porto Alegre
2008

Maria Lúcia Schiaffino Medeiros

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA BYCr (*Boophilus* *Yolk pro-Cathepsin*) EXPRESSADA POR VETORES EUCARIOTOS

Aprovada em 11 de FEV 2008.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio W. Canal
Membro da Comissão

Prof. Dr. Mário Augusto Ono
Membro da Comissão

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul - UFRGS, com apoio financeiro da CAPES, PRONEX, FINEP e FAPERGS.

Reverência ao Destino...

Falar é completamente fácil, quando se tem palavras em mente que expressem sua opinião.

Difícil é expressar por gestos e atitudes o que realmente queremos dizer, o quanto queremos dizer, antes que a pessoa se vá.

Fácil é julgar pessoas que estão sendo expostas pelas circunstâncias.

Difícil é encontrar e refletir sobre os seus erros, ou tentar fazer diferente algo que já fez muito errado.

Fácil é ser colega, fazer companhia a alguém, dizer o que ele deseja ouvir. Difícil é ser amigo para todas as horas e dizer sempre a verdade quando for preciso. E com confiança no que diz.

Fácil é analisar a situação alheia e poder aconselhar sobre esta situação. Difícil é vivenciar esta situação e saber o que fazer. Ou ter coragem pra fazer.

Fácil é demonstrar raiva e impaciência quando algo o deixa irritado.

Difícil é expressar o seu amor a alguém que realmente te conhece, te respeita e te entende. E é assim que perdemos pessoas especiais.

Fácil é mentir aos quatro ventos o que tentamos camuflar. Difícil é mentir para o nosso coração.

Fácil é ver o que queremos enxergar. Difícil é saber que nos iludimos com o que achávamos ter visto. Admitir que nos deixamos levar, mais uma vez, isso é difícil.

Fácil é dizer "oi" ou "como vai?" Difícil é dizer "adeus". Principalmente quando somos culpados pela partida de alguém de nossas vidas...

Fácil é abraçar, apertar as mãos, beijar de olhos fechados. Difícil é sentir a energia que é transmitida. Aquela que toma conta do corpo como uma corrente elétrica quando tocamos a pessoa certa.

Fácil é querer ser amado. Difícil é amar completamente só. Amar de verdade, sem ter medo de viver, sem ter medo do depois. Amar e se entregar. E aprender a dar valor somente a quem te ama.

Fácil é ouvir a música que toca. Difícil é ouvir a sua consciência. Acenando o tempo todo, mostrando nossas escolhas erradas.

Fácil é ditar regras. Difícil é segui-las. Ter a noção exata de nossas próprias vidas, ao invés de ter noção das vidas dos outros.

Fácil é perguntar o que deseja saber. Difícil é estar preparado para escutar esta resposta. Ou querer entender a resposta.

Fácil é chorar ou sorrir quando der vontade. Difícil é sorrir com vontade de chorar ou chorar de rir, de alegria.

Fácil é dar um beijo. Difícil é entregar a alma. Sinceramente, por inteiro.

Fácil é sair com várias pessoas ao longo da vida. Difícil é entender que pouquíssimas delas vão te aceitar como você é e te fazer feliz por inteiro.

Fácil é ocupar um lugar na caderneta telefônica. Difícil é ocupar o coração de alguém. Saber que se é realmente amado.

Fácil é sonhar todas as noites. Difícil é lutar por um sonho.

Eterno, é tudo aquilo que dura uma fração de segundo, mas com tamanha intensidade, que se petrifica, e nenhuma força jamais o resgata.

(Carlos Drummond de Andrade)

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu padrasto (*in memoriam*)
pelo amor incondicional e por sempre acreditarem
nos meus sonhos. Quem tem o privilégio de possuir
pais como vocês sabe o verdadeiro significado da palavra felicidade.

Eu sou feliz!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Aoi Masuda e ao Dr. Itabajara Vaz, pela oportunidade e auxílio na execução do meu mestrado no Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal.

À Dra. Sandra Farias, pelos ensinamentos e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal: Alexandra, Alexandre Reimer, Daniela Freitas, Herbert Rech, Isis Abel, Kiyoko Uemura, Letícia, Luis Fernando Parizi, e Roberta Trois, pelo convívio e amizade.

Às minhas amigas queridas: Ana Paula Rottini Carolina Weber, Caroline de Andrade, Fernanda Klein, Juliana Fin, Leonara Dall'Onder, Mariana Franceschi e Paula Pohl por tornarem esses anos mais agradáveis e suaves! Nunca se esqueçam que vocês moram no meu coração! Vocês são uns amores, nunca esquecerei os momentos que passamos juntas!

À técnica Clotilde de Amorim Pinto pela constante colaboração e amizade.

Aos amigos do Laboratório da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, principalmente, Eldo, Helga e Evenilton, vocês tornaram meus dias extremamente divertidos.

Ao Laboratório de Patologia da UFRGS, principalmente ao Dr. David Driemeier e seus alunos, Pedro Bezerra e Pedro Pedroso, pela colaboração e ensinamentos.

Ao Dr. Daniel Passos por ser um exemplo de pesquisador, profissional e principalmente amigo.

Ao meu grande amigo, Dr. Alexandre Leal, pelos exemplos de sabedoria, dedicação, profissionalismo e caráter! Obrigado pelos ensinamentos!

À minha mãe, Fátima que sempre me apoiou em todas minhas decisões e que esteve no meu lado nos momentos mais difíceis. Obrigado, por essa mulher e mãe maravilhosa!

À minha irmã, Júlia pelo amor e amizade incondicionais!

Ao meu padrasto, Wo Hsiao Hua, por acreditar em mim e por ter sido um exemplo de homem e principalmente pai!

Ao meu noivo, Thiago Leite tu és meu amigo, companheiro, ouvinte, conselheiro... obrigado por tornar minha vida melhor!

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial ao Paulo, Milton, Luciano e a Silvia, pela constante colaboração.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, pelos ensinamentos e colaboração.

Um agradecimento especial aos funcionários, Noé e Paulo pelo auxílio nas coletas de carrapato e plantões.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BCIP	butilcarbamato de 3-iodo-2-propinilo
BmTIs	inibidores de tripsina de <i>B. microplus</i>
BrBm5	anticorpo monoclonal anti-BYC de <i>B. microplus</i>
BYC	<i>Boophilus Yolk pro-Cathepsin</i>
BYCr	<i>Boophilus Yolk pro-Cathepsin</i> recombinante
cDNA	DNA complementar
CRT	calreticulina
DNA	ácido desoxirribonucléico
DMSO	dimetil-sulfóxido
DMF	dimetilformamida
D.O.	densidade óptica
ELISA	Imunoensaio Enzimático
GST	glutathione S-transferase
IgG	imunoglobulina G
NBT	azul de nitro tetrazólio
OPD	o-fenilenodiamino dihidroclorato
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	reação em cadeia da polimerase
SDS	dodecilsulfato de sódio
THAP	<i>Tick Heme-binding Aspartic Proteinase</i>
VTDC	<i>Vitellin-Degrading Cysteine Endopeptidase</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato <i>R. microplus</i>	03
Figura 2 - Localização subcelular dos domínios ácidos de BYC em ovo de 4 dias de <i>R. microplus</i>	10
Figura 3 - Análise em gel de agarose 0,8% das construções plasmidiais (BYCr-PC e BYCr-PME) após hidrólise com <i>EcoRI</i> e <i>XbaI</i> e PCR.....	30
Figura 4 - Análise das construções plasmidiais (BYCr-PC e BYCr-PME) após hidrólise com <i>Bgl II</i> em gel de agarose 0,8%.....	31
Figura 5 -Transfecção transitória em células de mamíferos COS-1.....	32
Figura 6 - Análise por Western Blotting da proteína BYCr sondada com os soros dos camundongos inoculados com BYCr-PC (diluído 1:50).....	33
Figura 7 - Análise por Western Blotting das proteínas BYC nativa e BYCr sondadas com os soros dos camundongos inoculados com BYCr-PC (diluído 1:50).....	33
Figura 8 - Análise por Western Blotting da proteína BYCr sondada com os soros dos camundongos inoculados com BYCr-PME (diluído 1:50).....	34
Figura 9 - Análise por Western Blotting da proteína BYCr sondada com soro dos camundongos inoculados competindo com BYCr-PC e competindo com BYC nativa.....	35
Figura 10 – Titulação, por ELISA, dos soros dos camundongos inoculados com BYCr-PC..	36
Figura 11 – Titulação, por ELISA, dos soros dos camundongos inoculados com a construção BYCr-PC.....	36
Figura 12 - Cinética da resposta imune humoral dos camundongos inoculados com a construção BYCr-PC.....	37
Figura 13 - Imunolocalização da proteína BYC recombinante (BYCr-PC) no músculo dos animais inoculados.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Esquema de inoculações dos camundongos.....	23
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 O Carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e sua Importância Econômica.....	01
1.2 Ciclo de Vida do <i>R. microplus</i>	01
1.3 Métodos de Controle.....	03
1.3.1 Controle Químico.....	04
1.3.2 Controle Biológico.....	05
1.3.3. Controle Imunológico.....	06
1.4 Embriogênese e Degradação dos Componentes do Vitelo.....	08
1.5 A Proteína <i>Boophilus</i> <i>Yolk pro-Cathepsin</i> (BYC).....	09
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivos Gerais.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 Soluções e Tampões.....	13
3.1.1 Tampões para Eletroforese.....	13
3.1.1.1 Tampões e Soluções para Western-blotting.....	13
3.1.2 Soluções para Extração de DNA Plasmidial.....	14
3.1.3 Gel de Agarose e Poliacrilamida.....	14
3.1.4 Marcadores de Massa Molecular.....	14
3.1.5 Meios e Placas de Cultura.....	15
3.1.6 Antibióticos.....	15
3.1.7 Enzimas.....	15
3.1.8 Plasmídeos e <i>Primers</i> para Clonagem e Seqüenciamento.....	16
3.1.9 Linhagem de <i>Escherichia coli</i>	16
3.1.10 Inibidores de Proteases.....	17

3.1.11 Meios e Reagentes para Cultura de Células de Mamífero.....	17
3.1.11.1 Reagentes para Coloração das Células de Cultura com X-gal.....	17
3.1.12 Soluções para ELISA.....	18
3.2 Clonagem do Gene da Proteína BYC.....	18
3.2.1 Transformação de Células Competentes por Eletroporação.....	19
3.2.2 Extração de DNA Plasmidial em Larga Escala – Lise Alcalina.....	19
3.2.3 Análise Quantitativa e Qualitativa do DNA Plasmidial.....	20
3.2.4 Seqüenciamento dos Clones das Construções Plasmidiais (BYCr-PC e BYCr-PME)....	20
3.3 Testes Imunoenzimáticos.....	21
3.3.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	21
3.3.2 Western Blotting.....	21
3.3.3 ELISA Indireto.....	22
3.4 Inoculação dos Camundongos.....	22
3.4.1 Avaliação da Resposta Imune.....	24
3.4.1.1 Preparação dos Extratos de Ovos.....	24
3.4.1.2 SDS-PAGE das Proteínas BYC Nativa e BYC Recombinante.....	24
3.4.1.3 Western Blotting da proteína BYC Recombinante.....	24
3.4.1.3.1 Western Blotting de Competição.....	25
3.4.1.4 Titulação, por ELISA, das Imunoglobulinas G anti-BYC dos Soros dos Camundongos Inoculados.....	25
3.5 Verificação da Expressão da Proteína BYC (BYCr-PC) em Linhagem Celular COS 1.....	26
3.5.1 Cultivo das Células COS-1.....	26
3.5.2 Transfecção Transitória Mediada por Lipídios Catiônicos.....	26
3.5.2.1 Avaliação da Expressão do Gene de Interesse.....	27
3.5.2.2 Eficiência da Transfecção.....	28
3.6 Imunolocalização da Proteína BYC Recombinante (BYCr-PC).....	28
4 RESULTADOS.....	30
4.1 Clonagem da Região Codificante da Proteína BYC.....	30
4.2 Expressão da Proteína BYC (BYCr-PC) em Células COS-1.....	31
4.3 Imunogenicidade da Proteína BYC em Camundongos.....	32
4.3.1 Western Blotting.....	32
4.3.1.1 Western Blotting de Competição dos Soros dos Camundongos.....	34
4.3.1.2 Titulação por ELISA dos Soros dos Camundongos Inoculados.....	35

4.4 Imunolocalização da Proteína BYC Recombinante (BYCr-PC).....	37
5 DISCUSSÃO.....	39
CONCLUSÕES.....	47
PERSPECTIVAS.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o principal ectoparasita bovino e causa importantes perdas econômicas nas criações de bovino. O controle imunológico é estudado como um método alternativo para seu controle, no entanto, uma vacina eficaz ainda necessita ser desenvolvida. A proteína BYC (*Boophilus* *Yolk Pro-Cathepsin*) é uma aspártico proteinase presente no ovo do carrapato e envolvida na embriogênese, já tendo sido testada como imunógeno vacinal. O propósito deste estudo foi avaliar se a inoculação de plasmídeos para expressão em células eucarióticas (BYCr-PC e BYCr-PME) contendo a região codificante para a proteína BYC poderiam gerar uma resposta imune específica. A região codificante da proteína BYC foi amplificada por PCR e clonada em dois vetores de expressão eucariotos (pcDNA3 e pME18Neo). Os clones, BYCr-PC e BYCr-PME foram utilizados para testes de inoculação de camundongos BALB/C por via intramuscular. Os camundongos receberam duas inoculações de 100 µg das construções (BYCr-PC ou BYCr-PME) e os controles negativos receberam somente PBS, pcDNA3 ou pME18Neo. A produção de anticorpos, após a inoculação, foi avaliada por Western Blotting e ELISA, sendo detectados anticorpos contra a proteína BYC nos camundongos inoculados com a construção BYCr-PC. A imunolocalização da proteína BYC nas amostras de músculo no local da inoculação foram realizadas com o monoclonal BrBm5 (anti-BYC). Estes resultados mostraram que a inoculação com o plasmídeo BYCr-PC induz a produção de anticorpos específicos e possibilita testar o uso de uma vacina de DNA como um método alternativo para o controle de carrapatos.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, vacina de DNA, vetores de expressão eucariotos, carrapato, BYC (*Boophilus* *Yolk Pro-Cathepsin*), embriogênese.

ABSTRACT

The Rhipicephalus (Boophilus) microplus tick is the major bovine ectoparasite and causes important economical losses on cattle breeding. The immunologic control has been studied as an alternative method for the tick control. However, an effective vaccine remains to be developed. BYC (Boophilus Yolk Pro-Cathepsin) is an aspartic proteinase found in eggs that is involved in the embryogenesis of Rhipicephalus (Boophilus) microplus, and it has been proposed as a probable antigen in vaccine development. The purpose of this study was to evaluate whether the immunization containing rBYC (rBYC-PC and rBYC-PME) could elicit a specific anti-BYC immune response in vivo. The cDNA of BYC was amplified by PCR and it was cloned into two eukaryotic expression vectors (pcDNA3 and pME18Neo). The clones, rBYC-PC and rBYC-PME, were produced in large scale for immunoassays. To evaluate the immunogenicity of BYC, BALB/c mice were immunized with DNA vaccine by intramuscular injection. The mice received two intramuscular inoculations of 100µg plasmids DNA (rBYC-PC or rBYC-PME) and the negative controls received only PBS, pcDNA3 or pME18Neo. The production of antibody after the immunizations was evaluated by Western Blotting and ELISA. Antibodies against BYC in mice inoculated with rBYC-PC were detected. Immunolocalization of the rBYC protein in muscle samples from the injection site with rBYC-PC was detected with monoclonal BrBm5 anti-BYC. These results show that DNA immunization produced specific anti-BYC antibodies and suggest that a DNA vaccine could prove useful to develop an alternative method for tick control.

Keywords: Rhipicephalus (Boophilus) microplus, DNA vaccine, eukaryotic expression vector, tick, BYC (Boophilus Yolk Pro-Cathepsin), embryogenesis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e sua Importância Econômica

O carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887), constitui um dos maiores problemas para a pecuária nas regiões tropicais e subtropicais. Carrapatos são os mais importantes ectoparasitas e são responsáveis pela transmissão de doenças aos seus hospedeiros, sendo que nenhum outro artrópode tem capacidade de ser vetor de uma variedade tão ampla de organismos patogênicos, como por exemplo, transmissão de protozoários, riquetsias, bactérias e vírus (SONENSHINE, 1991; ABREU, 2005).

Esses parasitas, além de sugarem o sangue, provocam incômodo físico aos bovinos, estressando o animal, o que diminui a taxa diária de conversão alimentar. A principal causa desse incômodo é uma reação alérgica desencadeada através da inoculação da saliva do carrapato na pele do bovino, pois a mesma libera uma grande quantidade de histamina (FURLONG, 1993). Sutherst *et al.* (1979) estimaram em 1 kg de peso vivo a perda média de um bovino após sofrer severa infestação por carrapatos.

