

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A PEPTÍDEOS SINTÉTICOS
MIMETOPOS DE PROTEÍNAS TOTAIS DE LARVAS DO CARRAPATO
Boophilus microplus (ACARI: IXODIDAE) EM
CAMUNDONGOS E BOVINOS**

Andréa de Oliveira Marques Marra

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA - MG
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A PEPTÍDEOS SINTÉTICOS
MIMETOPOS DE PROTEÍNAS TOTAIS DE LARVAS DO CARRAPATO
Boophilus microplus (ACARI: IXODIDAE) EM
CAMUNDONGOS E BOVINOS**

ALUNO: Andréa de Oliveira Marques Marra

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética)

UBERLÂNDIA-MG
2004

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A PEPTÍDEOS SINTÉTICOS
MIMETOPOS DE PROTEÍNAS TOTAIS DE LARVAS DO CARRAPATO
Boophilus microplus (ACARI: IXODIDAE) EM
CAMUNDONGOS E BOVINOS**

ALUNA: Andréa de Oliveira Marques Marra

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador)

Examinadores:

Dr. Otto Domenici Mozzer - Vallée S/A

Dr. Humberto Eustáquio Coelho - UNIUBE

Dr. Paulo Lourenço da Silva - FAMEV - UFU

Dr. Foued Salmen Espíndola - INGEB

Data da Defesa: 30/06/2004

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da tese foram contempladas

(Orientador)

Uberlândia, _____/_____/_____

Dedico aos meus pais Nelson e Ana Maria,
às minhas irmãs Fabiana e Paula,
à minha avó Aracy, ao meu marido Marcelo
e à minha filha **JULIANA**, pelo incentivo,
apoio, compreensão e tolerância durante
esta fase das nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, por quem tenho grande admiração, pela sua inteligência, dedicação e estímulo durante a orientação na realização desta tese de doutorado e na condução do Laboratório de Genética Molecular.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular, em especial ao Guilherme Souza, Rone Cardoso e Carlos Roberto Prudêncio pelo companheirismo e presteza ao longo do curso de pós-graduação e principalmente na realização deste trabalho.

Aos colegas dos Laboratórios da UFU de Imunologia, Químicas de Proteínas e Produtos Naturais, Bioquímica e Biologia Molecular, Genética pela colaboração.

À Vallée S/A, empresa renomada no mercado de produtos veterinários, da qual faço parte do quadro de funcionários, pela oportunidade de desenvolvimento intelectual e pessoal.

Aos colegas da Vallée S/A com destaque para os amigos Dr. Américo Craveiro, Ana Célia, Carlos Roberto, Carlos Tolentino, Laudio Alessi, Rogério, Ricardo, Guilherme e Fábio pelo incentivo e apoio e em especial ao Celso Maruta também pela colaboração na análise estatística dos dados.

A **Deus**, a quem sempre agradeço nos momentos alegres e procuro nas situações difíceis e desanimadoras, recebendo a força necessária para continuar trilhando os sinuosos caminhos da vida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO GERAL	xiii
GENERAL ABSTRACT	xiv
1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1.1 – Taxionomia do <i>Boophilus microplus</i>	1
1.1.2 – Origem.....	1
1.1.3 – Morfologia: (ARTHUR, 1960) e (NUÑES et al., 1982).....	2
1.1.4 – Hospedeiros	3
1.1.5 – Distribuição geográfica	3
1.1.6 – Ciclo de vida.....	4
1.1.7 – Prejuízos econômicos	5
1.1.8 – Resistência dos bovinos ao carrapato.....	6
1.1.9 – Tratamento carrapaticida e controle do carrapato.....	8
a - Outras formas de controle do carrapato:.....	11
1.2 - Phage Display	16
- Biopanning	18
Aplicação da técnica.....	22
2 – OBJETIVOS	24
3 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
Capítulo Único	37
RESUMO GERAL	38
GENERAL ABSTRACT	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAIS E MÉTODOS	43
Produção do extrato de carrapato.....	43
Análises de SDS-PAGE	43
Imunização das galinhas.....	43
Ensaio Imuno Enzimático (ELISA)	44
Purificação dos anticorpos por afinidade.....	44
Seleção da biblioteca de peptídeos fusionados através do <i>phage display</i> ...	45
Caracterização dos clones selecionados e identificação dos clones reativos	46
Seqüenciamento de DNA.....	46
Análise de dados pela Bioinformática	46
<i>Dot Blotting</i> com anticorpo policlonal das galinhas	46
Amplificação e titulação dos clones selecionados.....	47
Imunização de camundongos.....	48
Imunização de bovinos (ensaios preliminares).....	48
Detecção de anticorpos.....	49

Desafio dos bovinos imunizados	49
RESULTADOS	51
Produção de anticorpos policlonais em galinhas contra antígenos totais de larvas do carrapato (<i>Boophilus microplus</i>)	51
Seleção e caracterização de peptídeos sintéticos.....	52
Seqüenciamento de DNA	54
Análise das seqüências.....	56
Amplificação e titulação dos clones de peptídeos sintéticos de larvas de carrapato selecionados por frequência e antigenicidade (bioinformática). ...	57
Imunização de camundongos e bovinos	58
Desafio dos bovinos imunizados	63
Avaliações por bioinformática.....	63
DISCUSSÃO	65
CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE TABELAS

Capítulo Único

- Tabela 1. Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a anticorpos policlonais para as proteínas de larvas de *B. microplus*. Título obtido (ufc) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade (título por 10 μ L). 53
- Tabela 2. Seqüência de aminoácidos dos principais peptídeos expressos nos fagos selecionados pelos anticorpos policlonais de galinhas imunizadas com proteínas totais de larvas de *B. microplus*. Alinhamento realizado pelo PILEUP 2.0..... 55
- Tabela 3. Seqüência de aminoácidos dos principais peptídeos expressos nos fagos selecionados pelos anticorpos policlonais de galinhas imunizadas com proteínas totais de larvas de *B. microplus* e seus índices antigenicidade..... 56
- Tabela 4. Níveis de anticorpos no soro de camundongos contra os peptídeos complexados ao fago, fago *helper*, *pool* de fagos complexados e PBS, calculados pelo teste de ELISA, nos dias 12 e 19 após a primeira imunização..... 59
- Tabela 5. Níveis de anticorpos no soro de camundongos contra os peptídeos complexados ao fago, fago *helper*, *pool* de fagos complexados, PBS, e proteínas totais de larvas de carrapato, calculados pelo teste de ELISA, 19 dias após a primeira imunização..... 60
- Tabela 6. Níveis de anticorpos, calculados pelo teste de Elisa, no soro de bovinos imunizados com o *pool* de peptídeos contra cada um dos peptídeos complexados ao fago, o *pool* de fagos complexados, o PBS e dos bovinos imunizados com o fago *helper* contra o mesmo, nos dias 12 e 19 após a primeira imunização. 62
- Tabela 7. Proteínas do *Boophilus microplus* similares aos peptídeos selecionados alinhados pelo BLAST..... 64

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1- Fago filamentososo. A) Composição do gene III, mostrando o sítio de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e PIX; C) Cristalografia dos domínios D1 e D2 da proteína III (HOLLIGER e WILLIAMS, 1999), as alfa-hélices estão coloridas em vermelho e as fitas β em cianico.....20

Figura 2- Esquema representativo do processo de *biopanning*. 1) Incubação da biblioteca de fagos com o alvo imobilizado; 2) Retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas; 3) Eluição dos fagos ligados e infecção de *E. coli* com pili F; 4) Amplificação dos fagos eluídos; 5) Titulação dos fagos eluídos; 6) População de fagos com maior afinidade pelo alvo.....21

Capítulo Único

Figura 1- SDS-PAGE proteínas totais de larvas de carrapato bovino *Boophilus microplus* observadas em gel de acrilamida 51

Figura 2- Resultados do teste de ELISA expressados como títulos (Título = Diluição do soro baseado no valor do “cut off”). Os títulos foram acima de 1: 145800. Galinhas (GL1 e GL2), soros pré imunes (L1 e L2) e o controle (BR1)..... 51

Figura 3- SDS-PAGE (Gel 16%) Preparações de IgY obtidas por precipitação com sulfato de amônio. Linha A - amostra de soro total de galinhas, linha B – fração de IgY 52

Figura 4- Colônias de *E. coli* F' infectadas com fagos M13 carregando o gene *lacZ* da β -galactosidase (colônias azuis)..... 53

Figura 5- *Western Blotting* para o conjunto de fagos após a terceira seleção do experimento. A seta indica a posição da proteína III contendo o peptídeo fusionado em 3 ciclos de seleção (1C, 2C e 3C). São representadas bandas com intensidades crescentes de sinal indicando o aumento do

reconhecimento dos peptídeos selecionados pelos anticorpos anti-proteínas de carrapato. 54

Figura 6- *Dot Blotting* com os 29 clones que apresentaram seqüências distintas para seleção dos que mais estimularam a produção de anticorpos pelas galinhas. Os clones mais reativos e sua localização na membrana foram: A2(2E6), A6(2E4), A7(E4), B3(2D7), B7(2D8), B9(2E11), B12(2F4), C1(2D2), C2(2F3). O controle representado pelo fago sem inserto *helper* esta localizado no dot C6..... 55

Figura 7- A solução de fagos a ser titulada foi submetida a diluições seriais de 10 vezes. Para a amplificação foram utilizadas as diluições de 10^7 a 10^{10} 57

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrometro
ACE	Acetilcolinesterase
BCIP	Bromochloroindolyl phosphato
Bm86	Glicoproteína de <i>Boophilus microplus</i>
Bm91	Glicoproteína de <i>Boophilus microplus</i>
Bm95	Glicoproteína de <i>Boophilus microplus</i>
BMA7	Glicoproteína de <i>Boophilus microplus</i>
BMTI	Inibidor de serino proteases
BSA	Soroalbumina bovina
BYC	Boophilus Yolk Catepsin
C1q	Componente do sistema complemento
CRT	Calreticulina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	Enzyme linked immunosorbent
g	Grama
GST	Glutathione S transferase
IgG	Imunoglobulina G
IgY	Imunoglobolinas Y (Yolk)
IPTG	Isopropil α -D-tiogalactosise
kDa	Quilodalton
L	Litro
M	Molar
M13KE	Vetor de clonagem de bacteriófagos filamentosos

M13mp19	Vetor de clonagem de bacteriófagos filamentosos
MA	Miliamper
NBT	Nitroblue tetrazolium
NC	Membrana de nitrocelulose
ND	Não determinado
ng	Nanogramas
p/v	Peso por volume
Page	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Pb	Par de base
PBS	Fosfato de sódio
PBST	Fosfato de sódio com tween 20 0,5%
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD	Phage Display
PEG	Poliétileno glicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D	Bibliotecas de Phage Display New England Biolabs
Ph.D-12mer	Biblioteca contendo 12 peptídeos randômicos
PIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
PVIII	Proteína VIII capsídica de bacteriófagos filamentosos
QU1	Glicoproteína de <i>Boophilus microplus</i>
RELIC	Receptor Ligands Contents
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
SBM	Antígenos sintéticos do <i>Boophilus microplus</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBST	Trifosfato de sódio com Tween 20
UFC	Unidades formadoras de colônias
v/v	Volume por volume
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- α -D-galactosideo

RESUMO GERAL

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A PEPTÍDEOS SINTÉTICOS MIMETOPOS DE PROTEÍNAS TOTAIS DE LARVAS DO CARRAPATO *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) EM CAMUNDONGOS E BOVINOS

O carrapato *Boophilus microplus* é um dos mais importantes artrópodes que parasitam os bovinos, causando grandes prejuízos à pecuária mundial pelos seus efeitos diretos e indiretos. A aplicação de produtos químicos é o principal método de controle deste parasita, mas em função das desvantagens desta prática, o uso de vacinas é uma boa alternativa, por serem livres de resíduos, específicas e apresentarem menor possibilidade de desenvolver resistência. Com o objetivo de selecionar peptídeos sintéticos expressos no capsídeo de bacteriófagos *phage display* produziu-se soro policlonal em galinhas previamente sensibilizadas com proteínas totais de larvas do carrapato *Boophilus microplus*. Os peptídeos encontrados em maior frequência e com maior índice antigênico (bioinformática e dot blotting com soro de galinha), foram selecionados para a imunização de camundongos e bovinos. Os dados iniciais inferiram que os peptídeos em fagos induziram resposta imune, avaliada pelo teste de Elisa, sendo os mais imunogênicos o 2D7 (SNNADYKQSLLL), o 2E6 (VNWNSWHKTNLS), o 2F3 (SIPTYTPDKVTY) e o 2E4 (DAWKMRLSQMYD). As seqüências selecionadas no presente trabalho apresentam os motivos protéicos NxxxKxxL (2D7, 2E6 e 2E4) e o motivo TPDKS (2E4). Estas seqüências apresentaram similaridades estruturais com algumas proteínas do carrapato principalmente a calreticulina. Estudos complementares estão sendo realizados para caracterizar a sensibilidade e especificidade aos peptídeos selecionados.

Palavras-chave: Peptídeos sintéticos, *Boophilus microplus*, *phage display*, calreticulina, bovinos.

GENERAL ABSTRACT

EVALUATION OF THE IMMUNOLOGIC RESPONSE FROM SYNTHETIC MIMETIC PEPTIDES OF TOTAL LARVA PROTEINS OF *Boophilus microplus* TICK (ACARI: IXODIDAE) IN MICE AND BOVINES

The *Boophilus microplus* tick is one of the most important arthropods that can parasitize bovines, causing great damages to the world livestock through direct and indirect effects. The application of chemical products is the principal method of controlling this parasite, but in function of the disadvantages of this practice, the use of vaccines is a good alternative, because they are residue free, specific and present smaller possibility to develop resistance. With the objective of selecting synthetic peptides expressed in the capsid of phage display bacteriophages, it was produced the serum polyclonal in chickens previously sensitized with total larva proteins of the *Boophilus microplus* tick. The peptides found in larger frequency and with larger antigenic index (bioinformatics and dot blotting with chicken serum) were selected for the immunization of mice and bovines. The initial data infer that the peptides in phagos induced immune response, evaluated by Elisa test, and the more immunogenic are: 2D7 (SNNADYKQSLL), 2E6 (VNWNSWHKTNLS), 2F3 (SIPTYTPDKVTY) and 2E4 (DAWKMRLSQMYD). The sequences selected in the present work introduce the protean motives NxxxKxxL (2D7, 2E6 and 2E4) and the motive TPDKS (2E4). These sequences presented structural similarities with some tick proteins, mainly the calreticulin. Complementary studies are being accomplished to characterize the sensibility and specificity to the selected peptides.

Keywords: Synthetic peptides, *Boophilus microplus*, phage display, calreticulin, bovines.

1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1.1 – Taxionomia do *Boophilus microplus*

Filo – Arthropoda;

Subfilo – Chelicerata;

Classe – Aracnida;

Subclasse – Acari;

Ordem – Parasitiformes;

Subordem – Metastigmata;

Família – Ixodidae;

Gênero – *Boophilus*.

1.1.2 – Origem

O *Boophilus microplus*, carrapato que parasita os bovinos, originou-se de ancestrais que viveram no fundo do mar. O hábito alimentar de hematofagismo também teve início quando ainda vivia neste ambiente. A idade do filo Artropoda, comum a seus ancestrais, é estimada em 400 milhões de anos. Posteriormente, os carrapatos tornaram-se parasitas de hospedeiros que vivem na atmosfera e utilizam o oxigênio através de um sistema respiratório traqueal com abertura ao meio exterior denominado estigma respiratório. No entanto, mantiveram a capacidade de serem muito resistentes à água e ao sal. Supõe-se que o carrapato pré-histórico tenha saído do mar acompanhando seus hospedeiros e se adaptado aos animais terrestres (GONZÁLES, 2002).