O parasitismo gera prejuízos para a pecuária de corte e leiteira e as perdas diretas e indiretas relacionadas a esta parasitose foram estimadas em 8 dólares/bovino/ano. Os prejuízos podem ultrapassar um bilhão de dólares anuais no Brasil, levando-se em conta a diminuição na produção de leite, perda de peso, aumento da mortalidade, redução da natalidade, o consumo de carrapaticidas, gastos com mão-de-obra, perda na qualidade do couro além da transmissão de agentes patogênicos (EMBRAPA, 1999).

As lesões cutâneas prejudicam as indústrias de couro, tendo repercussão no preço final do produto, além de favorecerem a entrada de bactérias e larvas de moscas (berne e miíase). De modo geral, países endêmicos sofrem grandes prejuízos (SONENSHINE, 1991).

1.2 Ciclo de Vida do *R. microplus*

O carrapato *R. microplus* é um aracnídeo pertencente ao filo Artropoda, a sub-classe Acarina da classe Arachnida, ordem Acari, subordem Metastigmata, superfamília Ixodidea e família Ixodidae (PEREIRA, 1982). Ele parasita preferencialmente os bovinos, mas pode

infestar outras espécies, incluindo humanos. Este carrapato apresenta duas etapas distintas no seu ciclo de vida (Figura 1): uma fase parasitária, durante um período médio de 21 dias sobre um único hospedeiro, e uma fase não parasitária que ocorre no solo, podendo durar de duas semanas a três meses, dependendo, fundamentalmente, das condições climáticas existentes (GONZALES, 1974).

Na fase parasitária, o carrapato apresenta três estádios distintos: larva, ninfa e adulto. A larva apresenta três pares de patas, é bastante ativa, pois necessita encontrar o hospedeiro para nele se fixar e sobrevive com as reservas de alimento acumuladas na fase de ovo. Fixa-se em locais específicos do hospedeiro utilizando algumas importantes estruturas, como, por exemplo, as quelíceras, as quais seccionam a pele para a introdução do hipostômio, órgão responsável pela fixação da larva na pele do bovino (GONZALES, 1974).

Após a fixação, a larva alimenta-se e inicia o processo de desenvolvimento e crescimento tegumentário. Passa por um período de inércia entre o quarto e quinto dia e atinge a fase de metalarva. Em torno do sexto dia, adquire uma nova estrutura, com outro tegumento, mais um par de patas e uma fileira de dentição do hipostômio entre outras alterações: é a fase de ninfa. Esta fase dura, em média, dois a quatro dias, sendo que ao continuar seu desenvolvimento, uma nova alteração no exoesqueleto se processa, havendo um período igual de inatividade, denominado de metaninfa, para que ao final do processo surja o indivíduo adulto, sexualmente diferenciado. Isto acontece em torno do décimo segundo dia.

A partir dessa fase, inicia-se o processo de maturação dos machos e das fêmeas, sendo que em torno do décimo sétimo dia os machos já estão aptos à cópula. Nota-se um crescimento mais acentuado do tegumento nessa fase, sendo que nas últimas horas próximas ao ingurgitamento completo, a alimentação intensifica-se, a ponto das fêmeas apresentarem um tamanho cerca de 10 vezes superior ao dos machos. No entanto, aos 21 dias, a maioria das fêmeas cai ao solo e os machos podem permanecer no bovino por mais de 38 dias fecundando inúmeras fêmeas (GONZALES, 1974). As fêmeas, após serem fecundadas, passam de metaninfa para neógina num período médio de 17 dias. Em seguida, em um período de três dias, passam a partenógena (parcialmente ingurgitada) e em mais dois dias, a teleógina (ingurgitamento máximo) (GONZALES, 1974).

A fase não parasitária compreende os estágios de fêmea adulta (teleógina), ovo e larva infestante. A fêmea adulta fecundada, ao desprender-se do bovino, procura um local no solo para efetuar a postura. Em condições adequadas de temperatura (26-27°C) e umidade (aproximadamente 80%) a postura pode ser iniciada a partir do terceiro dia após a queda, podendo se estender até 60 dias no meio ambiente. Após a postura, a fêmea apresenta uma

coloração mais amarelada chegando à morte após o término da ovoposição. Os ovos podem iniciar a eclosão a partir da quarta semana após o início da postura. No meio ambiente, possuem estratégias de sobrevivência frente às adversidades climáticas. As larvas necessitam de um período de maturação médio de uma semana para estarem aptas a fixarem-se no hospedeiro e continuarem o desenvolvimento. Após esse período, deslocam-se às extremidades da vegetação para alcançarem mais facilmente o bovino. Nessa fase de larva infestante, elas podem sobreviver por até 36 semanas (GONZALES, 1974).

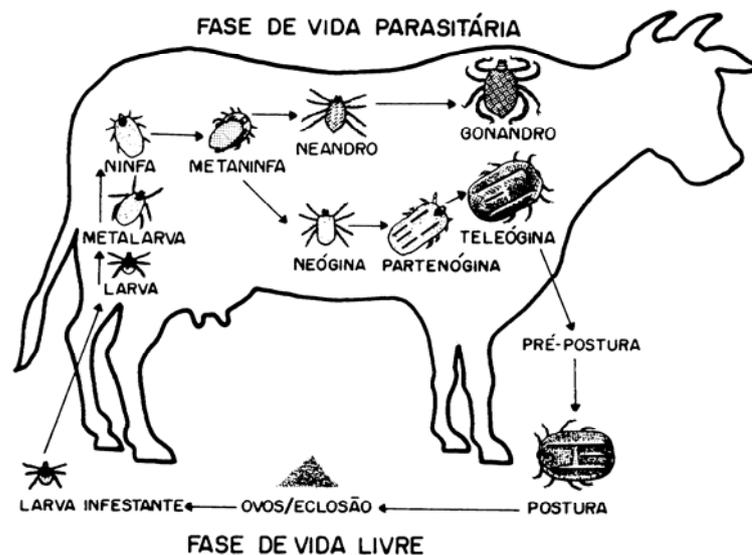


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato *R. microplus* (Fonte: GONZALES, 1995).

1.3 Métodos de Controle

Existem vários métodos para o controle do *R. microplus*. Entre os principais estão o químico, o biológico e o imunológico, sendo o método químico o mais utilizado comercialmente.

1.3.1 Controle Químico

O controle do carrapato tem sido praticamente dependente do uso de acaricidas. A utilização destas drogas representa, no entanto, um sério problema para a saúde humana e a produção animal em várias áreas do mundo tendo em vista os resíduos na carne e no leite e o risco da contaminação do meio ambiente, através de resíduos deixados na água e no solo, além de selecionar populações resistentes (SOLOMON, 1983; DAVEY & GEORGE, 1998). A resistência aos acaricidas ocorre mais rapidamente em carrapatos de um único hospedeiro do gênero *R. microplus*, provavelmente pelo menor período de tempo entre as gerações (KOCAN, 1995); ou seja, existe a necessidade de troca periódica de produtos químicos, além de um cuidado especial para utilização da dose correta do produto, pois a subdosificação é uma das causas da seleção de populações resistentes. O controle químico é utilizado desde a década de 30, de modo massivo com pesticidas (DDT) tanto para ácaros como para insetos e diferentes compostos já foram utilizados, como arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, nitroguanidinas, fenilpirazoles, formamidinas, piretróides, avermectinas, lactonas macrocíclicas e fenil-uréias (PRUETT, 1999).

Crampton *et al.* (1999), descreveu o aumento crescente de linhagens de carrapatos resistentes aos compostos químicos presentes nos carrapaticidas. Alguns grupos têm inclusive, acompanhado parâmetros biológicos, tais como reprodução em populações resistentes e suscetíveis aos acaricidas, de forma a melhor compreender como funcionam esses mecanismos de resistência (DAVEY *et al.*, 2006; FOIL *et al.*, 2004).

Uma série de compostos químicos, como avermectinas, que tiveram seu uso intensificado no Brasil nos anos 90, amitraz, organofosforados e piretróides (SEDDON, 1967; WHARTON & NORRIS, 1980; MARTINS & FURLONG, 2001; DUCORNEZ *et al.*, 2005; PRUETT & POUND, 2006; RODRIGUEZ-VIVAS *et al.*, 2006), têm se mostrado ineficientes contra populações isoladas de *R. microplus*. Novos acaricidas, como inibidores de desenvolvimento, fluazuron e fipronil, têm sido utilizados na tentativa de evitar a resistência causada pelo uso indiscriminado de tantos princípios químicos concomitantemente (SABATINI *et al.*, 2001; GEORGE *et al.* 2004).

1.3.2 Controle Biológico

O controle biológico é uma alternativa para evitar o emprego de produtos químicos no controle do carrapato. Este tipo de estratégia pode ser utilizado de diversas formas, baseando-se nas relações do carrapato com o meio onde ele se encontra, na sua relação com seus predadores e na utilização de compostos naturais (ROSA DE LIMA *et al.*, 2002).

Os carrapatos têm sua viabilidade relacionada ao estresse a que estiverem submetidos, principalmente durante a fase de vida livre. Deste modo, o clima desempenha papel importante no equilíbrio das populações de carrapatos no campo, alterando o número de larvas viáveis que sofrem a interferência da temperatura e umidade do ar (GONZALES, 2003).

Baseado nas observações sobre a biologia do carrapato, propõem-se a seleção genética de bovinos de raças mais resistentes ao carrapato, como por exemplo, zebuínos. Outra alternativa, seria o manejo de pastagens, selecionando vegetações que afetem a densidade da população de carrapatos, por sua ação repelente, tóxica, ou por imobilizarem as larvas através de secreções ou estruturas da planta (SUTHERST *et al.*, 1982; RAJPUT *et al.*, 2006). Ou ainda, através do sistema de rotação de pastagens, no qual uma área fica livre de rebanho por um determinado período de tempo, de forma a impedir a sobrevivência das larvas, sendo, entretanto de difícil aplicação em uma propriedade rural de pequeno porte (FARIAS *et al.*, 1986; GONZALES, 2003). Além disso, os carrapatos estão sujeitos a muitos predadores, dentre os quais as formigas carnívoras que devoram fêmeas no solo, aranhas, algumas moscas que fazem postura no corpo da teleógina, algumas aves e os pássaros como a garça-vaqueira (*Egretta ibis*), que segue os rebanhos bovinos e alimenta-se dos carrapatos retirados do corpo dos bovinos, ou de teleóginas que caem ao solo (ALVES-BRANCO *et al.*, 1983).

Vários microorganismos potencialmente patogênicos podem ser usados para o controle do carrapato (MEGAW, 1978; BRUM, 1988). A bactéria *Erwinea* sp produz infecções no trato genital das teleóginas. Os hemoprotozoários, *Babesia* sp, agentes da tristeza parasitária bovina também provocam danos ao trato digestivo das teleóginas. Os fungos entomopatogênicos (que infectam insetos) dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* (FRAZZON *et al.*, 2000; GINDIN *et al.*, 2002; RICHARD *et al.*, 2004) têm sua eficácia estimada em torno de 50 a 60% e são um novo caminho que se abre no controle de carrapatos. Outra estratégia

envolvendo controle biológico é a utilização de ferormônios de carrapatos (HAMILTON, 1992; SONENSHINE, 2004) ou machos estéreis (RAJPUT *et al.*, 2006) como ferramenta no controle de populações, como já ocorre com alguns insetos. Também há a possibilidade da introdução de carrapatos híbridos *R. microplus* X *R. annulatus* estéreis em populações de campo (DAVEY *et al.*, 1994) como outra forma de controle.

Estudos sobre a ecologia dos carrapatos também auxiliam a otimizar os tratamentos químicos, a manipulação ambiental e as estratégias que utilizam a imunidade dos hospedeiros, baseando-se principalmente nas flutuações dos picos sazonais de abundância destes parasitas (SPICKETT, 1994).

1.3.3 Controle Imunológico

As vacinas contra ectoparasitas constituem uma alternativa importante para evitar os prejuízos causados pelos agentes químicos. As vacinas não têm o efeito imediato dos pesticidas químicos, nem a capacidade de proteger totalmente o animal, no entanto, oferecem algumas vantagens. Os efeitos das inoculações persistem por longo período sem deixar resíduos tóxicos e podem ser espécie-específicas (PRUETT, 1999).

O controle imunológico dos carrapatos está sendo explorado pelo conhecimento das interações parasito-hospedeiro que permitem imunomanipular o hospedeiro. Vários experimentos demonstraram a participação do sistema imune na resistência ao carrapato. A resistência dos bovinos ao *R. microplus* foi inicialmente indicada como decorrente de reações imunológicas por Roberts (1968). Posteriormente, foi comprovado que tanto o *Bos taurus* quanto o *Bos indicus*, não previamente expostos ao carrapato, eram igualmente suscetíveis na primeira infestação (WAGLAND, 1975).

As infecções parasíticas freqüentemente são caracterizadas pelo aparecimento de anticorpos e imunidade celular contra vários antígenos do parasita, os quais são muitas vezes imunodominantes e não essenciais à sua sobrevivência. Os parasitas, portanto, desenvolveram maneiras de evadir ou suprimir respostas imunes contra moléculas essenciais a sua sobrevivência (WIKEL *et al.*, 1994). Portanto, não é surpreendente que os carrapatos, especialmente os ixodídeos, possivelmente por se manterem fixos ao hospedeiro por um período extenso, tenham desenvolvido maneiras de reduzir a competência imune do hospedeiro (CHAMPAGNE, 1994).

A resistência adquirida mediada imunologicamente (ALLEN, 1989) pode ser aferida pela redução no número de carrapatos que se fixam no hospedeiro, pela diminuição no peso das teleóginas e pela redução da produção de ovos e, conseqüentemente, de larvas (WIKEL & BERGMAN, 1997). A observação da diminuição de peso e número de ovos forneceu bases para as futuras tentativas de utilização de vacinas no controle de ectoparasitas. Testes de imunização com diferentes antígenos têm fornecido evidências de que o controle destes ectoparasitas pode ser realizado através da vacinação (WILLADSEN, 2006). Willadsen (1989) considera que o primeiro passo para a produção de uma vacina prática deve ser, obrigatoriamente, a identificação de um número de antígenos alvos, suficientemente eficazes, e na forma purificada. É necessário também, além da identificação de proteínas capazes de induzir uma resposta imune protetora, o conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica dos hospedeiros (WIKEL, 1996).

Com objetivo de induzir uma melhor resistência nos animais, vários estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de obtê-la por imunização artificial. A capacidade dos bovinos imunizados de produzirem uma resposta imune para extratos de carrapato e proteínas purificadas tem sido descrita. Foi observado que a taxa de fecundidade dos carrapatos alimentados em bovinos imunizados com ovo, larva ou tecidos adultos de *R. microplus* é mais baixa que daqueles alimentados em bovinos não imunizados (DA SILVA VAZ JR, I *et al.*, 1998). Todas estas observações fornecem bases que justificam tentativas de utilizar vacinas no controle desse ectoparasito.

Segundo Willadsen (1987), para qualquer ectoparasita hematófago, o repertório de antígenos em potencial, ou seja, moléculas do parasita que possam ser encontradas pelo sistema imune do hospedeiro, durante a alimentação, é bastante limitado, enquanto que a variedade de moléculas do parasita que é exposta aos componentes do sangue do hospedeiro durante a ingurgitação é grande. Portanto, deve existir, no parasito, uma diversidade de alvos em potencial para um ataque imunológico do hospedeiro.

Os antígenos de carrapatos podem ser divididos em duas categorias – a dos antígenos naturalmente expostos ao sistema imune do hospedeiro durante a fase parasitária, como proteínas presentes na saliva e os antígenos ocultos, aqueles que não entram em contato com o hospedeiro (WILLADSEN & KEMP, 1988).

A teoria dos antígenos ocultos e o achado de uma proteína de intestino (Bm86) com essa característica de não estar exposta ao sistema imune do hospedeiro durante uma infestação natural, significaram um grande avanço no desenvolvimento de vacina contra *R. microplus*. A Bm86 induz resposta imunológica em bovinos imunizados e é a base de duas

vacinas comerciais presentes no mercado: a TickGard, desenvolvida na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO, e a Gavac, desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba. As duas vacinas são produzidas em sistema heterólogo, porém, a proteína da TickGard é obtida em *E. coli* e a da Gavac em *Pichia pastoris*. Embora essas vacinas estejam comercialmente disponíveis, elas não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas (WILLADSEN *et al.*, 1996; JONSSON *et al.*, 2000). O grupo australiano descreveu e avaliou um segundo antígeno oculto, denominado Bm91, que foi associado à Bm86 e aumentou a eficácia parcial da vacinação (RIDING *et al.*, 1994; WILLADSEN *et al.*, 1996). Embora os antígenos ocultos sejam a base das vacinas comerciais e tenham sido estudados em outros ectoparasitas, como *Lucilia cuprina* e *Pediculus humanus* (TRIMNELL *et al.*, 2002), experimentos com antígenos naturalmente expostos ao sistema imunológico do hospedeiro associado a antígenos ocultos, demonstram o potencial da associação de diferentes alvos em uma mesma vacina (TRIMNELL *et al.*, 2002). No entanto, mesmo com todas estas demonstrações de que a imunização pode ser um método eficiente no controle de carrapato, vacinas contra carrapato devem ser empregadas dentro de um contexto de controle integrado, isto é, em conjunto com acaricidas, já que os métodos de vacinação disponíveis, atualmente, não conferem imunidade total.

1.4 Embriogênese e Degradação dos Componentes do Vitelo

O desenvolvimento embrionário do *R. microplus*, é completado em 21 dias, quando os ovos são mantidos a 28°C. Até o quinto dia após a postura, o embrião é um sincício. A celularização da blastoderme ocorre no sexto dia, sendo seguida por uma rápida movimentação das células. No sétimo dia, bandas do embrião segmentado já podem ser distinguidas (CAMPOS *et al.*, 2006).

O rápido desenvolvimento observado no embrião desse carrapato requer um suporte energético prontamente disponível. Durante a oogênese dos animais ovíparos, grandes quantidades de proteína, lipídeos e açúcares são estocadas pelos oócitos em crescimento, constituindo a fonte de nutrientes para o desenvolvimento do embrião (CAMPOS *et al.*, 2006). A principal proteína do vitelo dos ovos de artrópodes é a vitelina (VT), uma fosfoglicolipoproteína que deriva de um precursor materno, a vitelogenina (VTG). A VTG, sintetizada no ovário e no corpo gorduroso, é secretada na hemolinfa de onde é endocitada

pelos oócitos e armazenada em estruturas denominadas grânulos de vitelo. Estas estruturas são grandes organelas semelhantes a lisossomos que armazenam, além do substrato (VT), a maquinaria necessária para a sua utilização (FAGOTTO, 1990; SAPPINGTON & RAIKHEL, 1998).

Várias enzimas envolvidas na degradação do vitelo têm sido caracterizadas nos últimos anos em diferentes modelos animais (FAGOTTO, 1990; LOGULLO *et al.*, 1998; SORGINE *et al.*, 2000; SEIXAS *et al.*, 2003; FIALHO *et al.*, 2005). Estas enzimas precisam ser reguladas para assegurar que a degradação da VT ocorra em sincronia com o desenvolvimento do embrião (FIALHO *et al.*, 2005). Muitos estudos têm demonstrado que a proteólise da VT é ativada após a fertilização do oócito, com o início da embriogênese, sendo regulada por mecanismos que controlam a atividade proteolítica das enzimas presentes nos grânulos de vitelo. Um dos mecanismos melhor descritos para regular a proteólise da VT é a ativação das proteases pela acidificação dos grânulos de vitelo. Há diversas evidências mostrando que o pH é um regulador chave da degradação do vitelo. Em diversas espécies, tais como os carrapatos *R. microplus*, (ABREU *et al.*, 2004) e *Ornithodoros moubata* (FAGOTTO, 1991), a barata *Blatella germanica* (LIU *et al.*, 1996), a rã *Xenopus laevis* (FAGOTTO & MAXFIELD, 1994) e o mosquito *Aedes aegypti* (CHO *et al.*, 1999), os grânulos de vitelo são inicialmente neutros e tornam-se acidificados durante o desenvolvimento inicial do embrião, causando a ativação de várias enzimas e a degradação dos constituintes do vitelo.

1.5. A Proteína *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin (BYC)

A BYC é uma glicolipoproteína com massa molecular de aproximadamente 54 kDa, detectada em ovos embrionários de *R. microplus* (LOGULLO *et al.*, 1998). A BYC é uma aspártico proteinase sintetizada no corpo gorduroso e intestino, secretada para a hemolinfa e captada pelo ovócito em crescimento e representa entre 5-8% das proteínas do ovo. Sua participação na degradação da VT foi recentemente confirmada *in vitro*, demonstrando a importância dessa enzima no processo de embriogênese (ABREU *et al.*, 2004). Sua colocalização com os grânulos de vitelo ácidos em ovos de quatro dias (Figura 1), sugere que sua atividade é controlada pela acidificação dessas estruturas, reforçando seu papel na degradação da VT (ABREU *et al.*, 2004).

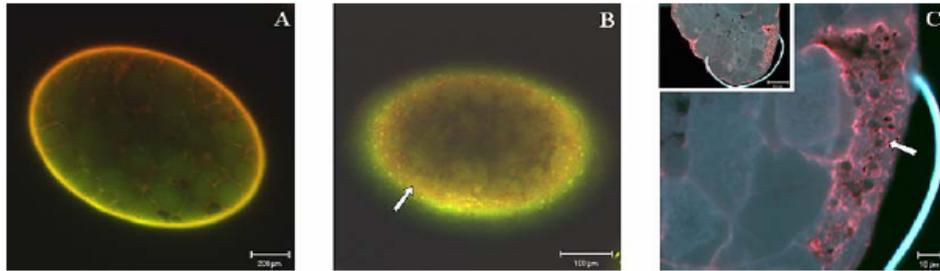


Figura 2 - Localização subcelular dos domínios ácidos de BYC em ovo de 4 dias de *R. microplus*. **A)** Ovos coletados após a ovoposição, **B)** Ovos com 4 dias após ovoposição que foram expostos a 0,01% de laranja de acridina (usado como indicador da acidificação). As setas indicam as regiões ácidas no ovo. **C)** Imunolocalização da BYC em corte histológico de ovo (Campos *et al.*, 2007).

Estudos *in vivo* demonstraram que bovinos imunizados com BYC produzem imunoglobulinas anti-BYC, que foram detectadas circulantes na hemolinfa de carrapatos que parasitavam esses animais. As imunoglobulinas circulantes na hemolinfa mantiveram sua atividade biológica, medida pela capacidade de ligação ao antígeno correspondente, o que indica que os anticorpos podem atravessar o epitélio intestinal e, possivelmente, reagir com antígenos localizados nos tecidos do meio interno do carrapato (DA SILVA VAZ *et al.*, 1996). Esses dados foram reforçados pelos resultados da inoculação de teleóginas com o anticorpo monoclonal BrBm5 (anti-BYC), nas doses de 10 μg e 50 μg as quais causaram uma redução entre 5,4-60% na taxa de sobrevivência das fêmeas e de 2,5% a 52% no peso dos ovos, demonstrando que os efeitos são dependentes da quantidade de anticorpo inoculado (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998). Quando bovinos imunizados com BYC foram desafiados com larvas infestantes, houve uma redução no número de teleóginas, na capacidade de postura e na fertilidade dos ovos, com a eficácia da imunização com a BYC variando entre 14% e 36%. Os níveis de anticorpos declinam gradualmente após a infestação e respondem positivamente a uma dose de reforço (100 μg), aplicada 11 meses após a infestação, indicando a existência de memória imunológica para esse antígeno (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998).

Nesse contexto, para averiguar o potencial vacinal da proteína BYC recombinante, Leal *et al.* (2006) imunizaram um grupo de bovinos Hereford e desafiaram com 20.000 larvas de *R. microplus* por animal. Os soros dos bovinos imunizados reconheceram a proteína BYC

nativa em ELISA e Western Blotting, com títulos entre 1:500 e 1:4.000. O desafio demonstrou uma proteção parcial contra a infestação, com 25% de proteção global, a qual corresponde a interação de parâmetros como número de fêmeas ingurgitadas, postura e fertilidade dos ovos de carrapatos provenientes de bovinos vacinados e bovinos controles.

Os dados de imunoproteção obtidos com a proteína BYC recombinante foram similares aos obtidos na imunização de bovinos com BYC nativa (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998), indicando a possibilidade de uso da forma recombinante como imunógeno. Tendo em vista o potencial da proteína BYC recombinante como antígeno candidato, nosso objetivo no presente trabalho foi avaliar sua capacidade imunogênica para o desenvolvimento de uma vacina de DNA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a imunogenicidade da proteína BYC recombinante, expressa em vetores eucariotos para o desenvolvimento de uma vacina de DNA para o controle das populações de *R. micoplus* em bovinos.

2.2 Objetivos Específicos

Expressão da proteína BYC recombinante em vetores eucariotos;

Avaliação da imunogenicidade da proteína BYC recombinante através da inoculação de camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Soluções e Tampões

3.1.1 Tampões para Eletroforese

- TAE 1X: 24,2 g de Tris-base, 5,71 ml de ácido acético glacial, 10 ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0) e água destilada suficiente para 1 litro;
- Tampão de amostra 6X (para géis de agarose): azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%.
- Tampão de corrida pH 8,3: Tris-base 0,3%, glicina anidra 1,44% e SDS 0,01% ajustar pH 8,3 e água destilada suficiente 1 litro;
- Tampão de amostra para SDS-PAGE: Tris-HCl (pH 8,0) 62,5mM, SDS 2%, glicerol 10%, beta-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,001%, uréia 10 M;
- Coomassie-blue G-250: comassie G-250 0,1%, metanol 25%, ácido acético 5%;
- Solução de acrilamida: acrilamida 30% e bisacrilamida 0,8% em água destilada.

3.1.1.1 Tampões e Soluções para Western-blotting

- Tampão de transferência: NaHCO_3 13 mM, Metanol 20%, pH 9,9;
- Tampão PBS 1X: NaCl 150mM, NaH_2PO_4 25 mM, pH 7,5;
- Tampão de revelação Fosfatase (TRF): Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM;
- Solução de Bloqueio 5%: 5 g de leite em pó desnatado em 100 ml PBS 1X;
- NBT: 0,05 g em 1 ml de DMF 70%
- BCIP: 0,05 g em DMF 100%
- Solução de Ponceau: Ponceau S 2%, TCA 30%, ácido sulfossalicílico 30% em água destilada.

3.1.2 Soluções para extração de DNA plasmidial

- Solução I: Glicose 50mM, Tris-HCl (pH 8,0) 25mM, EDTA (pH 8,0) 10mM;
- Solução II: NaOH 0,2 N e SDS 1%;
- Solução III: 60 ml acetato de potássio 5M, 11,5 ml de ácido acético glacial, água destilada quantidade suficiente para 100 ml.
- Solução de PEG 8000 20%, NaCl 2,5 M
- Solução de Tris-EDTA: Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM pH 8,0
- Solução de fenol tamponado (pH 8,0): fenol tamponado com solução de Tris-HCl pH 8,0 e hidroxiquinolina 0,01% (v/w).
- Solução de precipitação: acetato de sódio 3 M, pH 5,2
- Tampão TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0

3.1.3 Gel de Agarose e Poliacrilamida

- Gel de agarose 0,8%: 0,8g de agarose dissolvida em 100 ml de TAE 1X (item 3.1.1.1), brometo de etídeo 5µg/ml.
- Gel de poliacrilamida desnaturante: gel de empilhamento (5%): 1 ml de solução de acrilamida/bisacrilamida, 780 µl de Tris-HCl 1M (pH 6,8), 60 µl de SDS 10%, 4,124 ml de H₂O destilada, 30 µl de persulfato de amônio 10%, 6 µl de TEMED; gel de separação (12%): 4 ml de solução de acrilamida/bisacrilamida, 3,733 µl de Tris-HCl 1M (pH 8,8), 100 µl de SDS 10%, 2,107 ml de H₂O destilada, 50 µl de persulfato de amônio 10%, 10 µl de TEMED.

3.1.4 Marcadores de Massa Molecular

- Marcador de massa molecular DNA Lambda *Hind*III: DNA de fago lambda *gt*118 (Amersham Pharmacia Biotech) digerido com endonuclease de restrição *Hind*III (Amersham Pharmacia Biotech).

- Marcador de massa molecular pré-corado: Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

3.1.5 Meios e Placas de Cultura

Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada, autoclavados a 121 °C por 15 min e mantidos à temperatura ambiente até o uso.

- LB líquido: NaCl 0,5%, extrato de levedura 0,5% e triptona 1%, pH 7,5;
- LB sólido: LB líquido acrescido de 1,5% de agar bacteriológico;
- SOC: triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10mM, glicose 20% na concentração final de 20mM.
- Placas de cultura: LB sólido foi fundido, o antibiótico de interesse foi adicionado e o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis sob fluxo laminar. Após a solidificação do meio, as placas foram estocadas a 4°C.

3.1.6 Antibióticos

- Ampicilina: 50 mg/ml (concentração de estoque); 100 µg/ml (concentração de uso).

3.1.7 Enzimas

Todas as reações foram feitas de acordo com as especificações do fabricante.

- Endonuclease de Restrição: *Bgl*III (CenBiot), *Eco*RI (CenBiot), *Xba*I (Invitrogen);
- Elongase (Invitrogen);
- Enzima de ligação: T4-DNA-ligase (Fermentas);

3.1.8 Plasmídeos e *Primers* para Clonagem e Seqüenciamento

Plasmídeos:

1) O plasmídeo pcDNA3 (Invitrogen) foi utilizado para as clonagens e possui o genótipo: promotor Citomegalovírus (CMV), resistência a ampicilina e neomicina, promotor T7, origem f1, ori de SV40, origem pUC, seqüência de poliadenilação BGH, sinal de poliadenilação SV40pA.

- *Primers* utilizados na amplificação do inserto:

Primer “forward” 3’ gatgtctagattagtagtacacgattgggcggg

Primer “reverse” 5’ ttgaattcgccgcatggcaaaaatttcgatt

- *Primers* utilizados no seqüenciamento dos clones:

Primer “forward” 3’ atcactagtgaattcgcgccgctgcaggtcgaccatatgggagagctcc

Primer “reverse” 5’ gtcgcatgctccgcccgcattggcgccgcccgggaat

2) O plasmídeo pME18Neo, que foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Doenças Infecciosas, Faculdade de Medicina Veterinária Universidade de Hokkaido/Japão, foi utilizado para as clonagens e possui o genótipo: resistência a ampicilina, promotor de Simian Vírus 40, origem de replicação pUC, *ori* para replicação em bactéria e resistência à neomicina, sinal de poliadenilação SV40pA

- *Primers* utilizados na amplificação do inserto:

Primer “forward” 3’ atcagggctcgagttagtagtacacgattgggcgg

Primer “reverse” 5’ tatcaattccatggcaaaaattcgattccgcttcgcaaggatcgattattatgctc

- *Primers* utilizados no seqüenciamento dos clones:

Primer “forward” 3’ gatgtctagattagtagtacacgattgggcggg

Primer “reverse” 5’ ttgaattcgccgcatggcaaaaatttcgatt

3.1.9 Linhagem de *Escherichia coli*

- XL1-BLUE MRF’ (Stratagene)

3.1.10 Inibidores de Proteases

- Leupeptina (concentração efetiva) 10-100 μM (Sigma),
- Pepstatina (concentração efetiva) 1-10 μM (Sigma),
- TPCK: 1-cloro-3-(4-tosil-amido)-4-fenil-2-butanona-*N*-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (concentração efetiva) 50 μM (Sigma).

3.1.11 Meios e Reagentes para Cultura de Células de Mamífero

- DME: *Dulbecco Modified Eagle's Medium* (Sigma)
- DME-O: Meio DME sem suplementos;
- DME-10%: Meio DME com 10% Soro Fetal Bovino
- DME-20%: Meio DME com 20% Soro Fetal Bovino
- PBS-A: fosfato diácido de sódio 10 mM (NaH_2PO_4), cloreto de sódio 150 mM (NaCl), pH 7,2, cloreto de potássio (KCl), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4).
- Tripsina 0,1% EDTA 1 mM
- Lipofectamina 2 mg/ml (Invitrogen)
- Reagente Plus 3 mg/ml (Invitrogen)
- Sulfato de Gentamicina 40 mg/ml (Shering-Plough)
- Corante Azul de Tripán 0,3%

3.1.11.1 Reagentes para Coloração das Células de Cultura com X-gal:

- Solução Fixadora: formaldeído 2% usar 5,4 ml a 37°C, glutaraldeído 0,2% usar 0,8 ml a 25°C e PBS quantidade suficiente para o volume de 100 ml.
- Solução Reveladora: ferrocianida/ferricianida 25 mM usar 120 μl , MgCl_2 100 mM usar 6 μl , X-gal (40 mg/ml DMSO) usar 30 μl agitando por 2 minutos a 37 ° C e PBS quantidade suficiente para 3 ml a 37°C.

3.1.12 Soluções para ELISA

- Solução de Adsorção: tampão carbonato/bicarbonato 50mM, pH 9,6.
- Solução de Revelação: tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0 OPD 3,4 mg/10ml de Tampão citrato-fosfato e 5 µl de H₂O₂ a 30%.
- Solução Interrupção: H₂SO₄ a 12,5%.