O registro mais antigo da presença do carrapato (ARTHUR, 1960) é uma figura em uma tumba egípcia, datada de 1500 A.C., representando um animal semelhante à hiena com três protuberâncias no pavilhão auricular interno. No ano 77, o carrapato foi citado como hematófago por Plínio em sua *História Naturalis*.

O gênero *Boophilus*, palavra que em grego significa “amigo do boi”, possui três espécies: *B. annulatus*, *B. microplus* e *B. decoloratus*. O *Boophilus annulatus* está presente na América do Norte (Estados Unidos e México); o *B. microplus* “menor amigo do boi” é encontrado na América Central, América do Sul, Austrália, Oriente, Sul da Flórida, Sul e Este da África; e o *Boophilus decoloratus* é essencialmente uma espécie africana, distribuindo-se pelo sul e pelas regiões úmidas do Saara.

O carrapato *B. microplus* chegou à América do Sul trazido pelos colonizadores ibéricos entre os séculos XVI e XVIII (NUÑES et al., 1982) e a sua introdução no Brasil foi devida à importação do gado zebu da Ásia (WALKER, 1987).

1.1.3 – Morfologia: (ARTHUR, 1960) e (NUÑES et al., 1982)

Larvas – Apresentam cerca de 500 µm de comprimento por 400 µm de largura, forma ligeiramente ovóide e possuem três pares de patas. São quase translúcidas ao saírem do ovo e sua quitina fica de coloração marrom-avermelhada após curta exposição ao ar. O escudo dorsal cobre o corpo totalmente. Na face ventral, está a vesícula excretória com cristais de guanina de cor branca no seu interior.

Ninfas – Antes de ingurgitarem, medem aproximadamente 1 mm de comprimento e possuem tonalidade desde de translúcidas (logo após o nascimento) até cinza escuro, quando ingurgitadas. Possuem quatro pares de patas e o hipostômio com duas fileiras de três dentes. Nos dois lados do corpo, atrás da coxa IV aparecem os peritremas. Não possuem orifício genital.

Machos – Medem cerca de 1,5 a 2,5 mm de comprimento por 1,0 a 1,4 mm de largura e possuem o corpo oval alongado com coloração desde castanho-amarelada à marrom-avermelhada. Hipostômio curto e largo, porém mais longo que os palpos, com dentição 4/4 e 7/8 dentes por fila. O escudo cobre quase todo o idiosoma e apresenta granulações e sulcos. Olhos pequenos, quase inaparentes e de localização ântero-lateral. Na face ventral há cerdas finas e esbranquiçadas. Abertura genital localizada ao nível da coxa II e a anal no terço posterior entre a coxa IV e a extremidade posterior. As placas adanais

são longas e providas de cerdas. Escápula triangular e bem delimitada. As patas são de comprimento moderadas, mais compactas que nas fêmeas, com numerosas cerdas finas e esbranquiçadas. O peritrema é quase circular, mais próximo da coxa IV do que da extremidade posterior. Apresenta apêndice caudal.

Fêmeas – Antes de ingurgitar medem de 1,9 à 2,5 mm de comprimento por 1,1 à 1,6 mm e chegam a atingir 13 mm de comprimento por 8 mm de largura, quando totalmente ingurgitadas. Hipostômio curto, largo, longo que os palpos, com dentição hipostomal 4/4 e 7/8 dentes por fila. Escudo de tamanho variável, com 0,42 à 0,56 mm de comprimento por 0,35 à 0,49 mm de largura, de coloração castanha bem clara a castanha escura. Olhos na margem escutal, delimitando-a, de cada lado, em regiões ântero-lateral e póstero-lateral. Os sulcos cervicais presentes no escudo são longos e pouco profundos. A abertura genital está na face ventral, localizada ao nível da coxa II e a anal no terço posterior. Peritrema é quase circular, mais próximo da coxa IV do que da extremidade posterior. Possuem oito patas longas e fortes.

1.1.4 – Hospedeiros

O principal hospedeiro do *B. microplus* é o bovino, mas outros animais podem ser parasitados, entre eles búfalos, jumentos, burros, ovinos, caprinos, cão, gato, porco, veado, onça, preguiça, canguru, coelho e cervídeos. Nestes animais, com exceção do bovino, os carrapatos não conseguem atingir o estágio adulto, em função de fatores imunitários que promovem grande mortalidade, principalmente das larvas (RIEK, 1959).

1.1.5 – Distribuição geográfica

O *B. microplus* distribui-se geograficamente entre os paralelos 32°N e 32°S, com alguns focos até 35°N e S (WHARTON, 1974).

No Brasil, o carrapato *B. microplus* é encontrado nos 26 estados, em 95,6% dos municípios (TEIXEIRA LEITE et al., 1991) e em 66,04% destes, durante os doze meses do ano. Em função das condições climáticas, as regiões de maior incidência do carrapato são sul, sudeste e centro-oeste (HORN e ARTECHE, 1984).

1.1.6 – Ciclo de vida

O carrapato *B. microplus* é um parasita monoxeno, ou seja, realiza suas mudas ou metamorfoses em um único hospedeiro. Seu ciclo de vida pode ser subdividido em duas fases: fase parasitária e fase não parasitária (GONZÁLES, 1975)

A fase parasitária praticamente não sofre influência das variações do tempo em determinada região climática, com exceção de pequena elevação do período parasitário, em decorrência do aumento do fotoperíodo nos meses de verão. A constante disponibilidade de alimento e o equilíbrio da temperatura do hospedeiro favorecem a pequena variabilidade no período parasitário, o qual ocorre, na média, em 22 dias (FURLONG et al., 2004). A fase parasitária inicia-se com a fixação das larvas no hospedeiro susceptível e termina quando os adultos, incluídas as fêmeas fecundadas e ingurgitadas chamadas de teleóginas, caem desse hospedeiro. No corpo do hospedeiro as larvas atingem todas as regiões do corpo do animal, fixando-se preferencialmente na coxa base da cauda, em torno do ânus, vulva, virilha, axila, úbere, peito, tábua do pescoço e face interna da orelha (VERÍSSIMO, 1987). Segundo Doube e Kemp (1979), a temperatura da pele do bovino influencia na fixação e sobrevivência das larvas, e verificaram a tendência das mesmas em se acumularem nas regiões do corpo do hospedeiro onde a temperatura cutânea está entre 31°C e 38°C.

As larvas após a fixação, que consiste na penetração mecânica do hipostômio na epiderme, se alimentam de plasma e linfa e quando ingurgitadas iniciam a metamorfose para ninfa, fase esta denominada metalarva. A ninfa volta a fixar-se em local próximo ao estágio anterior e se alimenta de linfa, plasma e sangue e inicia a metamorfose para outro ínstar, recebendo o nome de metaninfa. As metaninfas podem liberar machos (neandros), que se queratinizam e adquirem mobilidade se transformando em gonandros. Os gonandros estão aptos para irem ao encontro das fêmeas e fecundá-las. Os machos se alimentam de sangue e permanecem no corpo do bovino por dois ciclos acasalando-se com várias fêmeas. As metaninfas que liberam fêmeas (neóginas) se fixam novamente e iniciam o repasto sangüíneo. O acasalamento

ocorre a partir do 17^o dia da infestação (LONDT e ARTHUR, 1975). A fêmea parcialmente ingurgitada chama-se partenógina e a ingurgitada após a cópula, teleógina (PEREIRA, 1980). A teleógina chega a ingerir em torno de 3 mL de sangue durante a fase parasitária.

A fase não parasitária é muito influenciada pelas condições climáticas e ambientais. Essa fase começa quando a fêmea fecundada e ingurgitada desprende-se do hospedeiro e no solo procura um ambiente favorável para fazer a postura. O período entre a queda da teleógina e o início da postura é de aproximadamente três dias. O período de postura tem duração média de 15 a 17 dias, à temperatura de 27°C e umidade relativa do ar superior a 80% (GONZÁLES et al., 1975). A quantidade de ovos postos por uma fêmea é proporcional ao peso alcançado por ela, o qual é uma consequência da quantidade de sangue ingerido (DIEHL et al., 1982). Rocha et al. (1985) verificaram uma relação de 8,5 ovos para cada miligrama de peso da teleógina. O número máximo de ovos postos por uma fêmea variou de 2.631 a 7.759. A fêmea do *B. microplus* ao realizar a postura, passa cada ovo por uma glândula (órgão de Gené), cuja secreção cerácea tem a propriedade de impermeabilizá-los e aglutiná-los em massa compacta (FORTES, 1987). A fêmea após finalizar a oviposição é denominada quenógina. A fase de incubação dos ovos varia de 15 dias no verão à 55 dias no inverno (LEGG, 1930). A larva ao eclodir, precisa de um período de quatro a seis dias para estar apta a infestar o animal, estimulada pela luz (WILKINSON, 1953), odor, calor, vibrações e concentração de CO₂. O tipo de pastagem, cespitoso ou estolonífero, na qual se encontra a larva, influencia na sua sobrevivência. O capim-gordura (*Melinis minutiflora*) tem propriedades de antibiose (mata a larva) e antixenose (repele a larva) (FARIAS et al., 1986). A longevidade larval registrada por Hithcock (1955) a 22°C e 90% de umidade foi de 240 dias.

1.1.7 – Prejuízos econômicos

O *B. microplus* causa, principalmente, no rebanho leiteiro nacional, que é cerca de 25 milhões de cabeças e formado predominantemente de raças européias, com destaque para a raça Holandesa, uma diminuição na produção de leite de 10 a 15%, dependendo do grau de infestação (GRISI et al., 2002).

Levando-se em consideração uma produção de 19,7 bilhões de litros de leite por ano (IBGE, 2000), pode-se estimar prejuízos em torno de 200 milhões de dólares.

Baseado nas informações fornecidas pelas Secretarias de Agricultura nos estados brasileiros, Horn e Arteché (1984) estimaram os seguintes prejuízos causados pelos *B. microplus*, que chegavam a US\$ 968 milhões: 1,2% devido à mortalidade, à diminuição do ganho de peso (6 kg/animal/ano), efeitos sobre o couro, gastos com carrapaticidas, diminuição da produção de leite (1,5 bilhões de litro). Grisi et al. (2002) estimaram que, em função do crescimento do rebanho bovino de 76 milhões de cabeças em 1983 para 169 milhões em 2000, estas perdas poderiam ultrapassar os dois bilhões de dólares. Os prejuízos, considerando apenas o setor de couros, são de mais de R\$ 500 milhões por ano, decorrentes das lesões na pele causadas pelo carrapato.

O carrapato *B. microplus* também causa prejuízos por ser um importante transmissor de hemoparasitoses: *Anaplasma sp* (rickettsia) e *Babesia spp* (protozoário). Estes dois hemoparasitas são responsáveis pela tristeza parasitária bovina.

1.1.8 – Resistência dos bovinos ao carrapato

Os artrópodes, ao parasitar o animal, injetam saliva que contém antígenos indutores de resposta imune. Estes antígenos estimulam três tipos diferentes de resposta imune: resposta do tipo Th1; resposta do tipo Th1 associada com a produção de anticorpos IgG e infiltrado de basófilos; resposta Th2 com produção de IgE e hipersensibilidade do tipo 1. Cada um destes três tipos de respostas pode modificar a pele do animal e prejudicar a alimentação do parasita. A saliva do carrapato reduz a função do macrófago e é imunossupressiva (TIZARD, 2000).

Existem diferenças entre as espécies e dentro da mesma espécie quanto à resistência dos hospedeiros ao carrapato. No caso dos bovinos, dentro da mesma espécie, os animais das raças taurinas (européias) são mais susceptíveis às infestações pelo *B. microplus* que os animais das raças

zebuínas (indianas). Dentro das raças européias a raça mais resistente aos carrapatos é a Jersey (UTECH et al., 1978).

Em um animal altamente resistente, a proporção de larvas que consegue ter sucesso e completar o ciclo é menor que 1% e para um animal susceptível, a proporção sobe para cerca de 20% ou mais (WILLADSEN et al., 1977 citado por VERÍSSIMO, 1990). Bennett (1975) verificou que durante a fase parasitária do *B. microplus* ocorrem mais perdas nos animais resistentes, tanto de larvas como de ninfas, principalmente nos períodos que antecedem as mudas.

Moraes (1988) observou que os zebuínos possuíam mais que o dobro de mastócitos dérmicos por unidade de volume na região da virilha que os taurinos. As alterações dérmicas prejudicam a ingestão de sangue, fazendo com que o peso das fêmeas ingurgitadas seja menor em zebuínos que em taurinos, e conseqüentemente, estas teleóginas produzem um menor número de ovos e larvas. A maior resistência dos bovinos zebus não afetou a oviposição, a embriogênese e a eclosão das larvas.

Outros fatores interferem na resistência dos bovinos ao carrapato. A herdabilidade da resistência dos bovinos foi estudada por vários pesquisadores e variou de 0,006 a 0,39, por diferentes métodos descritos por Wharton et al. (1970); Madalena et al. (1985); Gomes (1992). Utech et al. (1978) observaram que a raça influencia na resistência do hospedeiro, ao estudarem animais oriundos do cruzamento entre indianos e europeus, nos quais verificaram que a resistência está relacionada com a proporção de genótipo zebu, ou seja, quanto maior o teor deste último, maior a resistência. Em um rebanho composto por *B. taurus* (5/8) X *B. indicus* (3/8) Veríssimo (1990), considerando a estação do ano, observou que a população de carrapatos diminui muito no inverno, aumentando significativamente nas estações de temperatura mais alta, com pico no outono. O aumento das infestações no verão estaria ligado ao estresse provocado pelo calor, e o pico no outono, ao encerramento do fotoperíodo. Gomes (1992) e Silva (1996) observaram em um rebanho da raça Gir, que a estação do ano de maior infestação é o inverno e a de menor é o verão. Com relação à idade Gomes (1992) também observou um decréscimo na resistência a partir de três anos de idade, em fêmeas adultas da raça Gir.

Levando-se em consideração os aspectos nutricionais, Sutherst et al. (1983) demonstraram que os animais suplementados foram mais resistentes do que os não suplementados independentes de sexo e raça. Com relação ao sexo, Stear et al. (1989) observaram que machos mestiços $\frac{3}{4}$ Brahman X $\frac{1}{4}$ Shorthorn foram significativamente mais susceptíveis que as fêmeas. Segundo Silva (1996), a fase do ciclo reprodutivo da fêmea interfere no nível de susceptibilidade ao carrapato, pois verificou que vacas não gestantes da raça Gir foram mais resistentes que as vacas gestantes. Oliveira e Alencar (1987) observaram em um rebanho da raça Canchim, que os animais de pelame mais claro eram significativamente menos infestados por *B. microplus*.

Schleger et al. (1976), ao estudar as alterações teciduais ocorridas durante o parasitismo dos bovinos pelo *Boophilus microplus*, verificaram que o grau de degranulação de eosinófilos é maior no local da fixação da larva nos animais resistentes. De acordo com os mesmos autores, a formação do complexo antígeno-anticorpo, fixação de complemento e linfocinas é que atrai os eosinófilos. Ocorre também um grande afluxo de basófilos e mastócitos (WILLADSEN, 1977 citado por VERÍSSIMO, 1990). Estas células liberam histamina, que é o principal mediador da resposta inflamatória, aumentando a permeabilidade capilar dos vasos sanguíneos e a passagem de elementos de defesa do hospedeiro. As enzimas liberadas pelos eosinófilos atraídos e degranulados causam lesão tecidual, evidenciada pela vesícula epidérmica observada nos hospedeiros e irritação local. Estes produtos também são tóxicos para a larva, impedindo sua alimentação ou forçando a migração para outro local. A irritação também estimula a autolimpeza e a vesícula epidérmica que se forma sob o local da fixação facilitando a remoção das larvas. Nas fases finais do ciclo parasitário ocorre intensa infiltração de neutrófilos, atraídos pelos fatores produzidos pela fixação de complemento.