3.2 Clonagem do Gene da Proteína BYC

O cDNA codificador da proteína BYC foi previamente clonado no vetor procarioto pET 32b (LEAL *et al.*, 2006). Neste trabalho, novos *primers* foram projetados para clonagem da região codificante da BYC nos vetores de expressão eucariotos pcDNA3 e pME18Neo (item 3.1.8), nos sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*. Realizou-se um PCR em que foram adicionados a um microtubo (0,2 ml): 10 µl de tampão A (300 mM Tris-SO₄ pH 9,1 a 25°C, 90 mM (NH₄)₂SO₄ e 5 mM MgSO₄), 10 µl de tampão B (300 mM Tris-SO₄ pH 9,1 a 25°C, 90 mM (NH₄)₂SO₄ e 10 mM MgSO₄), 1,25 µl dNTP's (10 mM), 1 µl dos primers para amplificação do inserto (item 3.1.8), 1 µl da enzima *Elongase* (item 3.1.7), 1 µl do plasmídeo contendo a região codificante do gene BYC (pET 32b/BYC) na concentração de 80 ng e H₂O para completar o volume de 50 µl. As condições para a reação de PCR foram: 94°C – 5 minutos; 31 ciclos de: 94°C – 30 segundos, 55,6°C – 30 segundos, 68°C – 2 minutos; 55,6°C- 30 segundos e 68°C – 5 minutos. Os produtos de amplificação obtidos e os vetores foram hidrolisados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*. Para ligação, inserto e vetores já digeridos foram purificados em uma coluna Microspin S400 HR Column (Amersham) e ligados com a enzima T 4 DNA Ligase (item 3.1.7) numa proporção 3:1 inserto e vetor. A reação foi mantida a 16°C por 18 horas, originando as construções pcDNA3-BYC e pME18Neo-BYC denominadas, respectivamente, BYCr-PC e BYCr-PME.

3.2.1 Transformação de Células Competentes por Eletroporação

A transformação de bactérias *E. coli* XL1-Blue MRF' foi realizada segundo Sambrook *et al* (1989). Em uma cubeta de eletroporação, foram misturados 40 µl de células competentes (item 3.1.9) e 2 µl da reação de ligação (item 3.2). Após um pulso elétrico de 25 µF (2500 V), a cubeta foi lavada com 1 ml de meio SOC (item 3.1.5) e este meio contendo as bactérias transformadas foi distribuído em placas de meio de cultura LB sólido (item 3.1.5) contendo ampicilina (item 3.1.6) e incubado a 37 °C por 16 horas, para posterior seleção das colônias bacterianas transformantes.

3.2.2 Extração de DNA Plasmidial em Larga Escala – Lise Alcalina

A técnica foi realizada segundo Sambrook & Russel, 2001 com modificações. As colônias bacterianas contendo os plasmídeos de interesse (item 3.2.1) foram inoculadas em 25 ml de LB líquido (item 3.1.5) contendo 50 µl de ampicilina e a cultura incubada por a 37 °C sob agitação constante. As células foram coletadas por centrifugação a 16.900 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 2,5 ml de Tampão Tris-EDTA (item 3.1.2), com agitações vigorosas, e mantidas por 5 minutos no gelo. Em seguida foram adicionados 3,3 ml de solução II (item 3.1.2) homogeneizando por inversão lenta e incubando por 5 minutos no gelo. O volume de 3,3 ml da Solução III (item 3.1.2) foi adicionado à mistura e esta novamente homogeneizada por inversão lenta do tubo. O homogenato foi mantido por 30 minutos no gelo e a preparação foi centrifugada a 16.900 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado com gaze e transferido para outro tubo. Ao sobrenadante foram adicionados 3/5 do volume (em torno de 5 ml) de solução de PEG 8000 (item 3.1.2) e mantido por 1 hora a temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 16.900 g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido com cuidado, o sedimento foi ressuspenso em 200 µl de Tampão TE (item 3.1.2) e removido para microtubos de 2 ml. A solução de Ribonuclease A 200ng/ml (Fermentas) foi adicionada à mistura e mantida por 45 minutos a 37° C para digestão do RNA. A seguir, o sobrenadante foi tratado uma vez com 1 volume de fenol/clorofórmio, centrifugado a 15.000 g por 5 minutos, a fase superior da solução foi removida para novos microtubos, tratada com 1 volume de fenol, seguida de nova

centrifugação a 15.000 g por 5 minutos. Novamente a fase superior foi removida, adicionado 1 volume de clorofórmio e centrifugado a 15.000 g por 5 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol 100% ou 1 volume de isopropanol pH 5,2 e mantido por 30 minutos a -20 °C. O homogeneizado foi centrifugado a 20.400 g por 30 minutos a 4 °C e removido o sobrenadante. O sedimento de DNA foi lavado (sem ressuspender) com 1 ml de etanol 70%, mantido a temperatura ambiente até a secagem e dissolvido em 100 µl de Tampão TE gelado (item 3.1.2).

3.2.3 Análise Quantitativa e Qualitativa do DNA Plasmidial

A concentração e pureza do DNA obtido da extração plasmidial (item 3.2.2) dos clones, foi determinada por espectrofotometria pela relação entre as leituras nos comprimentos de onda 260 nm/280 nm. Os DNA plasmidiais foram hidrolisados com as enzimas de restrição apropriadas (*EcoRI* e *XbaI*) para liberação do inserto correspondente à região codificadora da proteína BYC e submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (item 3.1.1) por 20 minutos. O tamanho dos fragmentos gerados na reação foi determinado pela comparação com o marcador de massa molecular (item 3.1.4).

3.2.4 Seqüenciamento dos Clones das Construções Plasmidiais (BYCr-PC e BYCr-PME)

Os clones das construções plasmidiais foram submetidos à técnica de seqüenciamento para confirmação da clonagem da região codificadora da BYC. Ao DNA foram adicionados 1500 µl de Solução de PEG 8000 (item 3.1.2), incubado por 1 hora em gelo e centrifugado a 20.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido, o sedimento foi incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e dissolvido em 20 µl de água. As amostras purificadas foram misturadas a 0,5 µl dos primers na concentração de 2,5 pmol (item 3.1.8) seguido da adição de água para um volume final de 6 µl. Posteriormente, foram encaminhadas ao Centro de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS para seqüenciamento no aparelho MegaBACE 1000 (ABI Prism 3100). Para a análise das seqüências de nucleotídeos, foi utilizado o programa BioEdit versão 7.0.

3.3 Testes Imunoenzimáticos

3.3.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os géis de poliacrilamida foram preparados para uma concentração final de acrilamida 12% (item 3.1.3), foram adicionados às amostras 25% do volume de tampão de amostra (item 3.1.1). Após serem fervidas por 5 minutos, as amostras foram imediatamente aplicadas nos géis. Como controle foi utilizado um marcador de massa molecular pré-corado (item 3.1.4). O gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida (item 3.1.1) com corrente de 10 mA. Ao fim da migração as proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (item 3.3.2).

3.3.2 Western Blotting

Foi utilizado o método descrito por Dunn (1986). Após o término da migração das amostras no gel de poliacrilamida, este foi colocado em contato direto com uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (item 3.1.1.1) a 190 mA por 60 minutos. A transferência foi monitorada corando-se a membrana com vermelho de Ponceau 0,5% (p/v) em PBS (item 3.1.1.1) por 10 minutos. A membrana foi inicialmente descorada por lavagem com PBS (item 3.1.1.1) e a seguir bloqueada com solução de bloqueio (item 3.1.1.1) por 60 minutos a temperatura ambiente. A membrana foi então incubada por mais 2 horas à temperatura ambiente (ou durante a noite a 4°C) com o anticorpo primário diluído em solução de bloqueio (item 3.1.1.1). A membrana foi posteriormente lavada 3 vezes por 10 minutos com solução de bloqueio e incubada por 1 hora com anticorpo secundário diluído em solução de bloqueio (item 3.1.1.1). A membrana foi por fim lavada 3 vezes por 10 minutos com PBS e revelada com uma solução de NBT 0,03% (p/v) e BCIP 0,015% (p/v) em tampão de revelação fosfatase (item 3.1.1.1).

3.3.3 ELISA Indireto

O ensaio foi realizado de acordo com Johnstone & Thorpe (1982); Harlow & Lane (1988). As placas de polietileno foram sensibilizadas com 100 ng/poço de antígeno diluído em tampão carbonato-bicarbonato (item 3.1.12). O volume de 100 µl/poço foi distribuído e incubado por 16 horas a 4°C. As placas sensibilizadas foram lavadas por 3 vezes com PBS (item 3.1.1.1), por 10 minutos cada uma, e bloqueadas com 100 µl/poço de solução de bloqueio (item 3.1.1.1) durante 1 hora a 37°C. A seguir, foram adicionados aos poços 100 µl dos soros dos camundongos diluídos em solução de bloqueio (item 3.1.1.1) e incubado por 1 hora a 37°C. Ao final das incubações foram lavadas por 3 vezes com solução de bloqueio, por 10 minutos cada uma, e incubadas novamente com 100 µl por poço do anticorpo secundário durante 1 hora a 37°C. As placas, posteriormente, foram lavadas 3 vezes com PBS, por 10 minutos cada uma, e a reação revelada pela adição de 100 µl de uma solução de revelação (item 3.1.12) durante 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 12,5% (item 3.1.12) e as leituras das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplacas (Versamax – Molecular Devices), com filtro de 492 nm. Os resultados representam a média das duplicatas.

3.4 Inoculação dos Camundongos

Dois grupos de 6 camundongos BALB/C, com 6 semanas foram inoculados de acordo com a Tabela 1. Estes animais foram mantidos no biotério do Centro de Biotecnologia da UFRGS recebendo água e alimentação *ad libidum*. Nos dias anteriores às inoculações, os animais foram inoculados com o anestésico cloridrato de bupivacaína 0,75% (Cristália) via intramuscular (2,5 µl/grama - Tabela 1), agente causador de dano muscular, utilizado para estimular o sistema imune (WANG *et al.*, 2006). Os inóculos de 100 µg de DNA das construções BYCr-PC e BYCr-PME, foram aplicados via intramuscular na pata direita em

três doses com intervalos de 15 dias. Os animais controles receberam PBS ou os vetores pcDNA3 e pME18Neo sem insertos em três doses com intervalos de 15 dias.

Após a última dose, o sangue foi coletado da veia caudal, as amostras coletadas foram processadas para retirada do soro, através da centrifugação a 2.400 g por 5 minutos e, posteriormente os níveis de anticorpos específicos foram verificados por ELISA e Western-Blotting.

Tabela 1 - Esquema de inoculações dos camundongos

Grupo 1	Número Animais	Sexo	Peso (gramas)
BYCr-PME	2	F	21,15 19,60
Controle pME18Neo	2	F	20,90 20,75
Controle PBS	2	F	20,70 21,33
Grupo 2			
BYCr-PC	2	M	28 28
Controle pcDNA3	2	F	22 23
Controle PBS	2	M F	27 23,70

3.4.1 Avaliação da Resposta Imune

3.4.1.1 Preparação dos Extratos de Ovos

Para obtenção da forma nativa da proteína BYC e verificação do reconhecimento desta pelos soros dos camundongos inoculados, foi realizada a purificação protéica de ovos de *R. microplus* de 1 dia. Um grama de ovos foi macerado com PBS (item 3.1.1.1) com pistilo sobre gelo e centrifugados por 15 minutos a 12.000 g a 4°C. A seguir, foi adicionado ao extrato de ovo uma solução de inibidores de proteases (item 3.1.10) e este homogeneizado foi mantido em gelo por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada centrifugação a 32.000 g a 4°C por 40 minutos, o sobrenadante foi coletado e parte utilizado imediatamente no ensaio de atividade e quantificação protéica pelo método de Bradford modificado (BRADFORD, M.M, 1976). O restante do sobrenadante foi estocado a -70°C.

3.4.1.2 SDS-PAGE das Proteínas BYC Nativa e BYC Recombinante

Amostras protéicas de BYC nativa purificada de extrato de ovo (item 3.4.1.1) e BYC recombinante (0,8 µg/µl) (BYCr) purificada por Leal *et al.* (2006); foram submetidas à técnica de SDS-PAGE (item 3.3.1).

3.4.1.3 Western Blotting da Proteína BYC Recombinante

As frações anteriormente submetidas à técnica de SDS-PAGE 12% (item 3.4.1.2) foram submetidas ao protocolo de Western Blotting (item 3.3.2). Para aplicação da técnica, foram utilizados como antígeno 40 µg da proteína BYCr purificada e 150 µg da proteína BYC nativa purificada de extrato de ovo (item 3.4.1). Como anticorpo primário, foram utilizados os soros dos camundongos inoculados com as construções BYCr-PC e BYCr-PME diluídos 1:50 em solução de bloqueio (item 3.1.1.1) e como anticorpo secundário foi utilizado IgG de cabra

anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:5000 em solução de bloqueio.

3.4.1.3.1 Western Blotting de Competição

Para verificar a competição entre os anticorpos dos soros dos animais inoculados pelas proteínas BYC nativa e BYC recombinante foi realizada técnica de Western Blotting de competição. No gel de poliacrilamida 12% (item 3.1.3) foram aplicados 80 µg da proteína BYCr purificada por centímetro linear de gel e foram realizadas as técnicas de SDS-PAGE (item 3.4.1.2) e Western Blotting (item 3.3.2). A membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras de 3 mm contendo 10 µg de proteína e incubada com solução de bloqueio (item 3.1.1.2) por 1 hora a temperatura ambiente. Os soros dos animais inoculados (anticorpos primários) foram diluídos 1:50 e incubados por 1 hora com 100 ng ou 500 ng de proteína BYC nativa purificada. A seguir o soro foi utilizado para sondar as membranas com BYC recombinante, por incubação por 16 horas a 4°C. As tiras foram posteriormente incubadas por 1 hora com o IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:5000 em solução de bloqueio. A revelação foi feita pela adição de NBT/BCIP em tampão 100 mM Tris, 100mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5.

3.4.1.4 Titulação por ELISA das Imunoglobulinas G anti-BYC dos Soros dos Camundongos Inoculados

Os soros coletados dos camundongos duas semanas após a última inoculação foram utilizados para titulação das IgG por ELISA (item 3.3.3). Os antígenos BYCr purificada e BYC nativa foram utilizados para sensibilizar as placas de polietileno, como anticorpo primário foram utilizados os soros dos camundongos inoculados em diluições crescentes e seriadas (1:50 – 1:3200) em solução de bloqueio (item 3.1.1.1). A seguir, foi utilizado como anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgG camundongo, conjugado à peroxidase (Sigma), diluído 1:2000 em solução de bloqueio. As leituras das absorbâncias foram realizadas em

leitor de microplacas (Versamax – Molecular Devices), com filtro de 492 nm. Os soros dos camundongos inoculados foram considerados positivos quando apresentaram as leituras das absorbâncias superiores a média das leituras obtidas com o soro pré-imune (controle negativo). Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata.

3.5 Verificação da Expressão da Proteína BYC (BYCr-PC) em Linhagem Celular COS-1

3.5.1 Cultivo das Células COS-1

Células da linhagem COS-1 oriundas de rins de macacos africanos *Cercopithecus aethiops* (GLUZMAN, 1981) foram utilizadas para testes de expressão. As células foram descongeladas a 37°C (FRESHNEY, 1994; PERES & CURI, 2005), a seguir foram transferidas para tubos de centrífuga de 25 ml, adicionados 4 ml de meio DME-10% (item 3.1.11) e centrifugadas a 200 g por 6 minutos e o sobrenadante removido. Acrescentou-se 5 ml de meio DME-10% e novamente foi centrifugado a 200 g por 6 minutos e removido o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 1 ml de meio DME-10%, retirada uma alíquota de 50 µl da suspensão e misturada a 50 µl do corante azul de Tripán 0,3% (item 3.1.11). As células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas 5×10^5 células por garrafa de 25 ml. O cultivo de células foi mantido em 5 ml de meio DME -10% (item 3.1.11) em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Decorridos 30 minutos da incubação em estufa, o meio do cultivo foi removido e adicionado 5 ml de meio DME-10%. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias visando a manutenção das células para posterior realização da técnica de transfecção transitória.

3.5.2 Transfecção Transitória Mediada por Lipídios Catiônicos

A técnica de transfecção transitória foi realizada de acordo com STENMARK & ZERIAL, 1998. As células COS-1 mantidas em meio de cultura foram plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de 1×10^5 células/poço com 2 ml de meio DME-10% (item

3.1.11). O experimento foi realizado em duplicata. As células foram mantidas em cultivo celular até atingirem a confluência de 40-60%. No dia da transfecção foram misturados em microtubos: 100 µl de meio DME-O (item 3.1.11), 1 µg dos DNA de interesse: construções BYCr-PC, BYCr-PME, vetores sem insertos (pcDNA3 e pME18Neo) e o plasmídeo controle pcH 110 que contém a região codificadora da enzima β-galactosidase. Também foi realizado o controle das células COS-1 sem adição de DNA. A seguir, foram adicionados aos microtubos 6 µl de Reagente Plus (Invitrogen) (item 3.1.11) e foram mantidos por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados aos microtubos: 100 µl de meio DME-O (item 3.1.11), 4 µl do reagente Lipofectamina (Invitrogen) (item 3.1.11) e foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. Ao cultivo celular, foram adicionados 2 ml de DME-O e 1 ml da mistura DNA/Lipofectamina (790 µl de DME-O + 210 µl da mistura DNA/Lipofectamina) totalizando um volume de 3 ml por poço. As células foram incubadas por 5 horas na estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Após esse tempo, foi adicionado a cada poço 1 ml de DME-20% e incubado por 24 horas na estufa.

No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 3 ml de PBS-A (item 3.1.11). A seguir, o PBS-A foi removido e o fundo da placa de cultura foi raspado com auxílio de um rodinho plástico (Cell Scraper TPP) para colheita das células.

3.5.2.1 Avaliação da Expressão do Gene de Interesse

As células transfectadas (item 3.5.2) coletadas foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). A seguir, as amostras foram preparadas para aplicação no gel de poliacrilamida 12% (item 3.1.3) e realização das técnicas de SDS-PAGE (item 3.3.1) e Western Blotting (item 3.3.2). O anticorpo primário utilizado foi o monoclonal BrBm5 anti-BYC diluído 1:100 em solução de bloqueio (item 3.1.1.1) e o anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:5000 em solução de bloqueio.

3.5.2.2 Eficiência da Transfecção

A eficiência da transfecção transitória foi verificada conforme descrito por Peres & Curi (2005) através da co-transfecção da linhagem celular COS-1 com o DNA do plasmídeo repórter pcH 110, como descrito no item 3.5.2. Decorridas as 24 horas da transfecção, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 3 ml de PBS. Após a remoção do PBS, foi adicionada a solução fixadora (item 3.1.10) e foi incubada por 5 minutos a 4°C. Após a remoção da solução, as células foram lavadas duas vezes com PBS, removido o PBS e adicionada a solução reveladora (item 3.1.10) que foi incubada por 24 horas a 37°C no escuro. No dia seguinte, foi visualizado no microscópio ótico o número de células azuis.

3.6 Imunolocalização da Proteína BYC Recombinante (BYCr-PC)

Duas semanas após a terceira dose, os camundongos receberam um reforço de 100 µg da construção BYCr-PC, visando a imunolocalização da expressão da proteína BYC. Decorrido o período de 6 horas após o reforço os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e tiveram o músculo da pata direita removido. As amostras de músculo foram acondicionadas em formalina tamponada e processadas de acordo com Fernandes (1943), com modificações, até sua inclusão em parafina e posterior processamento das lâminas histológicas.

Para imunolocalização, os cortes com 5 µm, foram desparafinizados com xilol I e II por 15 minutos cada, hidratações em bateria com concentrações decrescentes de etanol (100%, 96%, 80%, 70%). O bloqueio da peroxidase endógena foi conduzido com peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos. Seguiu-se testando 5 protocolos de recuperações antigênicas: tripsina 0,1% por 15 minutos a 37°C, tampão citrato (pH 6,0) por 10 minutos em água fervente; protease XIV (Sigma) 15 minutos a temperatura ambiente; tampão citrato pH 6,0 em banho-maria a 100°C por 10 minutos; tampão Tris-EDTA pH 9,0, em banho-maria a 100°C, por 10 minutos e proteinase K por 1 minuto a temperatura ambiente.

Em seguida, procedeu-se ao bloqueio de aderências inespecíficas testando-se 3 protocolos: bloqueio por 15 minutos com solução de bloqueio (item 3.1.1.1); 30 minutos a temperatura ambiente com solução de bloqueio ou 20 minutos com soro suíno 1:100, o

material foi lavado com água destilada e incubado com anticorpo primário: monoclonal BrBm 5 anti-BYC em câmara úmida a 4°C por 16 horas. As lâminas foram testadas nas concentrações de 0,15 µg/lâmina, 0,075 µg/lâmina, 0,0378 µg/lâmina e 0,0189 µg/lâmina. Sequencialmente, os cortes foram lavados com água destilada e incubados com anticorpo secundário biotilado com estreptavidina (Kit LSAB/Dako) por 20 minutos a temperatura ambiente e lavados com PBS. A revelação foi realizada com DAB/peroxidase por 5 a 10 minutos até adquirir coloração marrom e a hematoxilina foi utilizada na contra-coloração. Para análise por microscopia óptica, as lâminas foram desidratadas em bateria crescente de etanol, clarificadas em xileno e montadas com auxílio de entelan.

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem da região codificante da Proteína BYC

Os clones obtidos das construções plasmidiais (BYCr-PC e BYCr-PME) foram testados por PCR, com *primers* específicos para a seqüência do gene da BYC e por hidrólise com as endonucleases *EcoRI* e *XbaI* sendo verificada a presença de um inserto com tamanho esperado de 1100 pb (Figura 3). O teste com a enzima de restrição *Bgl II*, que cliva internamente a região codificante da BYC, corroborou para confirmação da clonagem (Figura 4).

Os clones das construções plasmidiais BYCr-PC e BYCr-PME (item 3.2.4), foram seqüenciados confirmando a presença do inserto correspondente a região codificante da proteína BYC.

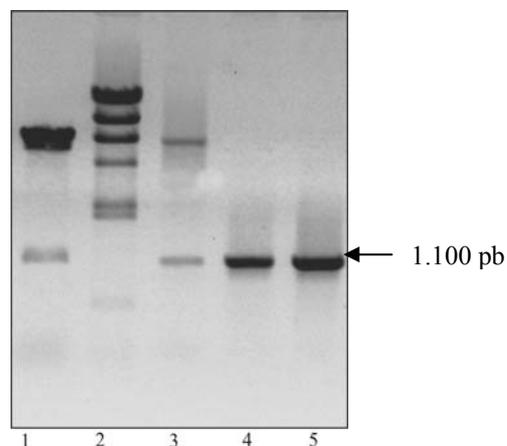


Figura 3 - Análise das construções plasmidiais (BYCr-PC e BYCr-PME) por hidrólise com *EcoRI* e *XbaI* e PCR, em gel de agarose 0,8%. **Linha 1:** clone 1 (BYCr-PC) submetido à hidrólise com *EcoRI* e *XbaI* ; **Linha 2:** Marcador de massa molecular DNA Lambda *HindIII*, **Linha 3:** clone 2 (BYCr-PME) submetido à hidrólise com *EcoRI* e *XbaI*, **Linha 4:** PCR clone 1 (BYCr-PC) , **Linha 5:** PCR clone 2 (BYCr-PME). A seta indica o fragmento liberado pela hidrólise.

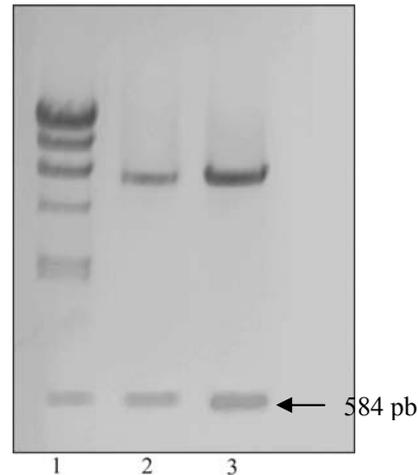


Figura 4 - Análise das construções plasmidiais (BYCr-PC e BYCr-PME) após hidrólise com *Bgl II*, em gel de agarose 0,8%. **Linha 1:** Marcador de massa molecular DNA Lambda *HindIII*, **Linha 2:** clone 1 (BYCr-PC), **Linha 3:** clone 2 (BYCr-PME). A seta indica o fragmento correspondente liberado pela hidrólise.

4.2 Expressão da Proteína BYC (BYCr-PC) em Células COS-1

Para avaliar a expressão da proteína BYC por células COS-1, foi realizado o protocolo de transfecção transitória mediada por lipídios catiônicos (item 3.5.2).

A expressão da proteína foi testada por Western Blotting utilizando o anticorpo monoclonal BrBm 5 anti-BYC (diluição de 1:100) (item 3.5.2.1). No entanto, não houve a detecção de uma banda de aproximadamente 40 kDa correspondente à proteína BYC recombinante.

Para verificar a eficiência da técnica de transfecção (item 3.2.7.2.2), foram utilizadas as células COS-1 não transfectadas e células COS-1 transfectadas com o plasmídeo repórter pcH110, (cedido gentilmente pela Professora Ana Paula Ravazzolo) de modo que as células expressando β -galactosidase tornaram-se azuis na presença do substrato X-gal (Figura 5).

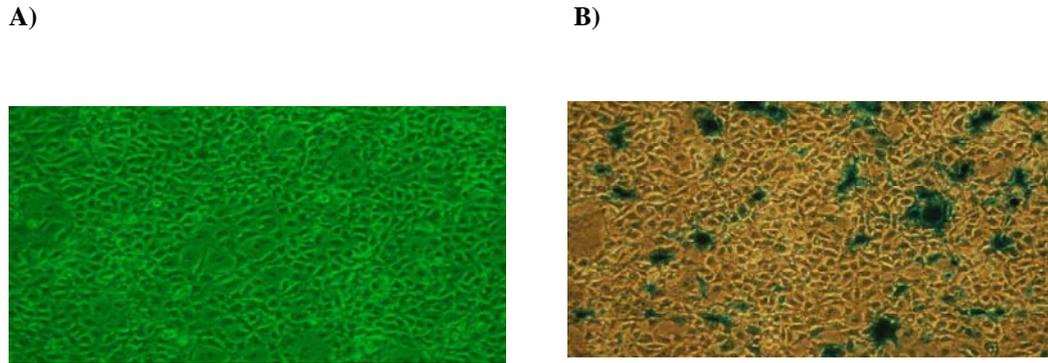


Figura 5 - Transfecção transitória em células de mamíferos COS-1.
A) Controle negativo: células não transfectadas; **B)** Controle positivo: transfecção com o plasmídeo pcH110.

4.3 Imunogenicidade da Proteína BYC em Camundongos

Para verificar a imunogenicidade da construção BYCr-PC inoculada nos camundongos, foram utilizadas as técnicas de Western Blotting (item 3.4.1.3) e ELISA Indireto (item 3.4.1.4).

4.3.1 Western Blotting

A resposta humoral foi mensurada duas semanas após a 2^a dose, quando os camundongos inoculados com a construção BYCr-PC produziram níveis de IgG anti-BYC detectáveis, na diluição de 1:50, através da técnica de Western Blotting (item 3.4.1.3). O padrão de reconhecimento dos soros dos camundongos inoculados com BYCr-PC foi analisado, sendo detectada uma banda de aproximadamente 40 kDa correspondente a proteína BYCr (Figura 6) e uma intensa banda na posição esperada de aproximadamente 50 kDa correspondente a proteína BYC nativa (Figura 7). Os camundongos inoculados com PBS ou com os vetores de expressão sem inserto (pcDNA3) serviram como controle do experimento de inoculação.

Os soros dos animais inoculados intramuscularmente com a construção BYCr-PME, quando avaliados pela técnica de Western Blotting, não apresentaram resposta humoral detectável (Figura 8).

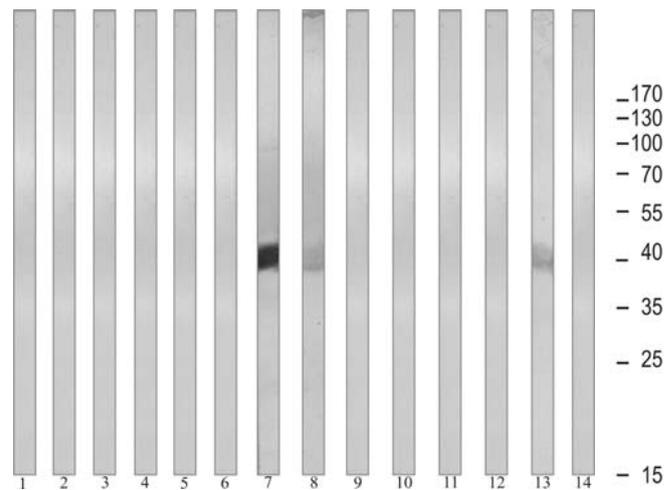


Figura 6 - Análise por Western Blotting da proteína BYCr, sondada com os soros dos camundongos inoculados com BYCr-PC (soros diluído 1:50).

Linha 1: soro pré-imune camundongo 1, **Linha 2:** soro pré-imune camundongo 2, **Linha 3:** soro pré-imune vetor pcDNA3 1, **Linha 4:** soro pré-imune pcDNA3 2, **Linha 5:** soro pré-imune PBS 1. **Linha 6:** soro pré-imune PBS 2, **Linha 7:** soro camundongo 1 inoculado com BYCr-PC 1, **Linha 8:** soro camundongo 2 inoculado com BYCr-PC 2, **Linha 9:** soro camundongo controle pcDNA3 1, **Linha 10:** soro camundongo controle pcDNA3 2, **Linha 11:** soro camundongo controle PBS 1, **Linha 12:** soro camundongo controle PBS 2, **Linha 13:** controle positivo monoclonal BrBm 5, **Linha 14:** controle negativo conjugado.

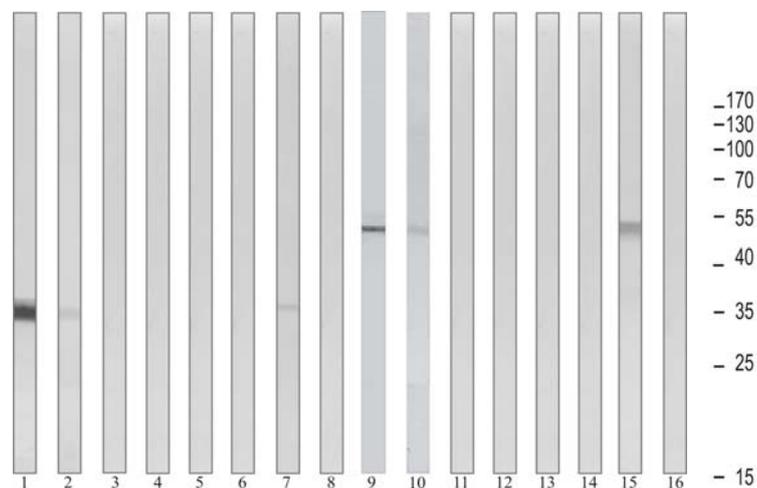


Figura 7 - Análise por Western Blotting das proteínas BYC nativa e BYCr, sondadas com os soros dos camundongos inoculados com BYCr-PC (diluído 1:50).

A) BYC recombinante: **Linha 1:** soro camundongo 1 inoculado com BYCr-PC, **Linha 2:** soro camundongo 2 inoculado com BYCr-PC, **Linha 3:** soro controle pcDNA3 1, **Linha 4:** soro controle pcDNA3 2, **Linha 5:** soro controle PBS 1 **Linha 6:** soro controle PBS 2, **Linha 7:** controle positivo monoclonal BrBm5, **Linha 8:** controle negativo conjugado, **B) BYC nativa:** **Linha 9:** soro camundongo 1 inoculado com BYCr-PC, **Linha 10:** soro camundongo 2 inoculado com BYCr-PC, **Linha 11:** soro controle pcDNA3 1, **Linha 12:** soro controle pcDNA3 2, **Linha 13:** soro controle PBS 1, **Linha 14:** soro controle PBS 2, **Linha 15:** controle positivo monoclonal BrBm 5, **Linha 16:** controle negativo conjugado.

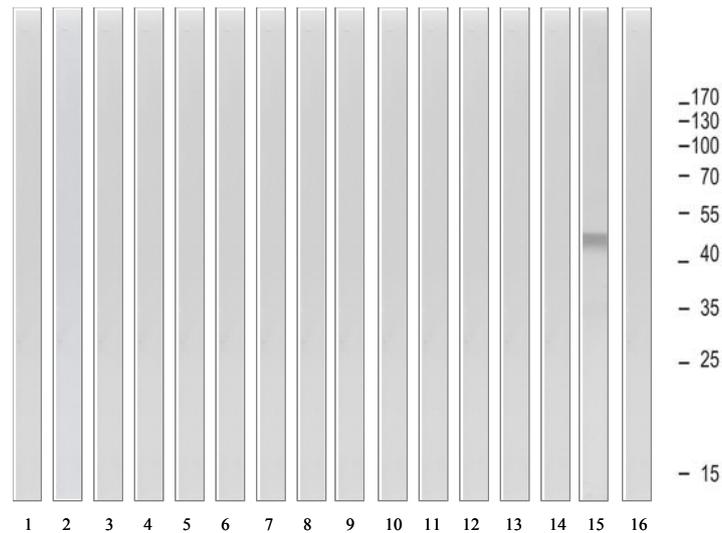


Figura 8 - Análise por Western Blotting da proteína BYCr sondada com os soros dos camundongos inoculados com BYCr-PME (diluído 1:50).

Linha 1: soro pré-imune camundongo 1, **Linha 2:** soro pré-imune camundongo 2, **Linha 3:** soro pré-imune vetor pME18Neo 1, **Linha 4:** soro pré-imune pME18Neo 2, **Linha 5:** soro pré-imune PBS 1. **Linha 6:** soro pré-imune PBS 2, **Linha 7:** soro camundongo 1 inoculado com BYCr-PME 1, **Linha 8:** soro camundongo 2 inoculado com BYCr-PME 2, **Linha 9:** soro camundongo controle pME18Neo 1, **Linha 10:** soro camundongo controle pME18Neo 2, **Linha 11:** soro camundongo controle PBS 1, **Linha 12:** soro camundongo controle PBS 2, **Linha 13:** controle positivo: anticorpo monoclonal BrBm 5, **Linha 14:** controle negativo conjugado.