1.1.9 – Tratamento carrapaticida e controle do carrapato

A aplicação de carrapaticidas é a principal prática utilizada pelos produtores rurais no tratamento e controle dos carrapatos. A constante utilização dos acaricidas, na maioria das vezes de maneira incorreta, acarreta a seleção de cepas resistentes. Os produtos são aplicados por pulverização,

onde são utilizados diferentes equipamentos (bomba costal, bomba elétrica), aspersão e imersão (FURLONG et al., 2004). Os carrapaticidas também podem ser aplicados pelas vias “pour on” (sobre a linha dorsal do animal) e injetável.

Os principais grupos químicos utilizados e os respectivos mecanismos de ação são (SPINOSA et al., 1999):

- Organofosforados: atuam por inibição irreversível da acetilcolinesterase, interferindo na transmissão nervosa e neuromuscular com conseqüente morte do parasita. Podem ser utilizados pelas vias injetável e tópica.
- Amidinas: possuem atividade agonista adrenérgica, através da inibição da monoamino oxidase (MAO) e outras enzimas. Causam depressão do sistema nervoso do parasito. São utilizadas topicamente.
- Piretróides: agem inibindo o transporte de sódio e potássio no sistema nervoso do parasito. São utilizados pela via tópica.
- Avermectinas e Milbemicinas: potencializam a ação inibidora neuronal mediada pelo GABA, promovendo hiperpolarização do neurônio e inibindo a transmissão nervosa. Esse mecanismo de ação seria efetivo em mamíferos, entretanto demonstrou-se que em insetos existe também a ação desses compostos em canais de cloro GABA independentes, onde há aumento na condutância da membrana do músculo, pelo bloqueio para a resposta do ácido ibotênico, que é um ativador específico do portão-glutamato, comumente encontrado no inseto. Como conseqüência, há um aumento da permeabilidade da membrana aos íons cloro, resultando em redução da resistência da membrana celular. São utilizados na forma oral, intra-ruminal, injetável e tópica.
- Benzoilfeniluréia - Fluazuron: são inseticidas seletivos que atuam pela inibição da deposição de quitina. Os artrópodes afetados são incapazes de promover a ecdise, perdem hemolinfa, adquirem coloração escura, morrendo devido a desidratação. São utilizados pela via tópica.

- Derivados dos Fenilpirazóis – Fipronil: a molécula Fipronil inibe não competitivamente o GABA, fixando-se no receptor no interior do canal do cloro, inibindo o fluxo celular dos íons, anulando assim o efeito neuroregulador do GABA e causando a morte do parasito por hiperexcitação. A administração é tópica.

Várias são as formas de controle do carrapato, porém a mais praticada pelos produtores rurais é aplicação de carrapaticidas quando o número de teleóginas no rebanho é elevado. Isso é feito várias vezes ao ano, e com diversos tipos de equipamentos. A troca do carrapaticida é feita de forma freqüente e indiscriminada.

Uma forma científica de controle estratégico é a realização de tratamentos baseados no ciclo de vida e na epidemiologia dos carrapatos utilizando carrapaticidas selecionados pelo biocarrapaticidograma. O sistema estratégico convencional é realizado com uma série de cinco a seis tratamentos com carrapaticida de contato em uma determinada época do ano, dependendo da região geográfica, intervalados de 21 dias, ou três a quatro aplicações de carrapaticida “pour on”, também carrapaticida de contato, intervaladas de 30 dias. Esse mesmo intervalo de 30 dias é feito com a utilização de produto injetável ou “pour on” de lactonas macrocíclicas (FURLONG et al., 2004). Após a série de tratamentos, os animais terão poucos carrapatos por muitos meses, e não precisarão de novas aplicações. Tratamentos táticos são necessários entre as séries de banho, de um ano para o outro, caso os animais apresentem mais de 20 teleóginas em um dos lados do corpo. Furlong (1993) recomenda apenas o tratamento tático dos animais mais infestados, constituindo assim uma população de refúgio no sentido de retardar o aparecimento da resistência. Particularidades regionais, determinadas principalmente pelas condições de temperatura, umidade e altitude, além das raças dos animais e suas susceptibilidades aos agentes da tristeza parasitária bovina, precisam ser consideradas e adaptações devem ser feitas para se obter sucesso.

Uma forma científica de controle é necessária para que os produtos químicos tenham a maior vida útil possível. No Brasil, a primeira constatação de resistência dos carrapatos aos carrapaticidas foi com relação aos

arsenicais, em 1949. Na década de 50, foi detectada resistência aos organoclorados. O aparecimento da resistência dos carrapatos ocorreu também em outros países, quase ao mesmo tempo, com diferenças apenas no momento da constatação e publicação (GONZÁLES, 1993).

Entre as décadas de 70 a 90, a resistência aos carrapaticidas atualmente utilizados, organofosforados, amidinas e piretróides, já estava amplamente distribuída no Brasil. Em 2000, já foram publicados os primeiros relatos de resistência aos endectocidas (autor).

A resistência dos carrapatos aos carrapaticidas é um fenômeno de ordem genética, isto é, se origina e se estabelece ao nível dos cromossomos do carrapato. A população de carrapatos está naturalmente dividida com relação à ação dos carrapaticidas em indivíduos homocigotos resistentes e sensíveis (RR e SS), e heterocigotos sensíveis (RS) (GONZÁLES, 1993). Os carrapaticidas, entre outros fatores, atuam selecionando indivíduos geneticamente resistentes.

A resistência dos carrapatos aos carrapaticidas tem basicamente dois mecanismos: aumento da taxa de desintoxicação ou metabolismo e mudança no sítio de ação da droga.

a - Outras formas de controle do carrapato:

Várias formas de controles alternativos têm sido estudadas, principalmente, com a finalidade de se evitar a presença de resíduos químicos em produtos de origem animal destinados ao consumo humano e animal.

a.1 - Controles alternativos

Barros e Evans (1989) verificaram que as espécies de forrageiras para pastagens *Melinis minutiflora* e *Brachiaria brizantha* possuem propriedades “anti-carrapato”, através de mecanismos de letalidade e/ou repelência. O tipo de forrageira influencia a sobrevivência das larvas nas pastagens, através do microambiente formado em função do seu modo de crescimento (cespitoso ou estolonífero) e da presença de características que prejudiquem a larva, matando-a (antibiose) ou repelindo-a (antixenose).

Os carrapatos possuem muitos predadores e, entre eles, destaca-se a garça vaqueira, as galinhas e as formigas, em especial as carnívoras (GONZÁLES, 1993).

Brum (1988) verificou que algumas bactérias produzem infecções em teleóginas como, por exemplo, a *Erwinea sp.*

Bittencourt et al. (1996) constataram que isolados tratados do fungo *Beauveria bassiana* foram patogênicos para ovos e larvas de *B. microplus*, sendo este patógeno inimigo natural de importância potencial para ser usado no controle microbiano desta praga.

Práticas de manejo, tais como seleção de animais resistentes (DAVIS, 1993), rotação de pastagens (ELDER et al., 1980), manejo de pastagens entre diferentes espécies animais (GONZÁLES, 1993), contribuem para o controle dos carrapatos.

a.2 – Vacinas

Labruna et al. (1999) descrevem que para entender o princípio do funcionamento da vacina contra carrapatos é importante compreender as reações imunológicas dos hospedeiros aos carrapatos, o que se traduz bioquimicamente na relação parasito-hospedeiro. A interação parasito-hospedeiro é fruto da co-evolução ao longo do tempo, na busca constante e dinâmica de um equilíbrio, de modo que ambas as populações, hospedeiro e parasito, possam conviver harmoniosamente na mesma área. Considerando essa relação como uma “balança”, em que se tem o carrapato de um lado e o hospedeiro do outro, ela irá oscilar de acordo com as mudanças ambientais que tenham efeito direto nos dois fatores, formando a tríade epidemiológica parasito-hospedeiro-ambiente (RANDOLPH, 1979; MAY, 1983).

No início dos estudos das vacinas contra carrapatos, Wikel (1981) e Ribeiro (1989), considerando o fato do carrapato entrar em contato com o hospedeiro e se alimentar através do aparelho bucal, fizeram vários experimentos com antígenos da glândula salivar, com a intenção de impedir a alimentação, mas isto só ocorria quando utilizavam hospedeiro não naturais. Para o bovino, a imunidade adquirida com estes antígenos era semelhante à

uma primoinfecção. Galun (1978), citado por Tellam et al. (1992) , baseado nestes resultados, sugeriu então que bovinos fossem imunizados com antígenos, que em uma infecção natural não seriam apresentados ao hospedeiro, surgindo o conceito de “antígenos ocultos”. Indução de imunidade foi verificada por Johnston et al. (1986), com a inoculação de bovinos com extrato bruto de *B. microplus*. Os carrapatos que ingeriram sangue dos animais imunizados apresentaram lesões no epitélio intestinal, principalmente nas células digestivas, com conseqüente extravasamento de hemácias para a hemolinfa. Um dos antígenos responsáveis por estas lesões foi purificado e caracterizado, recebendo a denominação de Bm86. Trata-se de uma glicoproteína de 89 kDa e ponto isoelétrico de 5.1 a 5.6 (WILLADSEN et al., 1989). Rand et al. (1989) isolaram e caracterizaram o cDNA que codificava a Bm86. A seqüência de nucleotídeos do cDNA continha 1982 pares de base que precediam os 650 aminoácidos da Bm86, dos quais 10% eram cisteínas. Esta seqüência tinha grande afinidade com o precursor do fator de crescimento epidérmico e a Bm86 poderia ter alguma função semelhante a este fator só que nas células intestinais. Esta proteína foi clonada e expressada em *Escherichia coli*.

A Bm86 está localizada nas microvilosidades da membrana das células epiteliais do intestino e pode ter alguma função diretamente relacionada à pinocitose (GOUGH e KEMP, 1993). Willadsen et al. (1995) verificaram que a Bm86 está presente nas larvas, ninfas e adultos, mas os carrapatos adultos são os mais afetados, principalmente as fêmeas após o repasto sangüíneo.

A vacina, composta pela Bm86 e adjuvante oleoso, é produzida em larga escala na Austrália, por engenharia genética em *E. coli* e tem o nome comercial de TickGard (WILLADSEN et al., 1995). Testes de clonagem em *Aspergillus nidulans* ou *Aspergillus niger* também foram realizados (TURNBULL et al., 1990).

Rodríguez et al. (1994) clonaram a proteína Bm86 em levedura *Pichia pastoris*. A proteína recombinante obtida tem uma pureza maior que 95% e estudos bioquímicos demonstraram que o antígeno é glicosilado na forma de partículas com aproximadamente 17 a 45 nm de diâmetro com grandes

propriedades imunogênicas. Fêmeas ingurgitadas provenientes de animais vacinados apresentaram danos significantes, como resultado da resposta imunológica. A Bm 86 clonada em *Pichia pastoris* associada a um adjuvante oleoso tornou-se a segunda vacina contra carrapatos comercial do mercado, com o nome comercial de Gavac.

Um novo adjuvante, *Vaximax*, foi utilizado na composição da vacina com Bm86, comercialmente chamada de TickGard Plus, que possui uma maior eficácia induzindo a produção de títulos mais altos de anticorpos (WILLADSEN, 1997).

As vacinas comercialmente disponíveis (TickGard, TickGard Plus na Austrália e Gavac em Cuba), em testes de campo realizados no Brasil, apresentaram uma eficácia moderada e a necessidade da aplicação concomitante de produtos químicos. Para se obter ainda certa eficácia das vacinas são fundamentais associar também práticas de manejo que favoreçam a descontaminação das pastagens.

Vários antígenos estão sendo estudados, na tentativa de desenvolver uma vacina de melhor eficácia, talvez até uma vacina poli-antigênica.

Riding et al. (1994) purificaram e caracterizaram uma proteína de membrana denominada Bm91. Esta proteína glicosilada localiza-se na glandular salivar e intestino dos carrapatos, tem peso molecular de 86 kDa e PI entre 4.8 e 5.2. A seqüência parcial de aminoácidos mostra similaridades com a enzima conversora de angiotensina dos mamíferos, sugerindo que este antígenos possam ter função enzimática. Em ensaios de campo, os animais não reconheceram esta proteína. A vacina associada de Bm91 e Bm86 mostrou resultados de eficácia superiores à da vacina composta apenas de Bm86 (WILLADSEN et al., 1996).

Willadsen (1997) relata que o futuro das vacinas dependerá do reconhecimento de antígenos alvos específicos, ou seja, a eficácia das vacinas estará ligada às características da espécie de parasita, em particular do sistema digestivo.

O antígeno BMA7 isolado do *B. microplus*, induz imunidade parcial contra infestações de carrapatos. Trata-se de uma glicoproteína de 63 kDa que tem similaridade com mucinas de vertebrados e induz imunidade menos significativa que a reportada contra a Bm86. Entretanto, com a associação dos dois antígenos é obtida maior eficácia do que com a vacina comercial composta apenas de Bm86 (McKENNA et al., 1998).

A proteína recombinante glicosilada Bm95 foi isolada de cepas de carrapatos da Argentina, que apresentaram baixa susceptibilidade à vacina com Bm86 e clonada e expressada na levedura *Pichia pastoris*. Em testes de campo, conferiu proteção aos animais expostos a cepas sensíveis e resistentes à Bm86 (GARCÍA-GARCÍA, 2000).

Um precursor da proteinase aspártica, denominada BYC (*Boophilus* Yolk pro-Cathepsin) foi isolado de ovos do carrapato *B. microplus*. Esta proteína purificada apresenta duas bandas de 54 e 49 kDa (LOGULLO et al., 1998). A BYC, em experimentos de imunização, induziu resposta protetora parcial. A inoculação de anticorpos monoclonais em teleóginas produziu um decréscimo na oviposição dose-dependente em relação ao controle (SILVA VAZ JR et al., 1998).

Del Pino et al. (1998) trabalharam com extratos de larvas de *B. microplus* e isolaram a HEX (*N*-acetilhexosaminidase), enzima que hidrolisa resíduos de açúcar de glicoconjugados. Esta enzima foi encontrada na hemolinfa de carrapatos fêmeas adultas, mas não na saliva, obedecendo o critério de antígenos ocultos. Anticorpos policlonais anti-HEX foram inoculados em teleóginas resultando em um decréscimo de 26% na oviposição, o que demonstra um potencial uso desta enzima em uma vacina.

Três peptídeos sintéticos (SBm4912, SBm7462 e SBm19733) derivados da glicoproteína Bm86 foram construídos e utilizados para a imunização de animais. Os peptídeos foram inoculados nos animais com saponina como adjuvante. Os melhores resultados de eficácia, 81,05%, foram obtidos com o peptídeo sintético SBm7462 (PATARROYO et al., 2002). A vacina composta

por este peptídeo continua em teste biológico e a viabilização de produção em larga escala está sendo estudada.

Andreotti et al. (2002) identificaram uma proteína inibidora de serino-proteases (BMTI), que possui um efeito protetor de 72,8%, após a administração de três doses nos animais. A vacina continua em teste.

Além dos já citados, outros antígenos potenciais para o desenvolvimento de vacinas são os antígenos pró-catepsina e o antígeno B (WILLADSEN, 2001).