4.3.1.1 Western Blotting de Competição dos Soros dos Camundongos

A presença de anticorpos que reconhecem epítomos comuns entre as proteínas BYC recombinante e BYC nativa foi analisada pela técnica de Western Blotting de competição (item 3.4.1.3.1). A proteína BYC nativa foi incubada com o soro dos animais inoculados e atingiu um platô quando competindo com 500 ng de antígeno solúvel, havendo o desaparecimento da banda correspondente a BYCr (Figura 9).

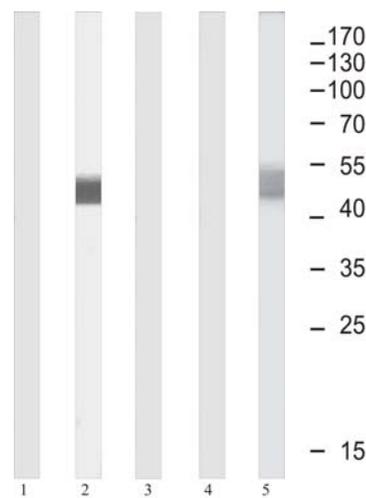


Figura 9 - Análise por Western Blotting da proteína BYCr, sondada com soro dos camundongos inoculados com BYCr-PC e competindo com BYC nativa. **Linha 1:** soro camundongo 1 anti-BYCr-PC, (2 doses) competindo com BYC nativa; **Linha 2:** soro camundongo 1 BYCr-PC (2 doses); **Linha 3:** controle negativo conjugado; **Linha 4:** soro camundongo 2 BYCr-PC (2 doses) competindo com 500ng de BYC nativa; **Linha 5:** soro camundongo 2 BYCr-PC (2 doses).

4.3.1.2 Titulação por ELISA dos Soros dos Camundongos Inoculados

Os títulos dos soros dos camundongos inoculados foram determinados pela técnica de ELISA Indireto (item 3.4.1.4) e comprovaram a imunogenicidade da proteína BYCr (BYCr-PC).

A produção de anticorpos foi capaz de reconhecer epítomos da proteína, tanto da forma recombinante, como da nativa (com exceção do camundongo 2). Os títulos foram de 1.200 para o camundongo 1 inoculado com construção BYCr-PC, tanto para a proteína BYCr, como para a proteína BYC nativa. O camundongo 2 apresentou título de 1.100 somente quando foi utilizado como antígeno a proteína BYCr (Figuras 10 e 11).

A cinética de produção de anticorpos demonstrou que não houve, após a terceira dose da inoculação com a construção BYCr-PC, aumento significativo do título do soro do camundongo 1 (Figura 12). O camundongo 2 não recebeu a terceira dose, em decorrência de óbito.

Os camundongos inoculados com PBS e com os vetores sem inserto, não desenvolveram anticorpos detectáveis para BYC.

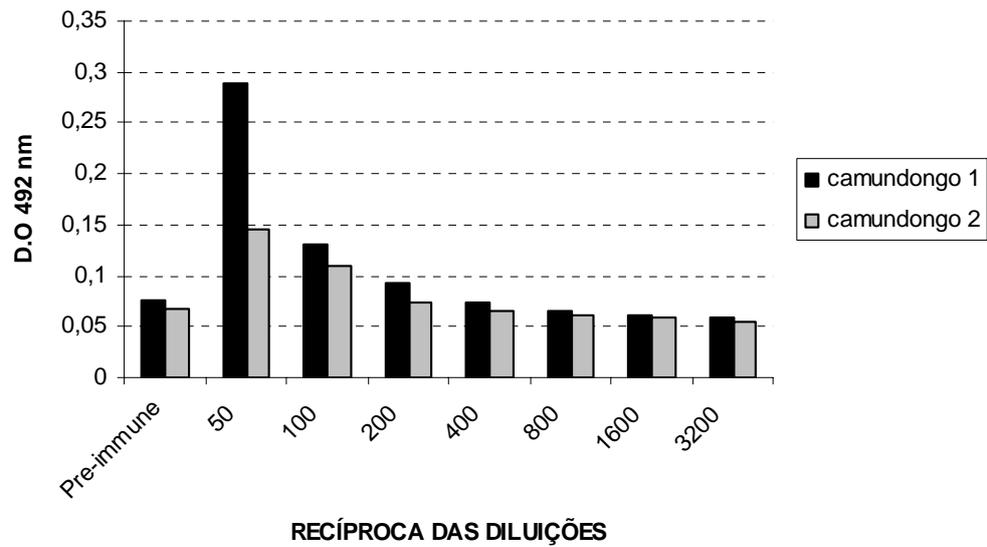


Figura 10 - Titulação por ELISA dos soros dos camundongos inoculados com BYCr-PC (placa sensibilizada com a proteína BYCr). Os soros dos camundongos foram detectados com anticorpo anti-IgG camundongo conjugado à peroxidase (diluído 1:2000). Os resultados representam a média das duplicatas.

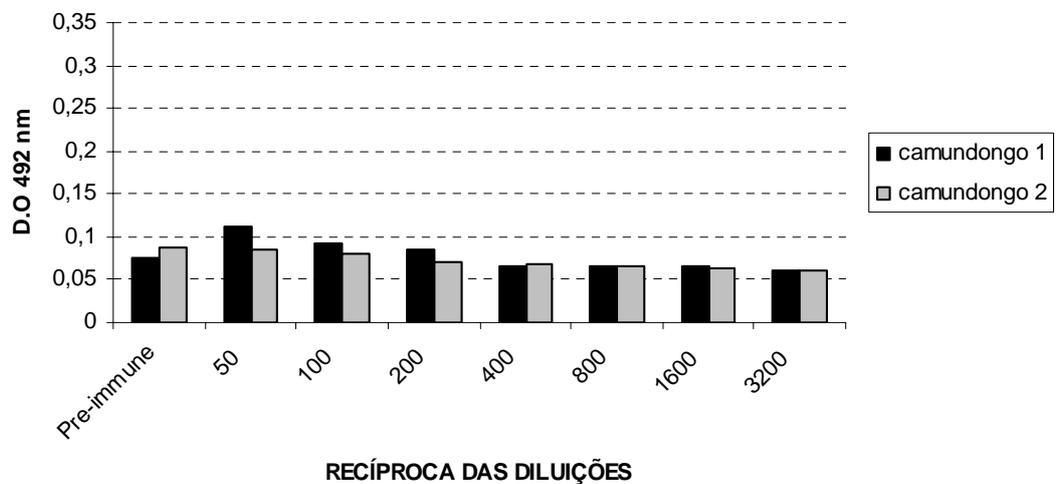


Figura 11 - Titulação por ELISA dos soros dos camundongos inoculados com a construção BYCr-PC (placa sensibilizada com a proteína BYC nativa). Os soros dos camundongos foram detectados com anticorpo conjugado peroxidase anti-IgG camundongo (diluído 1:2000). Os resultados representam a média das leituras dos soros de cada animal.

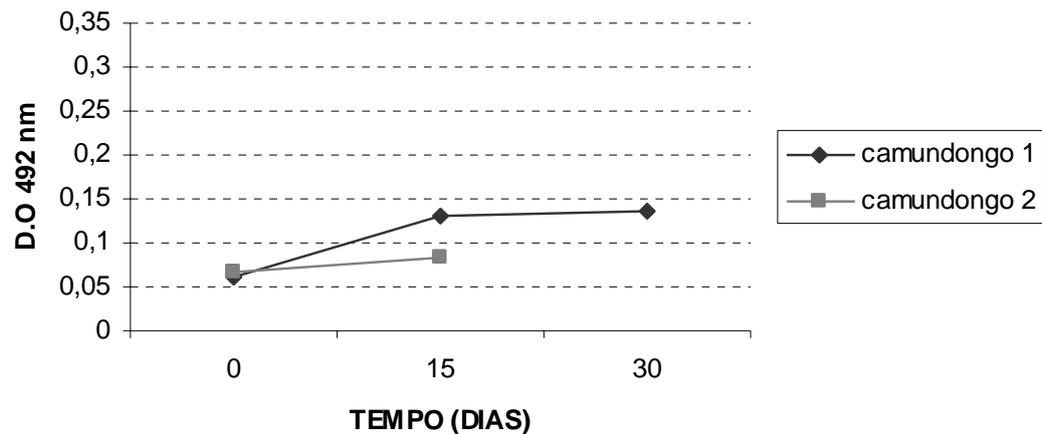


Figura 12 - Cinética da resposta imune humoral dos camundongos inoculados com a construção BYCr-PC. As placas foram sensibilizadas com a proteína BYCr por 16 horas. Os soros dos camundongos foram detectados com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (diluído 1:2000). Os resultados representam a média das leituras das duplicatas de cada animal.

4.4 Imunolocalização da Proteína BYC Recombinante (BYCr-PC)

Os cortes histológicos de músculo dos camundongos inoculados com a construção BYCr-PC foram analisados pela técnica de imunohistoquímica, visando a localização da expressão da proteína BYC (item 3.6). A localização da proteína BYC nos cortes histológicos foi possível com a utilização da recuperação antigênica com o tampão Tris-EDTA pH 9,0, em banho-maria, por 10 minutos, bloqueio de aderências inespecíficas 30 minutos com solução bloqueio (item 3.1.1.1), e com o anticorpo monoclonal BrBm 5 anti-BYC na concentração de 3,78 µg/lâmina conforme Figura 13. Todos os animais controle que foram inoculados com PBS ou com os vetores sem inserto (pcDNA3 e pME18Neo) foram negativos (Figura 13).

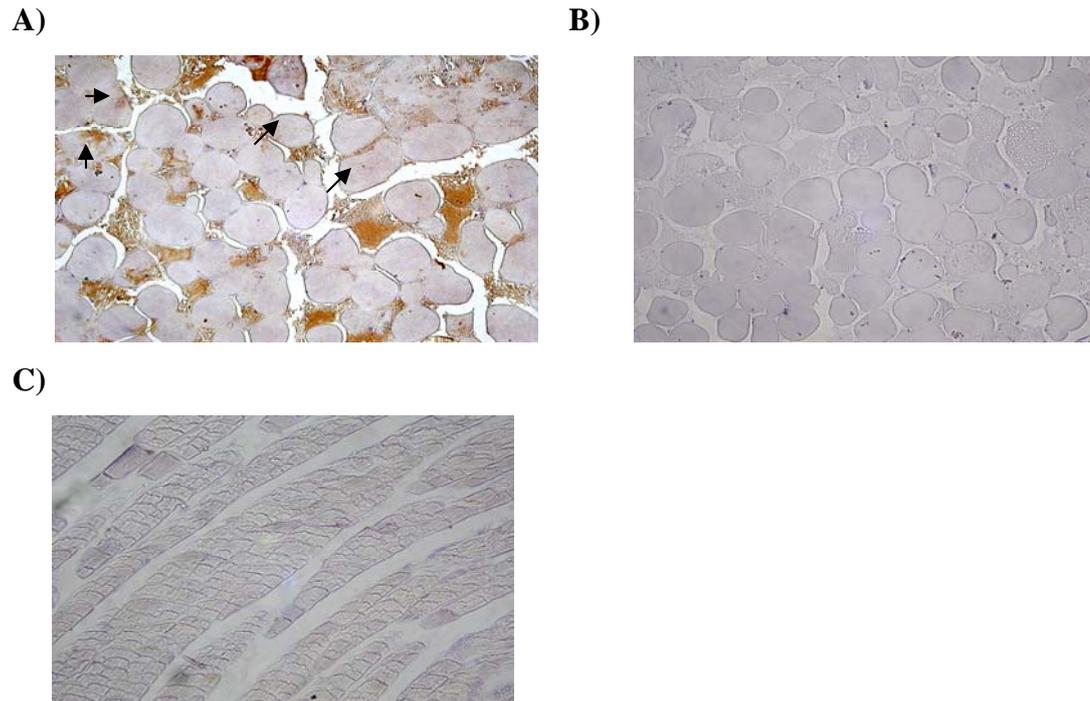


Figura 13 - Imunolocalização da proteína BYC recombinante (BYCr-PC) nos músculos dos animais inoculados. **A)** camundongo inoculados com BYCr-PC, sondado com anticorpo monoclonal BrBm5 (3,78 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), **B)** camundongo inoculado com BYCr-PC sondado com PBS. Aumento original 40X. **C)** camundongo controle inoculado com PBS e sondado com anticorpo monoclonal BrBm5. As setas indicam uma discreta marcação dentro das células musculares nos animais inoculados com BYCr-PC. Aumento original 20X.

5 DISCUSSÃO

Estratégias para o controle de carrapatos possuem grande importância médica e veterinária e suas limitações atuais tornam necessária a busca por métodos alternativos. Como destaque, a ideia do controle de carrapatos por vacinação iniciou-se nos anos 70, no entanto o progresso no desenvolvimento de vacinas efetivas tem sido lento, devido à dificuldade de localizar proteínas adequadas para serem utilizadas em uma vacina.

O desenvolvimento de uma vacina é um processo longo e complexo, necessita da identificação e avaliação sistemática de antígenos candidatos, incluindo a definição dos mecanismos imunológicos induzidos pelos antígenos e o desenvolvimento de métodos sustentáveis para produção dos imunógenos artificialmente (p. ex. sistemas de expressão de proteínas em bactérias) (NUTTALL *et al.*, 2006).

Em geral, dois tipos de antígenos alvos são explorados para o desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato. Os primeiros são os antígenos convencionais naturalmente expostos ao sistema imune do hospedeiro durante a fase parasitária, como as proteínas secretadas na saliva durante a fixação e alimentação no hospedeiro, estes são chamados de antígenos expostos (WILLADSEN & KEMP, 1988; NUTTALL *et al.*, 2006). Em contraste, os antígenos ocultos são aqueles que não estimulam resposta imune do hospedeiro durante as infestações naturais, devido a sua localização no parasito, porém, no animal vacinado contra estes antígenos, os anticorpos e outros fatores imunológicos que estariam presentes no sangue ingerido causariam danos e inibição de suas funções (WILLADSEN & KEMP, 1988; WILLADSEN *et al.*, 1993). Estes antígenos podem ser purificados de órgãos/tecidos como a vitelina dos ovos, a paramiosina do extrato de intestino e glândulas salivares de fêmeas parcialmente ingurgitadas, e extrato de corpo gorduroso de fêmeas (TELLAM *et al.*, 2002).

Há mais de 10 anos, Willadsen *et al.*, (1995, 1996), propuseram o uso do antígeno oculto Bm86 de *R. microplus* na confecção das vacinas comerciais presentes hoje no mercado (TickGard e Gavac), para proteção de bovinos contra infestações de carrapatos na Austrália. No entanto, a campo, a imunização com estas vacinas não asseguram um grau de proteção suficiente para serem utilizadas sem o uso concomitante de acaricidas (PREVOT *et al.*, 2007). Outros antígenos têm sido associados à Bm86 para aumentar a eficiência da resposta imune em bovinos, como a Bm91, outro antígeno oculto (RIDING *et al.*, 1994; WILLADSEN *et al.*, 1996).

Neste contexto, Logullo *et al.* (1998) purificaram um precursor de proteinase aspártica de *R. microplus*, a BYC (*Boophilus* Yolk Pro-Cathepsin), um outro exemplo de “antígeno oculto”. Sugere-se que este antígeno tenha papel na degradação da vitelina pelo embrião durante a embriogênese, pois em experimentos de inóculo de anticorpos monoclonais anti-BYC em teleóginas, no início da postura, demonstraram uma redução no peso de ovos postos e na sobrevivência das teleóginas durante a postura, quando comparado com o grupo controle. Os parâmetros analisados apresentaram uma correlação significativa com a dose de anticorpo monoclonal inoculado nas teleóginas (DA SILVA VAZ Jr. *et al.*, 1998). Os dados de imunoproteção obtidos com a proteína BYC recombinante em sistema heterólogo (LEAL, *et al.*, 2006) foram similares aos obtidos na imunização de bovinos com a proteína BYC nativa (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998), indicando a possibilidade de uso da forma recombinante como imunógeno.

O reconhecimento da proteína nativa por anticorpos gerados contra a proteína recombinante é importante, pois proteínas recombinantes destinadas à utilização como imunógenos devem apresentar epítomos que possam induzir anticorpos imunoprotetores, sendo o ponto de partida para investigação de potencial vacinal de um antígeno recombinante (SOLOMON *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2004). Tendo em vista o potencial da proteína BYC recombinante como antígeno candidato, o objetivo deste trabalho foi avaliar sua capacidade imunogênica para o desenvolvimento de uma vacina de DNA.

Uma nova geração de vacinas, as vacinas genéticas ou vacinas de DNA, que consistem no vetor codificando o DNA dos antígenos e com capacidade de expressar em células eucarióticas, vem sendo avaliadas como vacinas profiláticas e tratamentos terapêuticos para doenças infecciosas, parasitárias (DE LA FUENTE *et al.*, 2000; RUIZ *et al.*, 2007), alergias ou câncer (SANCHEZ *et al.*, 2001; DUMONTEIL *et al.*, 2003; LEITNER and THALHAMER, 2003; LIU, 2003; MUTHUMANI *et al.*, 2003).