A vitelina, proteína presente em maior quantidade nos ovos do *B. microplus* foi isolada e purificada, assim como a proteína GP80 que foi purificada de larvas. Anticorpos produzidos contra estas duas proteínas reconhecem um polipeptídeo de 200 kDa presente na hemolinfa de fêmeas adultas de carrapato. Ovinos vacinados com estas proteínas tiveram redução no número e no peso das fêmeas de carrapatos ingurgitadas e também redução na oviposição (TELLAM et al., 2002). Neste mesmo estudo, uma outra proteína recombinante a “hexahis-GP80”, que tinha problemas conformacionais e não era glicosilada, não mostrou efeitos significativos no carrapato.

Uma vacina eficiente deveria conter dois ou mais antígenos de diferentes estágios de vida e partes do carrapato, de tal forma que a imunidade induzida pela vacina no animal hospedeiro poderia conter um número maior de chances de causar danos ao parasita. Esta estratégia aumentaria a eficiência da vacina e diminuiria o potencial para o desenvolvimento de resistência pelos carrapatos (TELLAM et al., 2002).

1.2 - Phage Display

A técnica de *phage display* foi desenvolvida por Smith (1985) ao realizar a expressão da enzima de restrição EcoRI através da fusão com a proteína oito (pVIII) do capsídeo do fago.

A metodologia do *phage display* é uma forma de seleção em que uma biblioteca de peptídeos ou proteínas com as seqüências randomizadas são expressas no exterior da partícula viral, enquanto o material genético

codificante para cada resíduo encontra-se no genoma viral (PARMLEY e SMITH, 1988). Com isto, é possível a correlação entre cada seqüência da proteína variante e sua respectiva seqüência de DNA, com o qual permite rápida caracterização baseada na afinidade de ligação para uma molécula alvo. Foram expressos na superfície viral anticorpos (BARBAS III et al., 1992; HOOGENBOOM, 1997; RADER et al., 1997), peptídeos (NOREN e NOREN, 2001), enzimas (SOUMILLION et al., 1994), receptores de superfície celular (ROBERTSON, 1993), entre outras estruturas. O bacteriófago M13 (SIDHU, 2001), ou simplesmente fago, é um vírus filamentosos que parasita bactérias gram-negativas, que apresentam pilus F. O vírus utiliza a maquinaria de replicação, transcrição e tradução da bactéria para se reproduzir. Não provoca lise na célula hospedeira, mas induz um estado no qual a célula infectada origina e libera partículas virais, causando uma queda na taxa de reprodução bacteriana (AZZAZY e HIGHSMITH, 2002). Vetores virais como o fago lambda (STERNBERG e HOESS, 1995), bacteriófagos T4 e P4 (HOUSHMAND et al., 1999; LINDQVIST e NADERI, 1995), além dos vírus de eucariotos, tais como baculovírus, também podem ser utilizados neste processo (BOUBLIK et al., 1995).

O vetor M13KE, derivado do vetor de fagos m13mp19 possui uma rápida propagação e não necessita de seleção por antibiótico ou superinfecção por fago helper. Além disto, o gene *lacZ*, presente neste vetor, facilita a distinção entre colônias bacterianas infectadas com fagos de bibliotecas (colônias azuis) e colônias não infectadas ou infectadas com fagos selvagens (colônias brancas) (MESSING et al., 1977; MESSING, 1983). O vetor M13KE permite a construção e propagação de bibliotecas de *phage display* pelo uso de técnicas padronizadas para fagos M13. Para pequenos insertos, a biblioteca pode ser amplificada repetidamente com pouca perda de seqüências e diversidade (BARBAS et al., 2001).

A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 1B). Destas cinco proteínas existem aproximadamente 2800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou

proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da capa protéica do fago (PHIZICKY e FIELDS, 1995; BRÍGIDO e MARANHÃO, 2002). Assim, o peptídeo é expresso na extremidade N-terminal da pIII ou pVIII. A pIII está relacionada com a infectividade do fago pela ligação ao pilus F da célula bacteriana. Ela apresenta três domínios (D1, D2 e D3) separados por resíduos de glicina. Estudos cristalográficos estruturais dos domínios D1 e D2 mostraram uma conformação semelhante à ferradura de cavalo (LUBKOWSKI et al., 1998; HOLLIGER et al., 1999), ilustrado na figura 2C. Devido a baixa representatividade da pIII em relação a pVIII as bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados na pIII são mais indicadas para descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas com as bibliotecas pVIII ligadas (BRÍGIDO e MARANHÃO, 2002).

O sistema *phage display* foi criado para a exposição de bibliotecas de pequenos peptídeos (no máximo 30 aminoácidos) (PHIZICKY e FIELDS, 1995). Isto porque o tamanho da proteína inserida no vetor deve ser limitado, pois grandes proteínas interferem nas funções das proteínas do capsídeo, tornando o fago pouco infectivo.

O peptídeo ou proteína expresso na superfície do fago possibilita a seleção de seqüências baseada na afinidade de ligação para uma molécula alvo por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning* (PARMLEY e SMITH, 1988).

- Biopanning

A seleção, ou *biopanning*, é realizada pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. O alvo é imobilizado em um suporte sólido tais como placas de ELISA, *beads*, resinas e membranas. Os fagos não ligados ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas, e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O *pool* de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção biológica ou *biopanning* (ciclos de ligação, eluição e amplificação) para o enriquecimento do conjunto de fagos com seqüências específicas contra o alvo. Após três ou quatro passagens, os clones individuais são caracterizados por

seqüenciamento de DNA, *western blotting* ou ELISA (SMITH, 1985), conforme mostrado na figura 2.

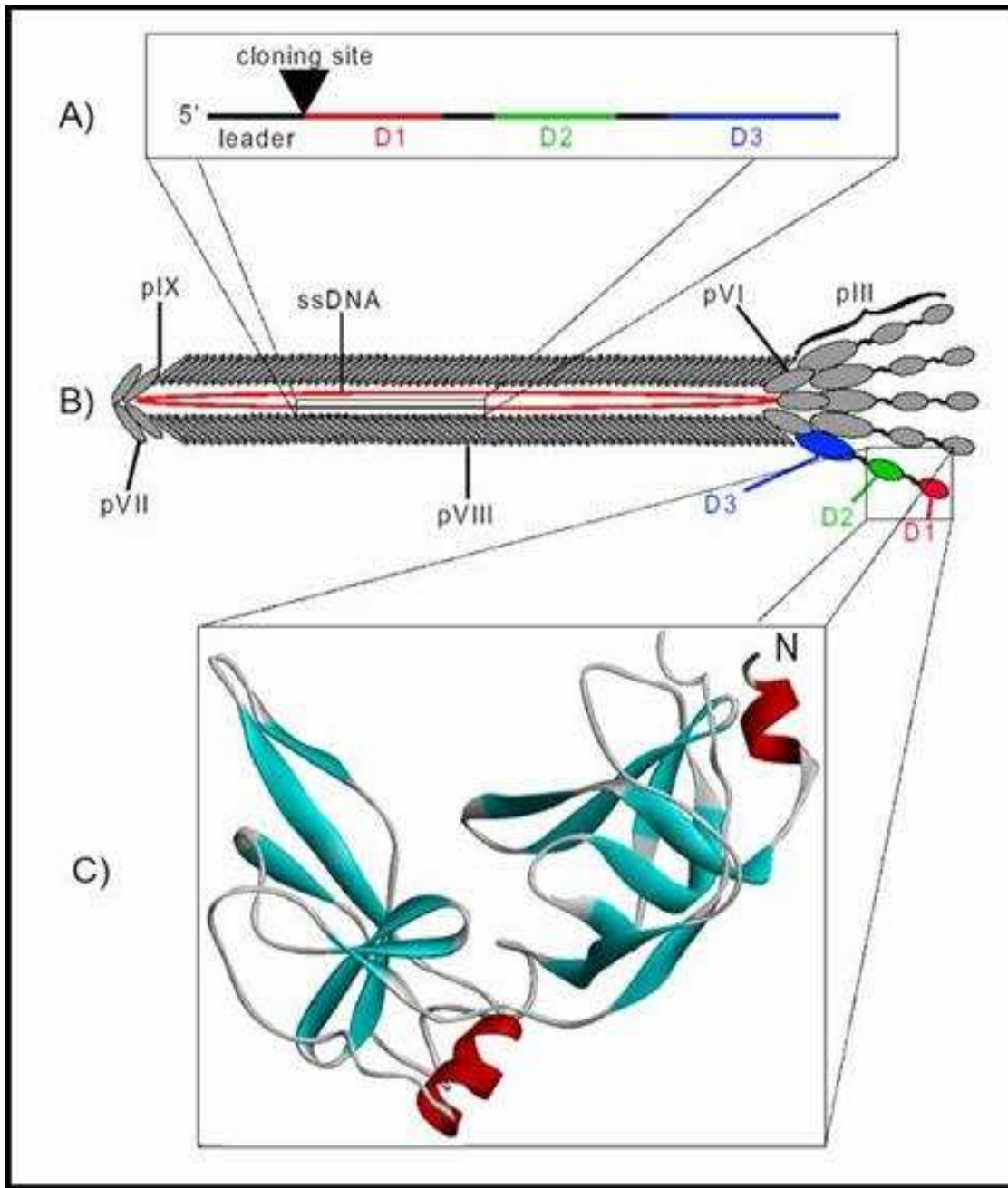


Figura 1- Fago filamentoso. A) Composição do gene III, mostrando o sitio de clonagem para introdução do gene adicional; B) Partícula viral com as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e PIX; C) Cristalografia dos domínio D1 e D2 da proteína III (HOLLIGER e WILLIAMS, 1999), as alfa-hélices estão coloridas em vermelho e as fitas β em ciano.

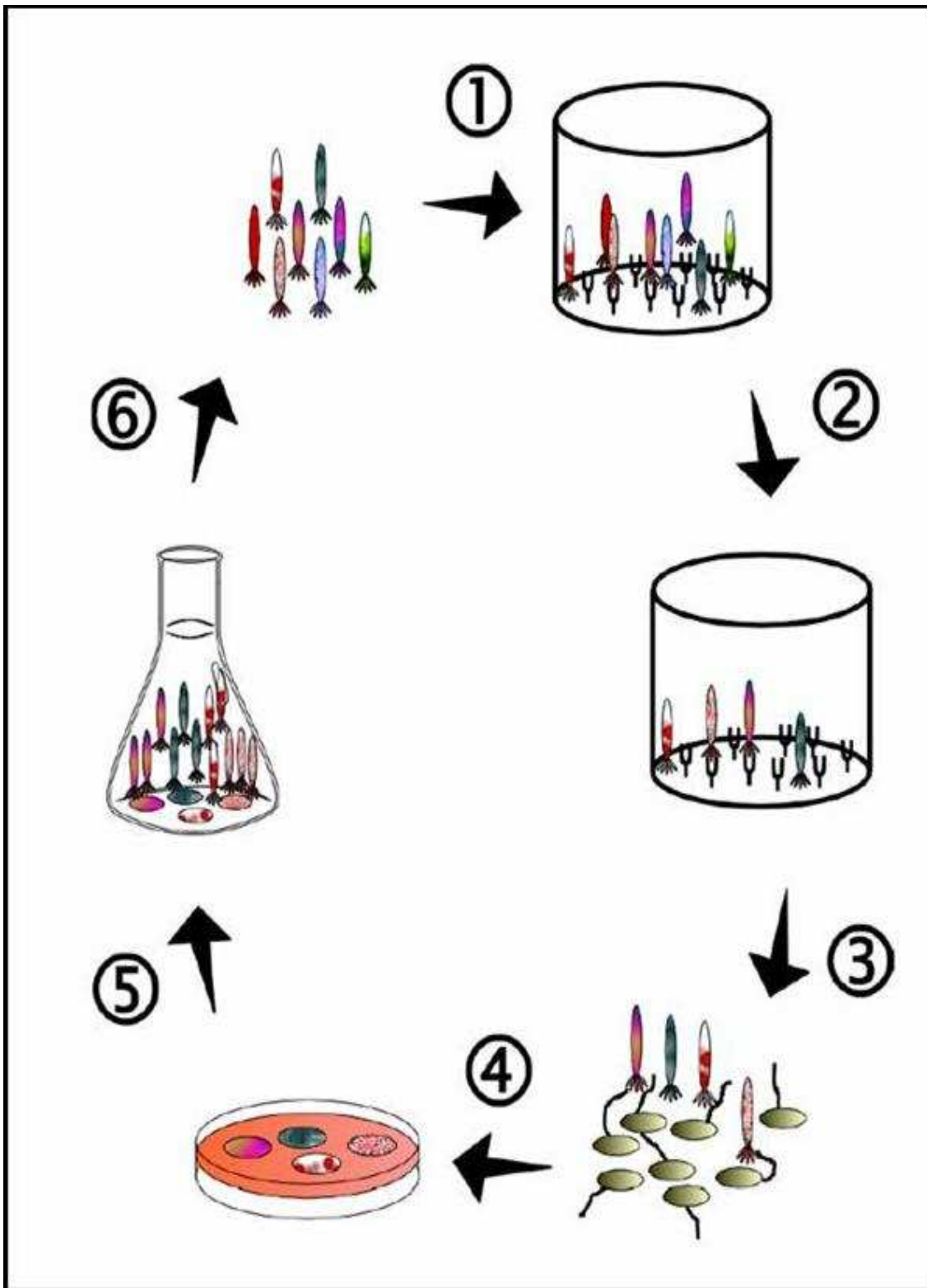


Figura 2- Esquema representativo do processo de *biopanning*. 1) Incubação da biblioteca de fagos com o alvo imobilizado; 2) Retirada dos fagos não ligados por lavagens sucessivas; 3) Eluição dos fagos ligados e infecção de *E. coli* com pili F; 4) Amplificação dos fagos eluídos; 5) Titulação dos fagos eluídos; 6) População de fagos com maior afinidade pelo alvo.

Aplicação da técnica

Várias aplicações das bibliotecas de peptídeos randômicos expostos em fagos têm sido realizadas com sucesso, tais como mapeamento de epítomos (JEFFERIES, 1998), desenvolvimento de vacinas (IRVING et al., 2001), identificação de substratos de proteínas quinases/ligantes de SH2 (KAY et al., 2001), e identificação de peptídeos miméticos de ligantes não peptídeos (OLDENBURG, 1992). As vantagens da utilização da técnica são a habilidade de selecionar ligantes de alta afinidade, a possibilidade de produzir proteínas solúveis, o baixo custo, o fácil manuseio e a rapidez (SMITH e PETRENKO, 1997). Uma particular aplicação é a identificação de novos peptídeos bioativos pela seleção contra receptores de superfícies celulares imobilizados ou em células intactas (SILVA JR et al., 2002). *Phage display* pode ser utilizado também *in vivo* para identificar peptídeos que se ligam em órgãos específicos. Neste caso, a biblioteca de fagos é injetada por via intravenosa, geralmente em roedores, e após o período de incubação os órgãos de interesse são removidos, homogeneizados e mantidos em suspensão com *E. coli* (RAJOTTE et al., 1998).

Os peptídeos sintéticos expressos em fagos são mapeados em solução na qual as bibliotecas contêm em torno de 10^{15} possíveis seqüências, resultando em um conjunto de peptídeos com afinidades variáveis pelo alvo. Pelo sistema de bibliotecas de fagos, mais de 10^9 seqüências de peptídeos diferentes podem ser facilmente mapeadas e os fagos selecionados são amplificados por propagação em *E. coli* (NOREN e NOREN, 2001).

Uma aplicação especial ocorreu na seleção de uma biblioteca contra taxol e as seqüências dos peptídeos selecionados foram comparadas a um banco de proteínas para identificar o alvo natural (RODI et al., 1999). Isto demonstra que pequenos peptídeos de uma biblioteca linear podem imitar o local de ligação no aspecto tridimensional do ligante, confirmando o grande potencial destas bibliotecas.

A biblioteca em fagos foi capaz de obter peptídeos específicos de anticorpos monoclonais e policlonais, epítomos lineares, tanto quanto

mimetopos, os que imitam epitopos lineares, descontínuos, conformacionais e até mesmo epítopos não peptídicos de antígenos.

Fagos também são comumente utilizados como partículas imunogênicas para a geração de anticorpos contra os peptídeos recombinantes expressos nas regiões aminoterminais de proteínas de superfícies, e reagir cruzadamente com o alvo original, indicando que mimetopos expressos poderiam ser utilizados como candidatos a subunidades vacinais (WILLIS, 1993; MEOLA et al., 1995; DEMANGEL et al., 1996; YANG e SHIUAN, 2003).

Manoutcharian et al. (2004) utilizaram pela primeira vez fagos recombinantes como vacinas em suínos e verificaram a capacidade de indução de resposta imune por fagos contendo peptídeos recombinantes da *Taenia solium*, agente causador da cisticercose em humanos, e tendo os suínos como hospedeiro intermediário.

O presente trabalho consiste na aplicação da técnica de *phage display* para a identificação e seleção de peptídeos específicos (mimetopos) de larvas do carrapato *B. microplus* e imunização de camundongos e bovinos com os clones selecionados por frequência e antigenicidade (bioinformática). A primeira etapa compreende a seleção de mimetopos, através de anticorpos policlonais de galinha, potencialmente antigênicos, candidatos à uma vacina polimunogênica. A segunda etapa consiste na imunização e caracterização da resposta imunológica aos peptídeos selecionados após inoculação em camundongos e bovinos. A terceira etapa é o desafio da espécie alvo com larvas do *B. microplus* e caracterização da resposta imune protetora.

2 – OBJETIVOS

- Selecionar e caracterizar peptídeos sintéticos (mimetopos) de proteínas totais da fase larval do carrapato (*Boophilus microplus*) com afinidades ligantes específicas por *phage display* a partir de anticorpos policlonais de galinha com a finalidade de identificar possíveis antígenos vacinais.
- Amplificar e titular os clones dos peptídeos sintéticos de larvas de carrapato selecionados por frequência antigenicidade predita.
- Inocular os peptídeos selecionados em camundongos e bovinos e caracterizar a resposta imunológica induzida. Desafiar a espécie alvo (bovinos) com larvas de cepa de campo do *B. microplus* e observar a resposta imune protetora.

3 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreotti, R.; Gomes, A.; Malavazi-Piza, K.C.; Sasaki, S.D.; Sampaio, C.A.M.; Tanaka, A.S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International Immuno Pharmacology*, v. 2, p.557– 563, 2002.

Arthur, D.R. Ticks. A monograph of the Ixodoidea. On the genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomna* *Boophilus* and *Margaropus*. London. Cambridge Univ. Press, 1960.

Azzazy, H. M.; Highsmith Jr., W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin. Biochem.*, v.35, p.425-445, 2002.

Barbas, C.F.III; Burton, D.R.; Scott, J.K.; Silverman, G.J. Phage Display: A Laboratory Manual. Plain view, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Barbas, C.F.III; Bain, J.D.; Hoekstra, D.M.; Lerner, R.A. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 89, p. 4457, 1992.

Barros, A .T.M.; Evans, D.E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovinos, *Boophilus microplus*. *Pesq. Vet. Bras.* v . 9, n. 1/2, p. 17-21, 1989.

Bennett, G.F. *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae) on the bovine Inst. I – Mortality during the developmental cycle. *Acarologia*, v. 16, p. 643-650, 1975.

Bittencourt, V.R.E.P.; Peralva, S.L.F.S.; Viegas, E.C.; Alves, S.B. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.5, n. 2, p. 81-84, 1996.

Boublik, Y.; Di Bonito, P.; Jones, I. M. Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis

virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Biotechnolog.*, v. 13, p. 1079-1084, 1995.

Brígido, M.M.; Maranhão, A.Q. Bibliotecas Apresentadas em FAGOS *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. n.26, 2002.

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

Davis, G.P. Genetic parameters for tropical beef cattle in northern Australia a review. *Aust. J. Agric. Res.*, v. 44, p. 179, 1993.

Del Pino, F.A.B.; Brandelli, A.; Gonzales, J.C.; Henriques, J.A.P.; Dewes, H. Effect of antibodies against -N-acetylhexosaminidase on reproductive efficiency of the bovine tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.*, v. 79, p. 247–255, 1998.

Demangel, C.; Lafaye, P.; Mazie, J.C. Reproducing the immune response against the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 with mimotopes selected from a phage-displayed peptide library. *Mol Immunol.*, v. 33, p. 909-16, 1996.

Diehl, P.A. ; Aeschlimann, A. ; Obenchain, F.D. Tick reproduction: oogenesis and oviposition, In: Obenchain, F.D. & Galun, R. Physiology of ticks. Pergamon Press Ltda 1st, Oxford, p.277-349, 1982.

Doube, B.M.; Kemp, D.H. The influence of temperature, relative humidity, and host factors on the attachment and survival of *Boophilus microplus* (Canestrini) larval to skin slices. *Inst. J. Parasitol.*, v. 9, p. 449-454, 1979.

Elder, J.K.; Kearnan, J.F.; Waters, K.S.; Dunwell, G.H.; Emmerson F.R., Knott S.G. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistance cattle and pasture spelling. *Aust. Vet. J.*, v. 56, p. 219–231, 1980.

Farias, N. A . R.; Gonzales, J.C.; Saibro, J.C. Antibiose e antixenose entre forrageiras e larvas de carrapato-do-boi. *Pesq. Agrop. Bras.*, v. 21, n. 12, p. 1313-1320, 1986.

Fortes, E. *Parasitologia Veterinária*. Porto Alegre, Sulina, edição , 453p., 1987.

Furlong, J.; Martins, J.R.; Prata, M.C.A . Controle estratégico do carrapato dos bovinos. *A Hora Veterinária*, v. 23, n. 137, p. 53-56, 2004.

Furlong, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. *Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG*, Belo Horizonte, MG. n. 8, p. 46-61, 1993.

Garcia-Garcia J.C., Montero C., Redondo M., Vargas M., Canales M., Boue O., Rodriguez M., Joglar M., Machado H., Gonzalez I.L., Valdes M., Mendez L., De La Fuente. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus* *J. Vaccine*. v.18, n. 21, p.2275-87, 2000.

Gomes, A .G. Resistência a infestação natural por larvas, ninfas e adultos de *Boophilus microplus* em vacas zebuínas da raça Gir, em função de sua idade, gestação, da lactação e da seleção para produção leiteira, com e sem tratamento carrapaticida, ao longo de 12 estações consecutivas de um triênio. Tese (doutorado), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 90 p., 1992.

Gonzáles, J.C. O controle do carrapato dos bovinos. Porto Alegre, Sulina, 103 p., 1975.

Gonzáles, J.C. O controle do carrapato do boi. Porto Alegre. Edição do autor, 1993.

Gonzáles, J.C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Can. 1887) (Revisão histórica e conceitual). *A Hora Veterinária*, v. 21, n. 125, janeiro/fevereiro, p. 23-28, 2002.

Gough, J.M.; Kemp, D.H. Localization of low abundance protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. *J. Parasitol.*, v. 79, p. 900-907, 1993.

Grisi, L.; Massard, C.L.; Moya Borja, G.E.; Pereira, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

Hitchcock, L.F. Studies of the non parasitic stages on the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). *Austral. J. Zool.*, v. 3, p. 295-311, 1955.

Holliger, P.; Williams, R. L.; Riechmann, L. Crystal structure of the two N terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Å: Evidence for conformational lability. *J. Mol. Biol.*, v. 288, p. 649-657, 1999.

Hoogenboom, H.R. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol.*, v. 15, p. 62-70, 1997.

Horn, S.C.; Arteché, C.C.P. Carrapato, berne e bicheira, inquérito nacional, 1983, divulgado pelo Ministério da Agricultura, Brasília, maio de 1984.

Houshmand, H.; Froman, G.; Magnusson, G. Use of bacteriophage T7 displayed peptides for determination of monoclonal antibody specificity and biosensor analysis of the binding reaction. *Anal. Biochem.*, v. 268, p. 363-370, 1999.

Irving, M. B.; Pan O.; Scott, J.K. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5, p. 314–324, 2001.

Jefferies, D. Selection of Novel Ligands from Phage Display Libraries: An Alternative Approach to Drug and Vaccine Discovery. *Parasitology Today*, v. 14, n. 5, 1998.

Johnston, L.A.Y.; Kemp, D.H.; Pearson, R.D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks : effects of induced immunity on tick populations. *Int. J. Parasitol.*, v. 16, p. 27-34, 1986.

Kay, B.K.; Kasanov, J.; Yamabhai, M. Screening Phage-Displayed Combinatorial Peptide Libraries. *Methods*, v. 24, p. 240–246, 2001.

Labruna, M.B.; Leite, R.C. Vacinas contra carrapatos. *Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG*, n. 27, p. 27-42, 1999.

Legg, J. Some observations on the life history of the cattle tick (*Boophilus australis*). *Proc. R. Soc. Queensland*, v. 41, p. 121-132, 1930.

Lindqvist, B. H.; Naderi, S. Peptide presentation by bacteriophage P4. *FEMS Microbiol. Rev.* v. 17, p. 33-39, 1995.

Logullo, C.; Da Silva Vaz, J.R.; Sorgine, M.H.F.; Paiva, I.; Silva, G.O.; Faria, F.S.; Zingali, R.; Rosa De Lima, M.; Abreu, L.; Oliveira, E.F.; Alves, E.W.; Masuda, H.; Gonzales, J.C.; Masuda, A.; Oliveira, P.L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitol.*, v. 116, p. 525-532, 1998.

Londt, J.G.H.; Arthur, D.R. The structure and parasitic life cycle of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae). *J. Ent. Soc. Sth. Afr.*, v. 38, p. 321-340, 1975.

Lubkowski, J.; Henneke, F.; Plückthun, A.; Wlodawer, A. The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure domains of g3p. *Nature Struct. Biol.*, v. 5, p. 140-147, 1998.

Madalena, F.E.; Teodoro, R.L.; Lemos, A . M.; Oliveira, G.P. Causes of variation of field burdens of cattle ticks (*B. microplus*). *Rev. Bras. Genet.*, v. 8, n. 2, p. 361-375, 1985.

Manoutcharian, K.; Diaz-Orea, A.; Gevorkian, G.; Fragoso, G.; Acero, G.; Gonzalez, E.; Aluja, A.; Villalobos, N.; Conde, E.G.; Sciutto, E. Recombinant

bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004.

May, R.M. Parasitic infections as regulators of animal populations. *Am. Scient.*, v. 71, p. 36-45, 1983.

Mckenna, R.V.; Riding, G.A.; Jarmey, J.A.; Pearson, R.D.; Willadsen, P. Vaccination of cattle against *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. *Parasite Immunology*, v. 20, p. 325-36, 1998.

Meola, A.; Delmastro, P.; Monaci, P.; Luzzago, A.; Nicosia, A.; Felici, F.; Cortese, R.; Galfre, G. Derivation of vaccines from mimotopes. *J. Immunol.*, v. 154, p. 3162-3172, 1995.

Messing, J. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* v. 101, p. 20-78 1983.

Messing, J.; Gronenborn, B.; Muller, H.B.; Hans, H.P. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a *Hind*III fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 74, p. 3642-3646, 1977.

Moraes, F.R. Avaliação comparativa e recíproca da relação parasito-hospedeiro em taurinos e zebuínos naturalmente infestados por *Boophilus microplus* (Canestrini) . Aspectos morfológicos e patológicos. Tese (doutorado), FCAV, Unesp, Jaboticabal, SP, 106 p, 1988.

Noren, K. A.; Noren, C.J. Construction of High-Complexity Combinatorial Phage Display Peptide Libraries. *Methods.* v. 23, p. 169-178, 2001.

Nuñez, J.L.; Cobeñas, M.E.M.; Moltedo, H.L. *Boophilus microplus*, La garrapata comum del ganado vacuno. Hemisfério Sur 1^a Ed. Bs. Rep. Argentina, 184p., 1982.

Oldenburg, K.R. Peptide ligands for a sugar binding protein isolated from a random peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 89, p. 5393-5397, 1992.

Oliveira, G. P.; Alencar, M. M. A resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. I. Infestação artificial. *Pesq. Agrop. Bras.*, v. 22, n. 4, p. 433-439, 1987.

Parmley, S.; Smith G. Antibody-selectable filamentous fd phagevectors: affinity purification of target genes. *Gene*, v. 73, p. 305–318. 1988.

Patarroyo, J.H.; Portela, R.W.; De Castro, R.O; Couto Pimentel, J.; Guzman, F.; Patarroyo, M.E.; Vargas, M.I.; Prates, A.A.; Dias Mendes, M.A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 88, p. 163–172, 2002.

Pereira, M.C. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): revisão taxionômica e morfobiológica. Dissertação de Mestrado, USP, São Paulo, 123p., 1980.

Phizicky, E. M.; Fields, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol.*, v. 59, p. 94-123, 1995.

Rader, C.; Barbas, III C.F. Phage display of combinatorial antibody libraries. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 8, p. 503-508, 1997.

Rajotte, D.; Arap, W.; Hagedorn, M.; Koivunen, E.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by *in vivo* phage display. *J. Clin. Invest.*, v. 102, p. 430-437, 1998.

Rand, K.N.; Moore, T.; Sriskantha, A.; Spring, K.; Tellam, R.; Willadsen, P.; Cobon, G.S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 86, p. 9657-9661, 1989.

Randolph, S.E. Population regulation in ticks: the role of acquired resistance in natural and un-natural hosts. *Parasitology*, v. 79, p. 141-156, 1979.

Ribeiro, J.M.C. Role of saliva in tick/host interactions. *Experimental Applied Acarology*, v. 7, p. 15-20, 1989.

Riding, G.A.; Jarmey, J.; McKenna, R.V.; Pearson, R.; Cobon, G.S.; Willadsen, P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*: purification, localization and possible function. *J. Immunol.*, v. 153, p. 5158–5166, 1994.

Riek, R.F. Studies on the reaction of animals to infestation with ticks. V. Laboratory animals as hosts for cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Austral. J. Agric. Res.*, n. 10, p. 614-619, 1959.

Robertson, M. W. Phage and *Escherichia coli* expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor alpha-subunit ectodomain. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p. 12736-12743, 1993.

Rocha, U.F.; Banzatto, D.H.; Costa, A. J.; Galluzzi, F.D.; Garcia, M.C.C.; Faleiros, R.B.; Vidotto, O. Nova técnica de cubagem para estudo de correlações entre volume e peso de carrapatos e sua longevidade e prolificidade. *Sêmima*, v. 6, n. 2, p. 69-74, 1985.

Rodi, D.J.; Makowski, L. Phage-display technology – finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 10, p. 87-93, 1999.

Rodriguez, M.; Rubiera, R.; Manuel, P.; Montesinos, R.; Cremata, J.; Falcon, V.; Sanchez, G.; Bringas, R.; Cordov, S.; Valdes, M.; Lleonart, R.; Herrera, L.; De La Fuente, J. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J. Biotech.*, v. 33, p. 135-146, 1994.