Em comparação com as vacinas com proteínas recombinantes, patógenos mortos ou inativados, as vacinas de DNA possuem inúmeras vantagens, como por exemplo, indução de uma significativa resposta celular, não possuem os riscos associados às vacinas atenuadas além do processo de purificação do DNA plasmidial ser mais rápido e econômico em relação ao requerido por proteínas recombinantes (BABIUK *et al.*, 1999; TIGHE *et al.*, 1998).

No presente trabalho, a região codificante da proteína BYC previamente clonada no vetor procarioto pET32b (LEAL *et al.*, 2006) foi sub-clonada em dois vetores de expressão eucariotos. O vetor comercial pcDNA3 (Invitrogen) possui promotor de citomegalovírus (CMV) que auxilia na expressão do DNA pelas células eucariotas, promotor T7 é o sítio de

ligação no DNA onde se liga a RNA-polimerase, ori de SV40 para replicação em células de mamíferos, resistência a ampicilina e neomicina, que são marcas de seleção para preparação de linhagens estáveis de células e é rotineiramente utilizado em experimentos de desenvolvimento de vacina de DNA (YU *et al.*, 2001, VECINO *et al.*, 2002, SUN *et al.*, 2006) e o vetor não comercial pME18Neo (gentilmente cedido pelo Laboratório de Doenças Infecciosas de Hokkaido (Japão) possui promotor de Simian Vírus 40 (SV40) o qual proporciona alto nível de transcrição, *ori* para replicação em bactéria e resistência à ampicilina e neomicina que são marcas de seleção para preparação de linhagens estáveis de células e é comumente utilizado em estudos de mutação gênica (NAGATA *et al.*, 1995; TAJIMA *et al.*, 1998; TAJIMA & AINDA, 2000).

Com o seqüenciamento e hidrólise das construções com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI* (Figuras 3 e 4) confirmou-se a correta clonagem da região codificante da proteína BYC nos vetores de expressão e os dois vetores avaliados permitiram a expressão da proteína recombinante em qualidade e quantidade suficiente para os experimentos descritos.

Para avaliar-se *in vitro* a expressão da região codificante da proteína BYCr, foi realizado o experimento de transfecção. As técnicas utilizadas rotineiramente para introdução de DNA em cultivos celulares são: fosfato de cálcio (GRAHAM & VAN DER EB, 1973), DEAE-dextran (MCCUTCHAN & PAGANO, 1968), eletroporação (NEUMANN *et al.*, 1982; POTTER *et al.*, 1984) e mediada por lipossoma (FELGNER *et al.*, 1987, 1989, 1994).

Existem dois tipos de transfecção que são rotineiramente utilizados em sistemas de células de mamíferos: transfecção transitória e estável/permanente. No sistema de transfecção transitória o DNA alcança o núcleo e é transcrito por um tempo limitado entre 24 e 72 horas após a introdução do DNA nas células. Geralmente, o objetivo da transfecção transiente é promover uma grande expressão do gene transferido em um curto espaço de tempo. Este sistema não é útil para a geração de linhagens permanentemente transfectadas. Para alguns tipos de estudos, o gene de interesse deve ser integrado conservando-se o cromossomo da célula. Neste caso, deve ser utilizado o sistema de transfecção estável, o que permite que o gene, estavelmente integrado, duplique eficientemente e seja mantido durante a divisão celular (PERES & CURI, 2005). No presente experimento, utilizamos o sistema de transfecção transitória mediada por lipossomos catiônicos que funcionam por interação eletrostática espontânea entre sua carga positiva e a carga negativa do DNA devido aos agrupamentos fosfato presentes em cada nucleotídeo. Quando o lipossomo e o DNA são misturados, ocorre a formação de um complexo lipossomo-DNA. O mecanismo de liberação do DNA dentro da célula tem sido estudado por vários métodos. Possivelmente, o mecanismo

envolve uma etapa de adesão do complexo lipossomo-DNA na célula, seguida de endocitose do complexo, liberando o DNA no citoplasma (ZAHA *et al.*, 2003). O DNA entra no núcleo e é expresso por um tempo limitado, sendo posteriormente degradado e, por isso, as análises foram feitas 24 horas após a introdução do DNA nas células. No experimento de transfecção transitória com lipossomas, a linhagem celular COS-1 foi transfectada com o DNA das construções BYCr-PC e BYCr-PME, com o auxílio do reagente Lipofectamina (Invitrogen), formulação que contém lipídios policatiônicos com alta eficiência de transfecção neste tipo de células (HAWLEY-NELSON *et al.*, 1993). A transfecção transitória das células COS-1 e expressão da proteína BYC não foram confirmadas, por ELISA e Western-blot, quando utilizado o anticorpo monoclonal BrBm5 anti-BYC. Existem inúmeros fatores que podem ter influenciado na falha da expressão da proteína BYC pela linhagem celular COS-1, no entanto, sabe-se que a eficiência da técnica é dependente da pureza do DNA e que, frequentemente, a toxicidade que afeta fibroblastos e células epiteliais deve-se a impurezas. Além disso, os ensaios de transfecção transitória são mais efetivos com preparações de plasmídeos/DNA supercondensados (GROLL *et al.*, 2006) que facilitam a incorporação pela célula. De acordo com TILKINS *et al.*, 1998; PERES & CURI, 2005; também pode-se citar o número de passagens celulares, tempo de incubação, densidade das células no momento da transfecção e metodologia utilizada para aplicação da técnica.

Como os controles funcionaram, as razões mais prováveis para a não expressão da proteína BYCr pelas células eucarióticas seriam os vetores utilizados nas construções recombinantes (BYCr-PC e BYCr-PME), porém sabe-se que ambos vetores utilizados possuem promotores virais de citomegalovírus e simianvirus, que são os promotores favoritos para expressão de genes heterólogos em células de mamíferos, ou ainda, a concentração do DNA, pois em muitos tipos de células testadas, quantidades relativamente pequenas de DNA são absorvidas e expressas, no entanto, concentrações elevadas de DNA em certas preparações lipossômicas podem tornar-se inibitórias (PERES & CURI, 2005).

Outra possibilidade, seria que o plasmídeo repórter pCH110, utilizado como controle positivo, por ser menor que os plasmídeos que continham a região codificante da BYC seria internalizado de maneira mais eficiente pelas células eucarióticas (HENRIQUES *et al.*, 2007)

Na fase experimental seguinte, as vacinas de DNA candidatas (BYCr-PC e BYCr-PME) foram testadas no ensaio de inoculação de camundongos. A partir da segunda dose de BYCr-PC os títulos de anticorpos foram significativos quando comparados com os animais inoculados com PBS ou com o vetor de expressão sem inserto. A construção BYCr-PME não induziu resposta significativa no experimento de inoculação (Figura 8).

Para avaliar a imunogenicidade das formas recombinantes, foram testados por Western-blotting, a BYC nativa e a BYC recombinante com soro anti-BYC obtido dos animais inoculados com a construção BYCr-PC. Os resultados revelaram que a inoculação com DNA induziu a produção de anticorpos que reconheceram os antígenos BYC nativa (Figura 6) ou BYC recombinante (Figura 7). Na utilização de proteínas recombinantes como imunógenos, é de suma importância o reconhecimento de algum epítipo em comum com a proteína nativa (SOLOMON *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2004, LIAO *et al.*, 2007).

A proteína Bm86, quando expressada em *E. coli*, células de insetos ou *Pichia pastoris* e utilizada em experimentos de vacinação, conferiu proteção em bovinos infestados semelhante a proteção obtida com a proteína nativa (TELLAM *et al.*, 1992, WILLADSEN, 2006). Este padrão de reconhecimento, tanto da proteína nativa como da recombinante, pelos animais inoculados já havia sido observado em experimentos de vacinação no Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal, quando Leal *et al.* (2006) utilizando sistema heterólogo para produção da proteína BYCr, imunizaram um grupo de bovinos e desafiaram com larvas de *R. microplus*. Os soros dos bovinos inoculados reconheceram a proteína BYC nativa. Os resultados do desafio mostraram uma proteção parcial contra a infestação, com 25% de proteção global, a qual corresponde a interação de parâmetros como número de fêmeas ingurgitadas, postura e fertilidade dos ovos de carrapatos provenientes de bovinos vacinados e bovinos controles.

Para corroborar a hipótese da presença de epítipos comuns entre as proteínas nativa e recombinante, a proteína BYC nativa foi incubada com o soro dos animais inoculados (item 3.4.1.3.1). Quando este soro foi testado por Western-blot contra a proteína recombinante não houve o reconhecimento da banda correspondente a proteína BYCr na posição esperada de aproximadamente 40 kDa (Figura 9), comprovando assim, a presença de epítipos antigênicos comuns entre as diferentes formas de expressão da BYC.

Ao avaliar-se a resposta imune humoral contra a proteína BYC nos camundongos inoculados com a BYCr-PC, com a realização da técnica de ELISA foram detectados níveis de IgG contra BYC nativa e recombinante após a segunda dose, sugerindo que os anticorpos direcionados à proteína recombinante também reconheceram a proteína nativa. Os títulos de anticorpos observados nos camundongos inoculados comprovaram a imunogenicidade da proteína BYC, que induziu a produção de anticorpos capazes de reconhecer epítipos tanto na forma recombinante quanto na nativa, somente por um camundongo.. Os títulos foram de 1.200 para o camundongo 1 inoculado com a construção BYCr-PC quando testado contra a proteína BYC recombinante purificada e proteína BYC nativa (Figuras 10 e 11). O animal 2

apresentou título de 1.100 quando testado contra BYCr (Figura 10), já para BYC nativa o animal não apresentou título significativo em relação ao controle do soro pré-imune (Figura 11). Apesar dos camundongos serem isogênicos, é possível que, devido ao pequeno número de animais avaliados, as diferenças nos títulos sejam variações individuais, sendo necessário testar um número maior de animais. De acordo com Andersen *et al.*, 2004, a linhagem de camundongos BALB/C, que constitui uma das 400 linhagens *inbred* de camundongos que são regularmente utilizadas graças à sua uniformidade genética, uma vez que todos os indivíduos reagem praticamente da mesma maneira a uma situação experimental, ou seja, a variância dos resultados experimentais deve ser muito pequena. A cinética de produção de anticorpos demonstrou que não houve aumento significativo dos títulos, após a segunda dose de BYCr-PC (Figura 12). Conforme, descrito por Harlow & Lane, 1988, um aumento significativo dos anticorpos específicos para o antígeno inoculado é primeiramente detectado de 5-6 dias após a primeira dose de antígeno. Os anticorpos são usualmente detectados no soro sete dias após a inoculação e persistem em níveis baixos por poucos dias, alcançando o pico em torno do 10º dia. Recomenda-se o reforço vacinal com intervalo máximo de 2-3 semanas entre as doses. A resposta de anticorpos à segunda dose aumenta exponencialmente atingindo um pico entre os dias 3 e 4, os anticorpos no soro são detectados neste período, porém o pico ocorre em torno dos dias 10-14. Tipicamente, altos níveis de anticorpos persistem por aproximadamente 2-4 semanas após a segunda dose. A resposta a terceira e subsequentes inoculações, de um modo geral, reflete aquela da segunda dose. O camundongo 2 não recebeu à terceira dose vacinal, em decorrência de óbito, provavelmente pela dose previamente inoculada de anestésico (Cloridrato de Bupivacaína 0,75%).

Os animais inoculados com a construção BYCr-PME não produziram níveis detectáveis de anticorpos contra a proteína BYC. Uma hipótese para que os animais inoculados não tenham produzido anticorpos seria a diferença entre os promotores utilizados. O vetor pcDNA3 apresenta promotor CMV que, normalmente, é mais eficiente neste tipo de expressão e também apresenta outras características (como por exemplo, promotor T7, origem fl, ori de SV40, origem pUC, seqüência de poliadenilação BGH, sinal de poliadenilação SV40pA.) que possam resultar em uma expressão mais eficiente. Outra hipótese, seria a falha em relação à manipulação como, por exemplo, a dose prévia de anestésico.

Como não houve aumento significativo no título de anticorpos após a terceira inoculação (Figura 12), sugere-se alterações no protocolo de inoculação com a proteína BYC, como, por exemplo, a utilização de adjuvantes genéticos baseados em citocinas ou moléculas co-estimuladoras como por exemplo, IFN γ para aumentar a eficiência de vacinas de DNA

(AUCOUTURIER *et al.*, 2001, SINGH & O'HAGAN, 2003). Ainda pode-se citar a utilização de um primeiro reforço com vacina protéica visando aumentar os títulos de anticorpos (RAMSHAW & RAMSAY, 2000; GONZALEZ *et al.*, 2005; ZAVALA-SPINETTI *et al.*, 2006).

Para complementar o trabalho, foram realizados estudos de imunolocalização da proteína BYC nos músculos dos animais inoculados com a construção BYCr-PC. Na análise dos cortes pode-se observar que a proteína BYC foi expressa em pequenas quantidades no local das inoculações (Figura 13), fato que não impediu a indução da resposta humoral nos camundongos inoculados com a construção BYCr-PC. Em outros trabalhos, estudos de imunohistoquímica e microscopia eletrônica mostraram que o DNA injetado nas fibras musculares de camundongos é degradado em pouco tempo após a inoculação (WAWRZYNIEC & WEDRYCHOWICZ 2001; DAVIS *et al.*, 1997). Estudos demonstram que a expressão do DNA nas fibras musculares no local da inoculação não é requerida para manutenção da resposta imune, pois as células apresentadoras de antígenos migram do local da inoculação para mediar a resposta imune celular (ROBINSON & TORRES, 1997; TORRES *et al.*, 1997).

Os resultados aqui apresentados demonstram que a inoculação com a construção BYCr-PC induziu a produção de anticorpos nos camundongos inoculados e possibilita testar o uso de uma vacina de DNA no desenvolvimento de um método alternativo para o controle de carrapatos.

CONCLUSÕES

A imunogenicidade da proteína BYCr (BYCr-PC) foi observada através de ELISA e Western Blotting nos camundongos inoculados com a construção BYCr-PC.

A presença de anticorpos que reconhecem, tanto, a proteína BYC recombinante, quanto a BYC nativa foi detectada pela técnica de Western de competição.

A expressão da proteína BYCr foi detectada, pela técnica de imunohistoquímica, nos músculo dos animais inoculados com a construção BYCr-PC).

PERSPECTIVAS

Avaliação da capacidade imunoprotetora da construção BYCr-PC em experimentos de inoculação e desafio de bovinos, isoladamente e em conjunto com outros antígenos.

Testar novos protocolos de inoculação, incluindo o uso de adjuvantes, doses diferentes e de frequências diversas de inóculos, o que será particularmente importante na indução de resposta imune contra a proteína BYC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.A. *et al.* Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. **Insect Biochemical.Molecular.Biology.**, 34.5: 443-49, 2004.

ABREU, L.A. Investigação sobre a papel de um peptídeo relacionado à insulina na embriogênese do carrapato bovino *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari:Ixodidae) – UENF – **Dissertação de Mestrado em Biociências e Biotecnologia**, 2005.

ALLEN J.R. Host resistance to ectoparasites. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, 13(4):1287-303, 1994.

ALLEN, J.R. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. **Experimental.Applied.Acarology**, 7 (1):5-13, 1989.

ALVES-BRANCO, F.P.; ECHEVARRIA, F.A.M.; SIQUEIRA, A.S. Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. **Comunicado Técnico da EMBRAPA**, 1: 1-4, 1983.

ANDERSEN, M.L. *et al.* **Princípios éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação**. 1ª ed. São Paulo. UNIFESP, 167 P., 2004.

ANDREOTTI, R. *et al.* BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**, 2: 557-563, 2002.

AUCOUTURIER J., DUPUIS L., GANNE V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**, 19(17-19):2666-72, 2001.

BABIUK LA, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, BABIUK SL. Immunization of animals: from DNA to the dinner plate. **Veterinary. Immunology. Immunopathology**, 72(1-2):189-202, 1999.

BRADFORD, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254, 1976.

BRUM, J.G.W.; Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei*: etiopatogenia e sazonalidade. **Tese (Doutor em ciências)**. Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio Janeiro, 1988.

CAMPOS, E. *et al* A mitochondrial exopolyphosphatase activity modulated by phosphate demand in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* embryo. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 37(10):1103-7, 2007.

CAMPOS, E. *et al*. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. **Veterinary Parasitology**, 138:349-357, 2006.

CHAMPAGNE D.E. The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. **Parasitology Today**, 10 (11):430-3, 1994.

CHO, W.L. *et al*. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. **Journal of Biological Chemistry**, 274: 13311-13321, 1999.

CHU G., HAYAKAWA H., BERG P. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. **Nucleic Acids Research.**, 15(3):1311-26, 1987.

CRAMPTON A.L. *et al*. Monooxygenases play only a minor role in resistance to synthetic pyrethroids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Experimental Applied. Acarology**, 23(11):897-905, 1999.