Schleger, A.V.; Lincoln, D.T.; McKenna, R.V.; Kemp, D.H.; Roberts, J.A. *Boophilus microplus* cellular responses to larval attachment and their relationship to host resistance. *Austral. J. Biol. Sci.*, v. 29, p. 499-512, 1976.

Sidhu, S.S. Engineering M13 for phage display. *Biomol. Eng.*, v. 18, p. 57-63, 2001.

Silva, C.R. Estudo sazonal, ao longo de um ano solar, da dinâmica populacional dos estágios parasitários de *Boophilus microplus* na pele de hospedeiros *Bos indicus* da Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em Uberaba, MG, Brasil. Tese

(mestrado). Centro de Ciências Biomédicas Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, 58p., 1996.

Silva, J.R.A.; Kawazoe, U.; Freitas, F.F.T.; Gatti, M.S.V.; Dolder, H.; Schumacher, R.I.; Juliano, M.A.; Silva, M.J.; Leite, A. Avian anticoccidial activity of a novel membrane interactive peptide selected from phage display libraries. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 120, p. 53–60, 2002.

Silva Vaz Jr, I.; Logullo, C.; Sorgine, M.; Velloso, F.F.; Lima, M.F.R.; Gonzalez, J.C.; Masuda, H.; Oliveira, P.L.; Masuda, A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 66, p. 331-341, 1998.

Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v. 228, p. 1315-1317, 1985.

Smith, G.P.; Petrenko V.A. Phage Display. *Chem. Rev.*, v. 97, p. 391-410, 1997.

Soumillion, P.; Jespers, L.; Bouchet, M.; Marchand-Brynaert, J.; Winter, G.; Fastrez, J. Selection of β - lactamase on filamentous bacterio phage by catalytic activity. *J. Mol. Biol.*, v. 237, p. 415-422, 1994.

Spinosa, H.S.; Górnaiak, S.L.; Bernardi, M.M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A, 2° edição, 646p., 1999.

Stear, M.J.; Nicholas, F.W.; Brown, S.C.; Holroyd, R.G. Class I antigens of the bovine major histocompatibility system and resistance to the cattle tick (*Boophilus microplus*) assessed in three different seasons. *Vet. Parasit.*, v. 31, p. 303-315, 1989.

Sternberg, N.; Hoess R.H. Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 92, p.1609-1613, 1995.

Sutherst, R.W.; Kerr, J.D.; Maywald, G.F.; Stegeman, D.A. The effect of season and nutrition on the resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus*. *Austral. J. Agric. Res.*, v. 34, n. 3, p. 329-339, 1983.

Teixeira Leite, N.; Ariza, A.T.O.; Gianini, M.C.; Miranda, M.A. Alguns prejuízos que os carrapatos bovinos (*Boophilus microplus*) podem causar. *Ecossistema*, v. 16, p. 137-141, 1991.

Tellam, R.L.; Kemp, D.; Riding, A.G.; Briscoe, A.S.; Smith, B.D.; Sharp, B.P.; Irving, B.D.; Willadsen, P. A reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Veterinary Parasitology*, v. 103, p. 141–156, 2002.

Tellam, R.L.; Smith, D.; Kemp, D.H. Vaccination against ticks. In: Yong, W.K. (ed) *Animal parasite control utilizing biotechnology*. Boca Raton: CRC Press, p. 303-331, 1992.

Tizard, I.R. *Veterinary immunology*. Saunders Company, 6^a ed, 482p, 2000.

Turnbull, I.F.; Smith, D.R.J.; Sharp, P.J. Expression and secretion in *Aspergillus nidulans* and *A. niger* of a cell surface glycol-protein from the cattle tick, *Boophilus microplus*, by using the fungal *amdS* promoter system. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 56, p. 2847-2852, 1990.

Utech, K.B.W.; Wharton, R.H.; Kerr, J.D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. *Austral. J. Agric. Res.*, v. 29, p. 885-895, 1978.

Veríssimo, C.J. Relatório de estágio sobre o carrapato *Boophilus microplus*. *Zootecnia*, v. 25, n. 4, p. 295-332, 1987.

Veríssimo, C.J. Estudo da resistência e suscetibilidade ao carrapato bovino (*Boophilus microplus*) em rebanho mestiço. Tese (mestrado), FCAV, Campus de Jaboticabal, UNESP, 163 p., 1990.

Walker, A.R. Estudios inmunologicos em relación al control de garrapatas. In: *Semin. Intern. Med. Bovina 4 Memorias*, p. 80-87, 1987.

Wharton, R.H.; Utech, K.B. W.; Turner, H.G. Resistance to the cattle tick *Boophilus microplus* In a herd of Australian Illawarra. Shorthorn cattle: its assessment and heritability. *Austral. J. Agric. Res.*, v. 21, p. 163-181, 1970.

Wharton, R.H. Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. In: PAL, R. & WHARTON, R.H. Control of arthropods of medical and veterinary importance. Planum Press, London, 1974.

Wikel, S.K. The induction of host resistance to tick infestation with salivary gland antigen. *American J. Trop. Med. Hyg.*, v. 30, p. 284-288, 1981.

Wilkinson, P.R. Observation on the sensory physiology and behavior of larvae of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae). *Austral. J. Zool.*, v. 1, p. 345-356, 1953.

Willadsen, P. Novel vaccines for ectoparasites. *Veterinary Parasitology*, v. 71, p. 209-22, 1997.

Willadsen, P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary Parasitology*, v. 101, p. 353-367, 2001.

Willadsen, P.; Cobon, G.; Hungerford, J. The role of vaccination in current and future strategies for tick control. In: Seminário Internacional de Parasitologia Animal. Acapulco, Mexico. Proceedings, p. 88-100, 1995.

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*, v 18, p. 241-246, 1996.

Willadsen, P.; Riding, G.A.; Mckenna, R.V.; Kemp, D.H.; Tellam, R.L.; Nielsen, J.N. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J. Immunology*, v. 143, p. 1346-51, 1989.

Willadsen, P.; Wood, G.M.; Riding, G.A. The relation between skin histamine concentration, histamine sensitivity and the resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus*. *Zeitschrift fur parasitenkunde*, v. 39, p. 87-93, 1977 (citado por Veríssimo, C.J., 1990).

Willis, A.E. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene*, v. 128, p 79–83, 1993.

Yang, W.J.; Shiuan, D. Plaque reduction test: an alternative method to assess specific antibody response to pIII-displayed peptide of filamentous phage M13. *Journal of Immunological Methods*, v. 276, p. 175-183, 2003.

Capítulo Único

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A
PEPTÍDEOS SINTÉTICOS MIMETOPOS DE PROTEÍNAS
TOTAIS DE LARVAS DO CARRAPATO *Boophilus
microplus* (ACARI: IXODIDAE) EM
CAMUNDONGOS E BOVINOS**

Capítulo Único

RESUMO GERAL

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A PEPTÍDEOS SINTÉTICOS MIMETOPOS DE PROTEÍNAS TOTAIS DE LARVAS DO CARRAPATO *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) EM CAMUNDONGOS E BOVINOS

O carrapato *Boophilus microplus* é um dos mais importantes artrópodes que parasitam os bovinos, causando grandes prejuízos à pecuária mundial pelos seus efeitos diretos e indiretos. A aplicação de produtos químicos é o principal método de controle deste parasita, mas em função das desvantagens desta prática, o uso de vacinas é uma boa alternativa, por serem livres de resíduos, específicas e apresentarem menor possibilidade de desenvolver resistência. Com o objetivo de selecionar peptídeos sintéticos expressos no capsídeo de bacteriófagos *phage display* produziu-se soro policlonal em galinhas previamente sensibilizadas com proteínas totais de larvas do carrapato *Boophilus microplus*. Os peptídeos encontrados em maior frequência e com maior índice antigênico (bioinformática e dot blotting com soro de galinha), foram selecionados para a imunização de camundongos e bovinos. Os dados iniciais inferem que os peptídeos em fagos induziram resposta imune, avaliada pelo teste de Elisa, sendo os mais imunogênicos o 2D7 (SNNADYKQSLLL), o 2E6 (VNWNSWHKTNLS), o 2F3 (SIPTYTPDKVITY) e o 2E4 (DAWKMRLSQMYD). As seqüências selecionadas no presente trabalho apresentam os motivos protéicos NxxxKxxL (2D7, 2E6 e 2E4) e o motivo TPDKS (2E4). Estas seqüências apresentaram similaridades estruturais com algumas proteínas do carrapato principalmente a calreticulina. Estudos complementares estão sendo realizados para caracterizar a sensibilidade e especificidade aos peptídeos selecionados.

Palavras-chave: Peptídeos sintéticos, *Boophilus microplus*, *phage display*, calreticulina, bovinos.

GENERAL ABSTRACT

EVALUATION OF THE IMMUNOLOGIC RESPONSE FROM SYNTHETIC MIMETIC PEPTIDES OF TOTAL LARVA PROTEINS OF *Boophilus microplus* TICK (ACARI: IXODIDAE) IN MICE AND BOVINES

The *Boophilus microplus* tick is one of the most important arthropods that can parasitize bovines, causing great damages to the world livestock through direct and indirect effects. The application of chemical products is the principal method of controlling this parasite, but in function of the disadvantages of this practice, the use of vaccines is a good alternative, because they are residue free, specific and present smaller possibility to develop resistance. With the objective of selecting synthetic peptides expressed in the capsid of phage display bacteriophages, it was produced the serum polyclonal in chickens previously sensitized with total larva proteins of the *Boophilus microplus* tick. The peptides found in larger frequency and with larger antigenic index (bioinformatics and dot blotting with chicken serum) were selected for the immunization of mice and bovines. The initial data infer that the peptides in phagos induced immune response, evaluated by Elisa test, and the more immunogenic are: 2D7 (SNNADYKQSLL), 2E6 (VNWNSWHKTNLS), 2F3 (SIPTYTPDKVTY) and 2E4 (DAWKMRLSQMYD). The sequences selected in the present work introduce the protean motives NxxxKxxL (2D7, 2E6 and 2E4) and the motive TPDKS (2E4). These sequences presented structural similarities with some tick proteins, mainly the calreticulin. Complementary studies are being accomplished to characterize the sensibility and specificity to the selected peptides.

Keywords: Synthetic peptides, *Boophilus microplus*, phage display, calreticulin, bovines.

INTRODUÇÃO

O carrapato *Boophilus microplus* é um dos mais importantes artrópodes parasita de bovinos. Esse parasitismo causa grandes perdas econômicas na pecuária da América do Sul, Central e Austrália. As perdas são decorrentes dos efeitos diretos, tais como a ingestão de sangue pelo carrapato, e indiretos, como a transmissão de patógenos que resultam em infecções na maioria das vezes fatais aos bovinos (PATARROYO et al., 2002).

Horn e Arteche (1984) de acordo com as informações fornecidas pelas Secretarias de Agricultura dos estados brasileiros, calcularam os prejuízos causados pelos *B. microplus*, que chegavam a um total de US\$ 968 milhões. GRISI et al. (2002) estimaram que, em função do crescimento do rebanho bovino de 76 milhões de cabeças em 1983 para 169 milhões em 2000, estas perdas poderiam ultrapassar os 2 bilhões de dólares. Os prejuízos, considerando apenas o setor de couros, são de mais de R\$ 500 milhões por ano decorrentes das lesões na pele causadas pelo carrapato.

Os métodos usados para o tratamento e controle das infestações por *B. microplus* podem ser divididos em químicos e ou biológicos. A aplicação de produtos químicos, método mais empregado, acarreta principalmente o desenvolvimento da resistência do parasita e a presença de resíduos nos produtos de origem animal destinados ao consumo humano. Uma alternativa para a utilização de produtos químicos é o controle biológico, especialmente com a utilização de vacinas. As vantagens das vacinas em relação aos químicos são várias: livres de resíduos, específicas, apresentam menor possibilidade de desenvolver resistência e podem ser mais baratas que muitos químicos novos (WILLADSEN, 1997).

Os antígenos alvos para as vacinas contra carrapatos são descritos como expostos ou ocultos. Antígenos expostos são proteínas do carrapato injetadas no hospedeiro durante a alimentação, e que interagem com o sistema de defesa. Os antígenos ocultos não entram em contato com o sistema de defesa do hospedeiro (MULENGA et al., 2000). Ainda segundo Mulenga et al. (2000), antígenos expostos que podem ser utilizados em vacinas devem ser

identificados e isolados segundo sua capacidade em: induzir reações de hipersensibilidade cutânea em hospedeiros resistentes ao carrapato; reagir com soro imune anti-carrapato em imunoblots; modular a resposta imune do hospedeiro e inibir a cascata de coagulação de sangue do hospedeiro. Os maiores avanços na produção de vacinas contra carrapatos foram atingidos com a utilização dos chamados antígenos ocultos (WILLADSEN e KEMP, 1988). Os principais antígenos ocultos identificados foram Bm86, Bm91 e BMA7 (WILLADSEN et al., 1989; RIDING et al., 1994; McKENNA et al., 1998). Três vacinas comerciais são constituídas pela Bm86: TickGard, TickGard Plus e Gavac (WILLADSEN et al., 1995; WILLADSEN, 1997; RODRÍGUEZ et al., 1994). Enzimas proteolíticas do carrapato também são estudadas como possíveis antígenos vacinais: BYC (Boophilus yolk pro-cathepsin) (SILVA VAZ et al., 1998) e BMTI (inibidores de serino proteases) (ANDREOTTI et al., 2002). Peptídeos sintéticos foram isolados e caracterizados a partir da Bm86 com indução de resposta imune (PATARROYO et al., 2002).

A técnica de *phage display*, desenvolvida por Smith (1985), é uma forma de seleção em que uma biblioteca de peptídeos ou proteínas com as seqüências randomizadas são expressas no exterior da partícula viral, enquanto o material genético codificante para cada resíduo encontra-se no genoma viral (PARMLEY e SMITH, 1988). Sendo assim, é possível a correlação entre cada seqüência da proteína variante e sua respectiva seqüência de DNA, com o qual permite rápida caracterização baseada na afinidade de ligação para uma molécula alvo. Na superfície viral foram expressos anticorpos (BARBAS III et al., 1992; RADER et al., 1997), peptídeos (NOREN e NOREN, 2001), enzimas (SOUMILLION et al., 1994), receptores de superfície celular (ROBERTSON, 1993), entre outras estruturas. Por um processo *in vitro* denominado *biopanning* (PARMLEY e SMITH, 1988) o peptídeo ou proteína expresso na superfície do fago é selecionado através da afinidade de ligação com a molécula alvo.

Os antígenos expressos em fagos têm importantes vantagens comparados com vacinas de peptídeos sintéticos (HUERTA et al., 2001; SCIUTTO et al., 2000). Eles podem ser produzidos em larga escala à um custo

baixo, pois são secretados por bactérias. A densidade da superfície do fago é de 200-400 m²/g e a fusão com peptídeos compreende mais de 25% do seu peso e estende-se por 50% da sua área de superfície (PETRENKO e SMITH, 2000). Os fagos também são resistentes à temperatura e a muitos solventes orgânicos e químicos, assim como outros tipos de estresses (PETRENKO e SMITH, 2000), e o mais importante é que proteínas do próprio fago são altamente imunogênicas, e na maioria das vezes, não requerem adjuvante para sua aplicação com imunógenos.

O *phage display* tem sido recentemente utilizado por pesquisadores para o desenvolvimento de vacinas contra muitas doenças: HIV-1 (SCALA et al., 1999; DE BERARDINIS et al., 2000), hepatite viral do tipo C (PUNTORIERO et al., 1998), doença de Alzheimer (FRENKEL e SOLOMON, 2002).