DA SILVA VAZ JR., I. *et al*. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. **Veterinary Parasitology**, 62: 155-160, 1996.

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

DAVEY R.B.; POUND J.M.; COOKSEY L.M. Abstract Comparative reproduction and nonparasitic development of *Boophilus microplus* and hybridized *Boophilus* ticks (Acari: Ixodidae) under natural field conditions in subtropical south Texas. **Experimental Applied Acarology**, 4:185-200, 1994.

DAVEY R.B.; GEORGE J.E. In vitro and in vivo evaluations of a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) selected for resistance to permethrin. **Journal of Medical Entomology**, 35 (6):1013-9, 1998.

DAVEY R.B.; GEORGE J.E.; MILLER R.J. Comparison of the reproductive biology between acaricide-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, 139(1-3):211-20, 2006.

DAVIS, H.L. Plasmid DNA expression systems for the purpose of immunization. **Current Opinion in Biotechnology**, 8(5):635-46, 1997.

DE LA FUENTE J; RODRÍGUEZ M.; GARCÍA-GARCÍA J.C. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens **Annals of the New York Academy Sciences**, 916:617-21, 2000.

DUCORNEZ S. *et al.* Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test. **Veterinary Parasitology**, 130(3-4):285-292, 2005.

DUMONTEIL E. *et al.* DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana* **Vaccine**, 21(17-18):2161-8, 2003.

DUNN, S.D.; Effects of the Modification of Transfer Buffer Composition and the Renaturation of Proteins in Gels on the Recognition of Proteins on Western Blots by Monoclonal Antibodies. **Analytical Biochemistry**, 157, 144-153, 1986.

EMBRAPA. Carrapato-de-boi. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicações/divulga/GCD42.html>>. Acesso em: Julho de 2006. *Exp Appl Acarol.* 1999 Nov;23(11):897-905.

FAGOTTO F. Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 14(4):217-35, 1990.

FAGOTTO, F. Yolk degradation in ticks eggs: III. Developmentally regulated acidification of the yolk spheres. **Development Growth and Differentiation**, v.33:57-66, 1991.

FAGOTTO, F.; MAXFIELD, F.R. Changes in yolk platelet pH during *Xenopus laevis* development correlate with yolk utilization. **Journal of Cell Science**, 107: 3325-3337, 1994.

FARIAS, N.A.R.; GONZALES, J.C., SAIBRO J.C. Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 21: 1313-1320, 1986.

FELGNER, J. H. *et al.* Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. **Journal of Biological Chemistry**, 269.4: 2550-61, 1994.

FELGNER, P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 84.21: 7413-17, 1987.

FELGNER, P.L.; HOLM, M.; HAN, H. Cationic liposome mediated transfection. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, 32: 115-21, 1989.

FERNANDES, M. G. Métodos escolhidos de técnica microscópica: Rio de Janeiro: **Imprensa Nacional**, 611p. 1943.

FERREIRA, C.A.S. Caracterização de clones de cDNAs correspondentes a genes altamente expressos no carrapato *Boophilus microplus* (ACARI:IXODIDAE) fêmea, adulto e parcialmente ingurgitado. Porto Alegre, **Dissertação de mestrado** Centro de Biotecnologia , PPGGBM. 127 p., 1996.

FIALHO, E. *et al.* Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 462: 246-253, 2005.

FOIL L.D. *et al* Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Veterinary Parasitology**, 125(1-2):163-81., 2004.

FRAZZON, A.P. *et al.* In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, 94: 117-125, 2000.

FREITAS, D.R.J. Caracterização de resposta a estresse oxidativo e mecanismos de morte celular em *Boophilus microplus*. **Dissertação de mestrado** Centro de Biotecnologia, PPGBCM, UFRGS. Porto Alegre. 119 p., 2006.

FRESHNEY, R.I., **Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique**. 3rd edition, Wiley-Liss, New York, 486 p. (1994).

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Esc. Veterinária UFMG**, n.8, p.49-61, 1993.

GEORGE, J.E.; POUND, J.M.; DAVEY, R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**, 129: S353–S366, 2004.

GINDIN G. *et al.* The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental and Applied Acarology**, 28(1-4):283, 2002.

GLUZMAN Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. **Cell**, 23(1):175-82, 1981.

GONZALES, B. *et al.* Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. **Vaccine**, 23: 4342-4352, 2005.

GONZALES, J. C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou. 101p, 1974.

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

GONZALES, J.C. **O Controle do Carrapato do Boi**. 3 ed., 129 p., 2003.

GRAHAM F.L, VAN DER EB A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology**, 52(2):456-67, 1973.

GROLL A.H. *et al.* Compartmentalized intrapulmonary pharmacokinetics of amphotericin B and its lipid formulations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50 (10):3418-23, 2006.

HAMILTON J.G.C The role of pheromones in tick biology. **Parasitology Today**, 8 (4):130-133, 1992.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: A Laboratory Manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

HAWLEY-NELSON, P. *et al.* Lipofectamine reagent: A new higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. **Focus**, 15.3: 73-79, 1993.

HENRIQUES, A.M. *et al.* Development of a candidate DNA vaccine against Maedi-Visna virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 119 (3-4):222-232, 2007.

JOHNSTONE, A.; THORPE, R. Immunoassays. In: JOHNSTONE, A.; THORPE, R. **Immunochemistry in Practice**, London: Blackwell Scientific Publications, p.233-255, 1982.

JONSSON, N.N.; MAYER, D.G.; GREEN, P.E. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). **Veterinary Parasitology**, 88: 79-92, 2000.

KOCAN, K.M. Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle. **Veterinary Parasitology**, 57: 121-151, 1995.

LEAL, A.T. *et al.* Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**, 45: 107-114, 2006.

LEITNER, W.W.; THALHAMER, J. DNA vaccines for non-infectious diseases: new treatments for tumour and allergy. **Expert Opinion on Biological Therapy**, 3.4: 627-38, 2003.

LIAO, M. *et al.* Molecular characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 homologue from *Haemaphysalis longicornis* ticks. **Veterinary Parasitology**, 146 (1-2):148-157, 2007.

LIU, M.A. DNA vaccines: a review. **Journal of Internal Medicine**, 253:402-410, 2003.

LIU, X.; McCARRON, R.C.; NORDIN, J.H. A cysteine protease that processes insect vitellin. Purification and partial characterization of the enzyme and the proenzyme. **Journal of Biological Chemistry**, 271: 33344-33351, 1996.

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

MARTINS, J.R.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **The Veterinary Record**, 149 (2): 64, 2001.

MCCUTCHAN, J.H.; PAGANO, J. S. Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. **Journal of the National Cancer Institute**, 41.2: 351-57, 1968.

MEGAW M.W. Virus-like particles pathogenic to salivary glands of the tick *Boophilus microplus*. **Nature**, 271(5644):483-4, 1978.

MICHALAK M. Calreticulin in T-lymphocytes. Identification of calreticulin in T-lymphocytes and demonstration that activation of T cells correlates with increased levels of calreticulin mRNA and protein. **Journal of Biological Chemistry**, 267(27):19039-42, 1992.

MUTHUMANI, K. *et al.* A Gag-Pol/Env-Rev SIV239 DNA vaccine improves CD4 counts, and reduce viral loads after pathogenic intrarectal SIV(mac)251 challenge in rhesus Macaques. **Vaccine**, 21(7-8): 629-37, 2003.

NAGATA, Y. *et al.* Thrombopoietin induces megakaryocyte differentiation in hematopoietic progenitor FDC-P2 cells. **Journal of Biological Chemistry**, 270 (34):19673-19675, 1995.

NEUMANN E. *et al.* Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **The EMBO Journal** , 1(7): 841-45, 1982.

NUTTALL P.A. *et al.* Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**, 28(4):155-63, 2006.

NUTTALL, P.A.; LABUDA, M. Tick–host interactions: saliva-activated transmission. **Parasitology**, 129: S177–S189, 2004.

PEREIRA, M. C. *Boophilus microplus*: revisão taxionômica e morfo-biológica. 1a ed. São Paulo: **Químico Divisão Veterinária**. 105 p., 1982.

PERES, C. M. & CURI, R. **Como cultivar células**. 1.ed.Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 283 p., 2005.

POTTER H., WEIR L., LEDER P. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 81(22):7161-5, 1984.

PREVOT, P.P. *et al.* Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. **Vaccine**, 25(17): 3284-92, 2007.

PRUETT J.H.; POUND J.M. Biochemical diagnosis of organophosphate-insensitivity with neural acetylcholinesterase extracted by sonication from the adult tick synganglion **Veterinary Parasitology**, 135(3-4):355-363, 2006.

PRUETT, J.H. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. **International Journal for Parasitology**, 29: 25-32, 1999.

RAJPUT Z.I. *et al.* Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. **Journal of Zhejiang University Science B.**, 7(11):912-21, 2006.

RAMSHAW, I.A.; RAMSAY, A.J. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. **Immunology Today**, 21 (4):163-165, 2000.

RICHARD K. *et al.* Insect-and Other Arthropod-Associated Fungi. **Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods**, 395-433, 2004.

RICHARDSON M.A. *et al.* Abstract Native and baculovirus-expressed forms of the immunoprotective protein BM86 from *Boophilus microplus* are anchored to the cell membrane by a glycosyl-phosphatidyl inositol linkage. **Insect Molecular Biology**, 1(3):139-47, 1993.

RIDING, G.A. *et al.* A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. **Journal of Immunology**, 153: 5158-5166, 1994.

ROBERTS, J.A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. Stages of the cycle of the parasite against which resistance is manifest. **Journal of Parasitology**, 54: 667-673, 1968.

ROBINSON, H. L.; TORRES, C.A. DNA vaccines. **Seminars in Immunology**, 9(5): 271-83, 1997.

RODRIGUEZ-VIVAS R.I. *et al.* Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. **Veterinary Parasitology**, 136(3-4):335-342, 2006.

ROSA DE LIMA, M.F. *et al.* Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 32: 747-754, 2002.

RUIZ, M.L. *et al.* Immune response in mice and cattle after immunization with a *Boophilus microplus* DNA vaccine containing *bm86* gene. **Veterinary Parasitology**, 144:138-145, 2007.

RUIZ, P.M. *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Babesia bigemina* in cattle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 96 (2):237-240, 2001.

SABATINI, G.A. *et al.* Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, 95:53-62, 2001.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed., **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SANCHEZ G.I. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a *Plasmodium yoelii* Hsp60 DNA vaccine in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, 69(6):3897-905, 2001.

SAPPINGTON, T. W.; RAIKHEL, A. S. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 28:177-300, 1998.

SEDDON, H.R. Arthropod Infestations, Ticks and Mites. In: ALBISTON, H.E. Diseases of Domestic Animals in Australia. **Commonwealth of Australia**, Dept. Health, Canberra, 1967

SEIXAS, A. *et al.* A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. **Parasitology**, 126: 155-163, 2003.

SHARP, P.J. *et al.* Chromatography and generation of specific antisera to synthetic peptides from a protective *Boophilus microplus* antigen. **Journal of Chromatography**, 512:189-202, 1990.

SINGH, M.; O'HAGAN, D.T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **International Journal for Parasitology**, 33: 469–478, 2003.

SOLOMON J.S. *et al.* Expression, purification, and human antibody response to a 67 kDa vaccine candidate for schistosomiasis japonica. **Protein Expression Purification**, 36(2):226-31, 2004.

SOLOMON K.R. Acaricide resistance in ticks. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, 27:273-96, 1983.

SOLOMON, J.S. *et al.* Expression, purification, and human antibody response to a 67kDa vaccine candidate for schistosomiasis japonica. **Protein Expression and Purification**, 36:226-231, 2004.

SONENSHINE, D.E. Biology of Ticks. **New York: Oxford University Press**, Volume 1, New York, 1991.

SONENSHINE, D.E. Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. **Parasitology**, 129: 405–425, 2004.

SORGINE, M.H. *et al.* A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, 275: 28659-28665, 2000.

SPICKETT, A. M. Tick Ecology. **International Journal for Parasitology**, 24, 845-9, 1994.

STENMARK H.; ZERIAL M. Lipofection. **Cell Biology: A Laboratory Handbook**, 2 ed. Vol.4, Academic Press, 1998.

SUN, W. *et al.* Induction of protective and therapeutic antitumour immunity using a novel tumour-associated antigen-specific DNA vaccine. **Immunology and Cell Biology**, 84(5): 440-47, 2006.

SUTHERST, R.W. *et al.* The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. **Australian Journal of Agricultural Research**, 34: 317-327, 1983.

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

TAJIMA, S. *et al.* Function and conformation of wild-type p53 protein are influenced by mutations in bovine leukemia virus-induced B-cell lymphosarcoma. **Virology**, 243 (1):735-746, 1998.

TAJIMA, S.; AIDA, Y. The region between amino acids 245 and 265 of the bovine leukemia virus (BLV) tax protein restricts transactivation not only via the BLV enhancer but also via other retrovirus enhancers. **The Journal of Virology**, 74 (23):10939-10949, 2000.

TELLAM, R.L. *et al.* Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. **Veterinary Parasitology**, 103: 141-156, 2002.

TELLAM, R.L. *et al.* Vaccination against ticks. Chapter 12 In **Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology** (ed. Yong W.K.), pp.303-331. CRC Press, Boca Raton, 1992.

TIGHE, H. *et al.* Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. **Immunology Today**, 19(2): 89-97, 1998.

TILKINS, M.L.; HAWLEY-NELSON, P.; CICCARONE, V. Transfection of mammalian and invertebrate cells using cationic lipids. **Cell Biology: A Laboratory Handbook**, 2 ed. Vol.4, Academic Press, 1998.

TORRES, C. A. *et al.* Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. **Journal of Immunology**, 158(10): 4529-32, 1997.

TRIMNELL A.R, HAILS R.S, NUTTALL P.A. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. **Vaccine**, 20(29-30):3560-8, 2002.

VECINO, W. H. *et al.* Mucosal DNA vaccination with highly attenuated *Shigella* is superior to attenuated *Salmonella* and comparable to intramuscular DNA vaccination for T cells against HIV. **Immunology Letters**, 82(3): 197-204, 2002.

VON, G.A. *et al.* Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer. **Biotechnology Progress**, 22(4): 1220-24, 2006.

Wagland BM. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. II.* The dynamics of resistance in previously unexposed and exposed cattle. *Part I, **Australian Journal of Agricultural Research**, 26: 1073, 1975.

WANG Z.Q. *et al.* Vaccination of mice with DNA vaccine induces the immune response and partial protection against *T. spiralis* infection. **Vaccine**, 24(8):1205-12, 2006.

WAWRZYNIEC, K.; WEDRYCHOWICZ, H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. **Veterinary Parasitology**, 100:3–12, 2001.

WHARTON, R.H. & NORRIS, K.R. Control of Parasitic Arthropods. **Veterinary Parasitology**, 6: 135-164, 1980.

WIKEL, S.K. Tick Modulation of Host Cytokines. **Experimental Parasitology**, 84: 304-309, 1996.

WIKEL, S.K.; BERGMAN, D. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. **Parasitology Today**, 13: 383-389, 1997.

WIKEL, S.K.; RAMACHANDRA, R.N.; BERGMAN, D.K. Tick-induced modulation of the host immune response. **International Journal for Parasitology**, 24 (1):59-66, 1994.

WILLADSEN P., EISEMANN C.H., TELLAM R.L. “Concealed” antigens: expanding the range of immunological targets. **Parasitology Today**, 9(4):132-5, 1993.

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

WILLADSEN, P. Tick control: Thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, 2006.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, 129: S367–S387, 2004.

WILLADSEN, P. Immunological approaches to the control of ticks. **International Journal for Parasitology**, 17: 671-677, 1987.

WILLADSEN, P.; COBON, G.; MCKENNA, R.V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. **Parasite Immunology**, 18: 241-246, 1996.

WILLADSEN, P. *et al*. Immunological control of a parasitic arthropod: identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **The Journal of Immunology**, 143:1346-1351, 1989.

WILLADSEN, P.; KEMP, D.H. Vaccination with “concealed” antigens for tick control. **Parasitology Today**, 4: 196–198, 1988.

WOLFOWICZ, C.B.; HUANGFU, T.; CHUA, K.Y. Expression and immunogenicity of the major house dust mite allergen Derp 1 following DNA immunization. **Vaccine**, 21:1195-204, 2003.

YANG C.Y. *et al* Immune responses to pcDNA3.1 hisB-IL-15 and HBsAg DNA vaccine in BALB/c mice. **Chinese Journal of Hepatology**, 12(12):758-9, 2004.

YANG, W. *et al*. Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. **Vaccine**, 19 (1): 103-13, 2000.

YU, X. *et al*. DNA-mediated protection against classical swine fever virus. **Vaccine**, 19 (11-12): 1520-5, 2001.

ZAHA, A. *et al*. **Biologia Molecular Básica** 3 ed. Porto Alegre: 424 p., 2003.

ZAVALA-SPINETTI L. *et al*. Development and evaluation of a DNA vaccine based on *Helicobacter pylori* urease B: failure to prevent experimental infection in the mouse model. **Helicobacter**, 11(6):517-22, 2006.