O presente trabalho consiste na aplicação da técnica de *phage display* para a identificação e seleção de peptídeos específicos (mimetopos) de larvas do carrapato *B. microplus*, e imunização de camundongos e bovinos com os clones selecionados por frequência e antigenicidade (bioinformática). A primeira etapa do estudo compreendeu a seleção de mimetopos, através da técnica de *phage display*, utilizando anticorpos policlonais de galinha, potencialmente antigênicos, candidatos a uma vacina poliimunogênica. As galinhas possuem apenas uma isoforma de tamanho natural de IgY. A diversidade na maneira de gerar anticorpos das galinhas em relação aos mamíferos é por mutação somática envolvendo conversão gênica. As galinhas têm um grande número de pseudogenes que servem como seqüência doadora para a diversidade inicial da cadeia leve de genes por conversão gênica. O processo de conversão gênica também afeta os genes da cadeia pesada. Durante a recombinação gênica dos segmentos, a junção das bases ocorre randomicamente. A diversidade ocorre por mutação somática (TIZARD, 2000). Segundo Lemamy (1999), as aves produzem anticorpos específicos em grande quantidade, além de possuírem boa memória imunológica quando imunizadas com proteínas de bactéria e mamíferos. Os clones dos peptídeos selecionados foram amplificados e titulados para a inoculação em camundongos e bovinos e caracterização da resposta imunológica. Posteriormente, os bovinos (espécie

alvo) inoculados foram desafiados com larvas do *B. microplus* para a avaliação da resposta imune protetora.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção do extrato de carrapato

Proteínas totais de larvas de *B. microplus* foram extraídas por maceração em nitrogênio líquido e posteriormente foi adicionado éter etílico, durante 18 horas, com a finalidade de desengordurar as proteínas. Tampão de extração foi acrescentado ao macerado (40mM HEPES pH 7.4, 10mM EDTA, 2mM EGTA, 1mM DTT, 1mM Benzamida, 0,5mM PMSF) e centrifugado por 40 minutos a 4000g. O sobrenadante foi colhido e dialisado extensivamente em salina, quantificado e verificado o perfil protéico por SDS-PAGE.

Análises de SDS-PAGE

Para averiguar a qualidade das amostras foi utilizado SDS-PAGE (10%). O tampão da amostra era composto por 1% SDS, 1% Tris pH 6,8, bromophenol blue a 0,02% e 20% glycerol, contendo ou não agentes redutores. A corrida de eletroforese foi realizada em temperatura ambiente com tampão superior 0,1M tris, 0,1M Tricina e SDS 1% e com tampão inferior 0,2 M tris-HCL, pH 8,9, até a saída dos indicadores, com voltagem de 100V. Após a corrida, o gel de poliácridamida foi colocado em uma solução de Coomassie-blue R-250 como corante de proteínas.

Imunização das galinhas

Utilizou-se para imunização, galinhas poedeiras comerciais brancas, de três meses de idade. O esquema de imunização foi o descrito por Barbas et al. (2001), com algumas modificações, sendo a primeira dose de 200 µg e as três doses subseqüentes de 100 µg de proteínas totais de larvas de *B. microplus*, por via intramuscular, em intervalos de 14 dias para cada dose. A primeira dose foi administrada junto com adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co, USA), e as doses subseqüentes com adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Os animais imunizados foram sangrados a partir da terceira dose e avaliados quanto à produção de anticorpos pelo teste de ELISA.

Ensaio Imuno Enzimático (ELISA)

Para o teste de ELISA foram utilizadas placas de microtitulação de alta afinidade (Nunc) sensibilizadas com 10 µg de proteínas totais de carrapato, diluída em tampão carbonato/ bicarbonato, durante toda a noite a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com PBST 5%, para adição das amostras de soro das galinhas, antes e após as imunizações, e incubadas por 1 hora à 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas e foi adicionado anticorpos secundários (IgG de coelho anti IgY de galinhas) diluído em bloto 5%, permanecendo por 1 hora. O conjugado imunoenzimático (IgG de cabra anti-IgG de coelho ligado à peroxidase) foi diluído em bloto 5% e incubado a 37°C por 60 minutos. A ligação específica foi revelada pela adição de substrato enzimático contendo o-fenilenodiamino (OPD). Após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico e efetuada a leitura a 492 nm em leitor de microplaca (Flow Titertek Multiskan Plus - USA). Após a observação de título satisfatório, o sangue foi coletado para obtenção de soro policlonal.

Purificação dos anticorpos por afinidade

Foi realizado um método alternativo para a purificação dos anticorpos por afinidade, sendo os anticorpos submetidos primeiramente à precipitação salina por sulfato de amônio. As IgYs foram parcialmente purificadas pela precipitação com solução saturada de sulfato de amônio (100%), e posteriormente a 40% e dialisadas extensivamente em salina tamponada. Em seguida, o extrato protéico de carrapato foi adsorvido em uma membrana de nitrocelulose durante toda a noite à 4°C, e posteriormente, bloqueada por leite em pó molico 5% durante 1 hora à temperatura ambiente. A membrana contendo as proteínas foi incubada com a fração purificada de IgY durante toda noite à 4°C e lavadas com PBST uma vez, e mais três vezes com PBS, monitoradas por leitura no espectrofotômetro no final da lavagem, para averiguação do despreendimento de proteínas da membrana. Os anticorpos foram eluídos por 100mM de glicina pH 2.5 sendo neutralizados por 100mM de tris pH 8.0 e quantificados por espectrofotometria.

Seleção da biblioteca de peptídeos fusionados através do *phage display*

A biblioteca utilizada era composta por doze peptídeos randômicos (“Ph.D -12 mer- New England Biolabs”) seguidos por uma curta seqüência espaçadora Gly-Gly-Gly fusionada à região N - terminal da proteína capsídica menor (Proteína III) de bacteriófagos M13 filamentosos. Existiam na biblioteca $2,8 \times 10^{11}$ clones independentes, os quais representavam as $1,9 \times 10^9$ possíveis combinações contidas nos 12 resíduos de aminoácidos. Todas as cinco cópias da Proteína III dos fagos, continham peptídeos randômicos aminoterminais (NOREN e NOREN, 2001). A biblioteca de fagos foi incubada com a fração eluída de imunoglobulinas IgY anti-proteínas totais do carrapato bovino purificada.

Foi adsorvido no orifício de uma placa de microtitulação de 96 poços (Maxisorp - Nunc) 150 μ L de IgY purificada por afinidade ao imunógeno (100 μ g/mL em 0.1 M NaHCO₃, pH 8.6) e incubada overnight a 4°C em um recipiente contendo papel toalha umidificado. A placa foi bloqueada com 250 μ L de um tampão de bloqueio (0.1 M NaHCO₃, pH 8.6, 5 mg/mL BSA) por 2 h à temperatura de 4°C. A placa foi lavada seis vezes com TBST (TBS contendo 0.1% Tween-20), foi acrescentado nos orifícios da placa 4×10^{10} fagos diluídos em 100 μ L TBST e mantido sob agitação por 1h a temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos pela lavagem dos orifícios da placa por dez vezes com TBST (0.1% Tween-20) na primeira passagem e nas subseqüentes com TBST (0.5% Tween-20). Os fagos ligantes foram eluídos com 100 μ L do tampão de eluição (0.2 M glicina-HCl, pH 2.2, contendo 1 mg/mL BSA) por 10 min à temperatura ambiente e imediatamente neutralizados com 15 μ L do tampão de neutralização (1 M Tris-HCl, pH 8.0). Alíquotas dos fagos eluídos foram utilizadas para a determinação do título. O eluído remanescente, contendo fagos, foi utilizado para a reamplificação para a próxima passagem, pela infecção em *E. coli* ER2537. Foram realizadas três passagens para o enriquecimento dos fagos contendo os peptídeos ligantes.

Caracterização dos clones selecionados e identificação dos clones reativos

O vetor de fago utilizado contém o gene *lacZ α* , o qual utiliza o sistema de α -complementação, permitindo que clones reativos sejam selecionados pela coloração das colônias (azuis positivas ou brancas negativas). Para as titulações, foi feita uma mistura de fago e bactérias em agarose na superfície, sendo plaqueada em meio LB contendo X-gal (40 μ g/ml) e IPTG (0.5 mM).

Seqüenciamento de DNA

Para a obtenção de DNA de bacteriófagos filamentosos de fita simples, colônias obtidas após a terceira passagem de seleção por imunoafinidade foram repicadas separadamente em microtubos e crescidas em meio LB líquido por 6 horas. Os fagos foram isolados pela precipitação com 20% PEG/NaCl, seguido da adição de iodeto de sódio para liberação do ácido nucléico e posterior precipitação com etanol. A qualidade e quantidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose (dados não mostrados). O seqüenciamento foi realizado utilizando o Kit (*Big Dye Terminator* - Pharmacia) utilizando um seqüenciador automático (*MegaBace* - Amershan Biosciences) do Laboratório de Genética Molecular (UFU). Para a reação do seqüenciamento, foi utilizado o *primer* – 96 M13 – (5'-HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG –3' - Pharmacia), o qual flanqueia a região dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionado nos fagos M13 recombinantes pela hibridização na região -96 pb “downstream”.

Análise de dados pela Bioinformática

A seqüência de aminoácidos foi traduzida pelo programa DNA2PRO12. Parâmetros de antigenicidade dos peptídeos foram determinados individualmente pelo programa *Protean* (DNASTAR - Lasergene), seguindo o índice de James Wolf. A procura por homologias entre seqüências consenso foi realizada pelo programa FASTAcom.

Dot Blotting com anticorpo policlonal das galinhas

Em uma membrana de nitrocelulose foi colocado 10 μ L de cada clone selecionado (28 clones) por *spot*. A membrana foi incubada, lavada três vezes

por 5 minutos com TBST. Após as lavagens, a membrana foi bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente com 10 mL de bloto na diluição de 1/100. Sobre a membrana foi colocado 100 μ L de soro policlonal das galinhas contra proteínas totais de carrapato (anticorpo primário) diluídos em 10 mL do molico. A membrana foi incubada *overnight* à temperatura de 37°C. Após este período, a membrana foi lavada novamente durante 3 vezes. Foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de galinha conjugado com fosfatase alcalina. A reação foi revelada com o substrato NBT/BCIP.

Amplificação e titulação dos clones selecionados

Para a amplificação de cada clone foi utilizada a proporção de 1 μ L de tetraciclina para cada 1 mL do meio LB líquido em erlenmeyers, totalizando 20 mL. A este meio foi inoculada uma colônia de bactéria isolada, cepa ER2738 de *E. coli* resistente à tetraciclina, que se multiplicou *overnight* a 37°C em 250 g. As bactérias foram então novamente diluídas na proporção de 1/100, ou seja, 200 μ L de bactérias em 20 mL do meio LB e tetraciclina. A infecção das bactérias pelos fagos foi feita com a inoculação de 50 μ L do fago na bactéria diluída 1/100 e mantidas a 37°C, por 5 horas. A cultura foi transferida para tubos de centrifuga e submetida à 10.000 g por 10 minutos, à 4°C, por 2 vezes, para eliminar os peletes de bactérias. Aproximadamente 80% do sobrenadante foi transferido para outro tubo acrescentando-se um volume de 3 mL de PEG (polietilenoglicol 8000 + NaCl), na proporção de 1/6, e incubado "overnight" a 4°C, com a finalidade de precipitar os fagos. Após a incubação, a preparação foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pelete com os fagos foi novamente centrifugado por 1 minuto. O pelete com os fagos foi diluído em 1 mL de tampão TBS, colocado em microtubos de 2 mL e centrifugado à 14.000 g por 10 minutos, à 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, onde foi acrescentado 1/6 de PEG e incubado por 60 minutos. Depois foi centrifugado a 14.000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e a preparação foi novamente centrifugada por 2 minutos. O sobrenadante residual foi retirado e o pelete diluído 200 μ L de TBS com 0,02% de azida sódica, para evitar crescimento de fungos.

Realizou-se a titulação dos fagos (quantificação) retirando-se uma colônia (isolada) de ER2738 previamente crescida em meio sólido LB com tetraciclina; esta colônia foi incubada em meio LB líquido sob agitação até atingir a fase de crescimento mid-log ($OD_{600} = 0,5$).

A solução de fagos a ser titulada foi submetida a diluições seriais de 10 vezes em meio LB sólido. Para amplificação foram utilizadas as diluições de 10^7 a 10^{12} . Então, em cada diluição foi acrescentado 200 μ L da cultura de ER2738 na fase mid-log. Esta mistura foi vortexada brevemente e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. As células, assim infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de Agarose Top a 45°C, (vertidos rapidamente) e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e tetraciclina. Para cada diluição foi confeccionada uma placa.

As placas foram vedadas com parafilme, invertidas e incubadas à temperatura de 37°C, durante 16 horas. Após este período, colônias azuis foram contadas e as placas possuidoras de, aproximadamente 100 colônias, foram identificadas como as portadoras das diluições que representaram os títulos.

Imunização de camundongos

Para a imunização com os clones selecionados foram utilizados camundongos fêmeas de seis semanas de idade e peso médio de 28 gramas. Doze grupos, de três animais cada, foram imunizados com nove clones diferentes, fago *helper* M13, e o *pool* dos fagos na dose de $2,5 \times 10^{12}$, em um volume de 100 μ L, com adjuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical Co, USA), pela via intraperitoneal. Os animais foram imunizados nos dias 0 e 12. Coletas de sangue, pela veia orbital, foram realizadas nos dias 0, 12 e 19 pós-imunização.

Imunização de bovinos (ensaios preliminares)

Dois grupos de dois bovinos machos com idade aproximada de 18 meses cada, foram utilizados para os ensaios preliminares de imunização. Os bovinos foram imunizados, por via intramuscular, com um pool dos clones mais reativos

na dose de $2,5 \times 10^{12}$ (grupo 1) e o fago *helper* M13 na mesma dose (grupo2), em um volume de 1mL, com adjuvantes incompletos de Freund (Sigma Chemical Co, USA). Os animais foram imunizados nos dias 0 e 12. Foram realizadas coletas de sangue nos dias 0, 12 e 19 pós-imunização.

Detecção de anticorpos

Os níveis de anticorpos específicos no soro foram mensurados em camundongos e bovinos. Placas de microtitulação de fundo chato (96 well: Nunc, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com os clones diluídos em PBS, pH 7,2, na dose de 5×10^{10} ufc/mL, *overnight* à temperatura ambiente. Depois da lavagem, os soros dos animais foram adicionados, diluídos em PBS 1:100 e incubados durante 1 hora à 37°C. Após este período, as placas foram lavadas e incubadas com conjugado anti-camundongo, no caso dos camundongos, e anti-cobaias feito em coelhos, no caso dos bovinos, diluídos em PBS 1:2000, durante 1 hora à 37°C. O substrato utilizado para revelação foi o OPD, após paralisação da reação com ácido sulfúrico. A leitura de absorbância foi determinada a 492 nm em leitor de microplaca (Flow Titertek Multiskan Plus - USA).

Placas de ELISA também foram sensibilizadas com antígenos correspondentes a proteínas totais de larvas de carrapato na dose de 10 µg por poço e diluídas em PBS. O mesmo procedimento descrito acima foi empregado para a realização do ensaio com o soro de camundongos.

O índice ELISA (IE) para os soros dos camundongos foi calculado realizando a divisão da densidade óptica (DO) pelo valor de *cut off*. O *cut off* foi calculado somando-se 2 desvios padrão à média dos soros pré-ímmes. Os IEs maiores que 1 foram considerados positivos e os IEs menores que 1 foram considerados negativos.

Desafio dos bovinos imunizados

Um mês antes das imunizações, os animais passaram por uma série de quatro banhos a cada sete dias, com carrapaticidas comerciais, na tentativa de eliminar todos os carrapatos presentes, decorrentes de infestações de campo anteriores.

Doze dias após a primeira inoculação, os animais foram infestados com larvas do carrapato *B. microplus* (cepa de campo) totalizando duas infestações de 5.000 larvas cada, com intervalo de um dia.

RESULTADOS

Produção de anticorpos policlonais em galinhas contra antígenos totais de larvas do carrapato (*Boophilus microplus*)

Foram extraídas proteínas totais de larvas de *B. microplus* como imunógenos para a produção de anticorpos policlonais de galinhas (IgY). As proteínas totais extraídas e observadas em gel de acrilamida em SDS-PAGE mantiveram-se preservadas (Figura 1), o que permitiu a imunização das galinhas.

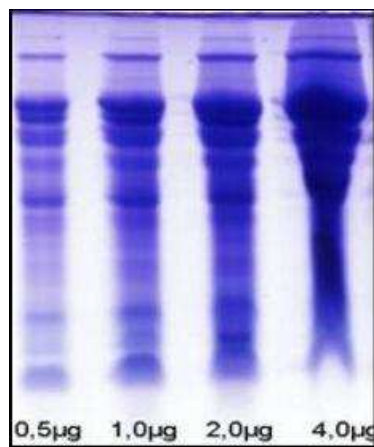


Figura 1 : SDS-PAGE proteínas totais extraídas de larvas do carrapato *B. microplus* observadas em gel de acrilamida.

As galinhas imunizadas com proteínas totais de larvas de carrapato produziram anticorpos detectados pelo teste de ELISA (Figura 2). Como o carrapato não é um ectoparasita natural das galinhas, a reação imunológica foi intensa.

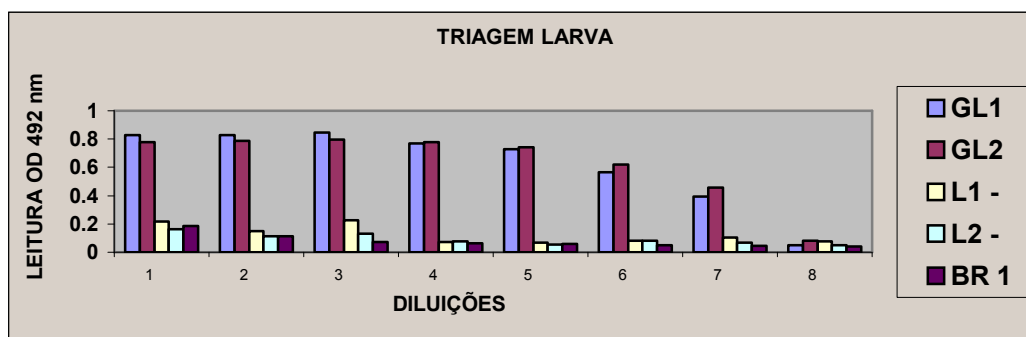


Figura 2 Resultados do teste de ELISA expressados como títulos (Título = Diluição do soro baseado no valor do “cut off”). Os títulos foram acima de 1:145800. Galinhas (GL1 e GL2), soros pré imunes (L1 e L2) e o controle (BR1).

A pureza dos anticorpos foi verificada em SDS-PAGE em condições não redutoras (Figura 3). Uma banda forte de ,aproximadamente, 180 kDa foi observada, correspondente ao peso molecular da IgY, a qual foi usada nos *biopannings*.

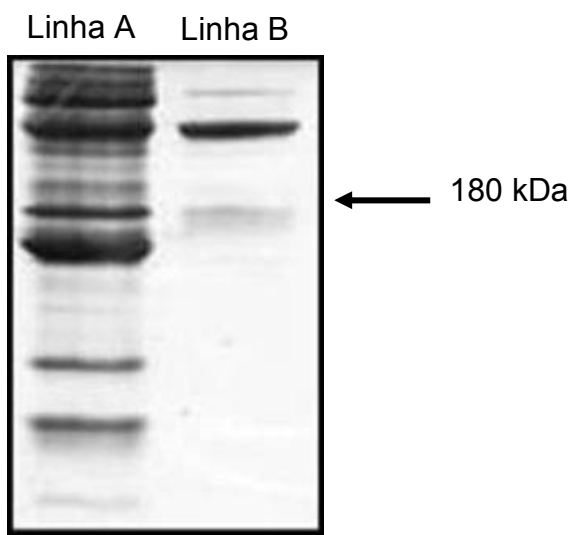


Figura 3. SDS-PAGE (Gel 16%) Preparações de IgY obtidas por precipitação com sulfato de amônio. Linha A - amostra de soro total de galinhas, linha B – fração de IgY.

Seleção e caracterização de peptídeos sintéticos

Os anticorpos policlonais das galinhas contra proteínas de larvas totais de carrapatos foram submetidos a seleção por *Phade display*, através de uma biblioteca de peptídeos expressos em fagos M13, para a caracterização dos possíveis alvos ligantes. Pelo processo chamado "*Biopanning*" foi possível aumentar a especificidade dos peptídeos selecionados contra o alvo, no caso, proteínas totais de larvas de carrapato (Tabela 1). Os clones dos fagos que infectaram a bactéria foram selecionados através da coloração da colônia, sendo as positivas azuis e as negativas brancas (Figura 4)



Figura 4. Colônias de *E. coli* F' infectadas com fagos M13 carregando o gene *lacZ* da β -galactosidase (colônias azuis)

Tabela 1 Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a anticorpos policlonais para as proteínas de larvas de *B. microplus*. Título obtido (ufc) no processo de seleção dos fagos por imunoafinidade (título por 10 μ L).

1º Ciclo de Seleção	Entrada	4×10^{10}	2×10^5
	Saída	2×10^5	
2º Ciclo de Seleção	Entrada	5×10^9	5×10^7
	Saída	1×10^2	
3º Ciclo de Seleção	Entrada	2×10^{10}	4×10^6
	Saída	5×10^5	

Realizou-se *western blotting* para verificar a imunoreatividade dos fagos selecionados. A figura 5 representa a posição da proteína PIII, que contém o peptídeo fusionado, e a revelação com a adição de substrato NBT/BCIP, nas três passagens, revelando o aumento da especificidade no processo de seleção.

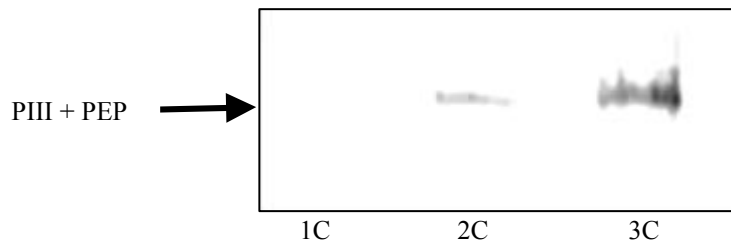


Figura 5. *Western Blotting* para o conjunto de fagos após a terceira seleção do experimento. A seta indica a posição da proteína III contendo o peptídeo fusionado em três ciclos de seleção (1C, 2C e 3C). São representadas bandas com intensidades crescentes de sinal indicando o aumento do reconhecimento dos peptídeos selecionados pelos anticorpos anti-proteínas de carrapato.

Seqüenciamento de DNA

Colônias infectadas isoladas e de tamanho uniforme foram utilizadas para o seqüenciamento do DNA. Para os fagos com leituras legíveis, o DNA de fita simples proveu 36 pb dos nucleotídeos correspondentes aos 12 AA de cada peptídeo fusionados ao gene da PIII (gIII). A tradução dos nucleotídeos em aminoácidos obedeceu aos critérios do programa DNA12PRO (RELIC softwares), específico para a biblioteca utilizada.

Foram obtidas 74 seqüências, sendo apenas 29 distintas (Tabela 2). Peptídeos independentes foram isolados mais de uma vez, sendo 45 as seqüências repetidas. A seqüência DAWKMRLSQMYD apareceu 22 vezes, outras 9 seqüências foram VNYNGKEHLLIP, 7 seqüências para IDPLMFKYWSNM e duas seqüências AGLPNHNAMLLT, NAWLQEPNHRNL, TLFTPDKSPAKT, SNNADYKQSLLL, GALHQEPSSNLF, GLFTPDKSPAKT as quais foram mais freqüentes. A tabela 3, mostra a seqüência completa de 9 peptídeos selecionados na terceira seleção bem como demonstra a imunorreatividade de todos os peptídeos no *dot blotting* (Figura 6).

Os 29 clones foram utilizados para a sensibilização da membrana de nitrocelulose para seleção dos que mais estimularam a produção de anticorpos pelas galinhas. Os clones mais reativos e sua localização na membrana foram A2(2E6), A7(E4), C3(2D7), C12(2F4), E1(2D2). O controle representado pelo fago sem inserto *helper* está localizado no dot C6 (Figura 6)

Tabela 2 Seqüência de aminoácidos dos principais peptídeos expressos nos fagos selecionados pelos anticorpos policlonais de galinhas imunizadas com proteínas totais de larvas de *B. microplus*. Alinhamento realizado pelo PILEUP 2.0

seq	-- APYDTPWPS PSL-	1/74
seq	-- GPYDTPMFS LNM-	1/74
seq	---TLF TPDKS PAKT	1/74
seq	HAWQSK TPDK TR---	1/74
seq	-SIPT YTPDKV TY--	1/74
seq	- GALIYTP EKYTI--	1/74
seq	- GALHQEP SSNPF--	1/74
seq	- NAWLQEP NHRNL--	1/74
seq	--AGL PNHN AMLLT-	1/74
seq	--SSLTFIDFHHR--	1/74
seq	-SQKYFN DL LDHQ--	1/74
seq	--DAW KMRLS QMYD-	22/74
seq	-CLHCKYT LQ QA--	1/74
seq	-- SPLNFYK TQLR--	3/74
seq	- MNYWYK FMLPDI--	1/74**
seq	- MNSWYK FMLPDI--	7/74**
seq	-- SNNADYK QSLLL-	2/74
seq	-IDSNHV YK DFLT--	1/74
seq	- VNWN SGHKTNLS--	3/74
seq	- VN YNG KEHL LIP--	9/74
seq	-SVPLA KRHL ISL--	1/74
seq	- SWSSA ERLYTMN--	1/74
seq	- SYGSS VTQHLAT--	1/74
seq	- SHDG ASSKIRPA--	1/74
seq	--HVRNPP TM PEAW-	1/74
seq	--IPYTHAHADHTL-	1/74
seq	--HTQHSP MVS VEF-	1/74
seq	--KPVV GMPI VEVW-	1/74
seq	IDPLMFKYWYNM	1/74

*Letras em negrito denotam resíduos conservados.

**seqüência inversa ao peptídeo IDPLMFKYWSNM e IDPLMFKYWSNM

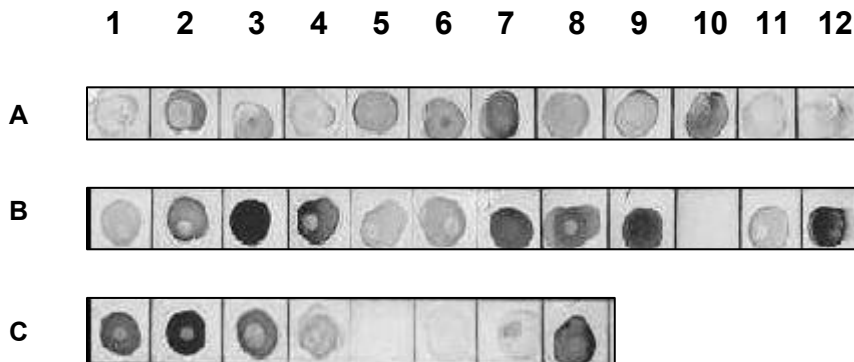


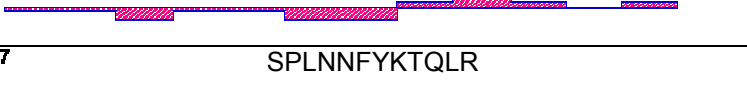
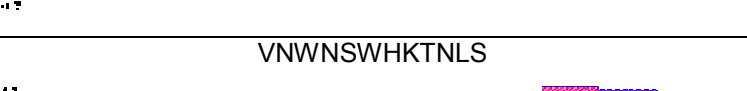

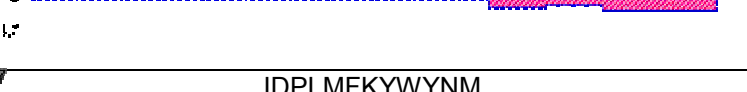
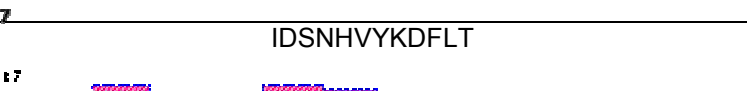
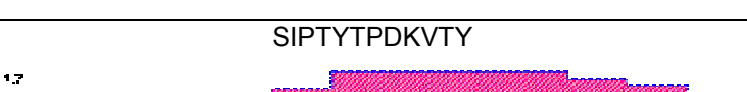
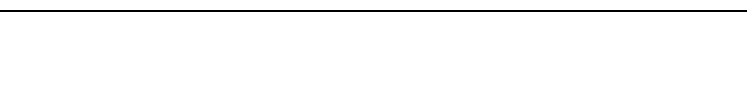


Figura 6. Dot Blotting com os 29 clones que apresentaram seqüências distintas para seleção dos que mais estimularam a produção de anticorpos pelas galinhas. Os clones mais reativos e sua localização na membrana foram: A2(2E6), A6(2E4), A7(E4), B3(2D7), B7(2D8), B9(2E11), B12(2F4), C1(2D2), C2(2F3). O controle representado pelo fago sem inserto *helper* esta localizado no dot C6.

Análise das seqüências

Os nove peptídeos utilizados nas imunizações foram selecionados por freqüência, imunorreatividade pelo *dot blotting* e também pelo índice antigênico. Na Tabela 3, o eixo vertical representa o índice antigênico, que varia de 1,7 até -1,7, e o eixo horizontal representa a variação entre cada aminoácido que compõe o peptídeo.

Tabela 3 Seqüência de aminoácidos dos principais peptídeos expressos nos fagos selecionados pelos anticorpos policlonais de galinhas imunizadas com proteínas totais de larvas de *B. microplus* e seus índices de antigenicidade.

Clone	Dot	Seqüência e Índice de Antigenicidade	Freq.
2E4	A6	DAWKMRLSQMYD 	22/74
2D8	B7	VNYNGKEHLLIP 	9/74
2F4	B12	IDPLMFKYWSNM 	7/74
2D2	C1	SPLNNFYKTQLR 	3/74
2E6	A2	VNWNSWHKTNLS 	3/74
2D7	B3	SNNADYKQSLLL 	2/74
2E11	B9	IDPLMFKYWYNM 	1/74
E4	A7	IDSNHVYKDFLT 	1/74
2F3	C2	SIPTYTPDKVTY 	1/74

Amplificação e titulação dos clones de peptídeos sintéticos de larvas de carrapato selecionados por freqüência e antigenicidade (bioinformática).

Os clones selecionados por freqüência e antigenicidade foram amplificados e titulados para posterior imunização de camundongos e bovinos (Figura 7). A dose utilizada para a imunização foi de $2,5 \times 10^{12}$. A solução de fagos a ser titulada foi submetida a diluições seriais de 10 vezes. Para amplificação foram utilizadas as diluições de 10^7 a 10^{11} .

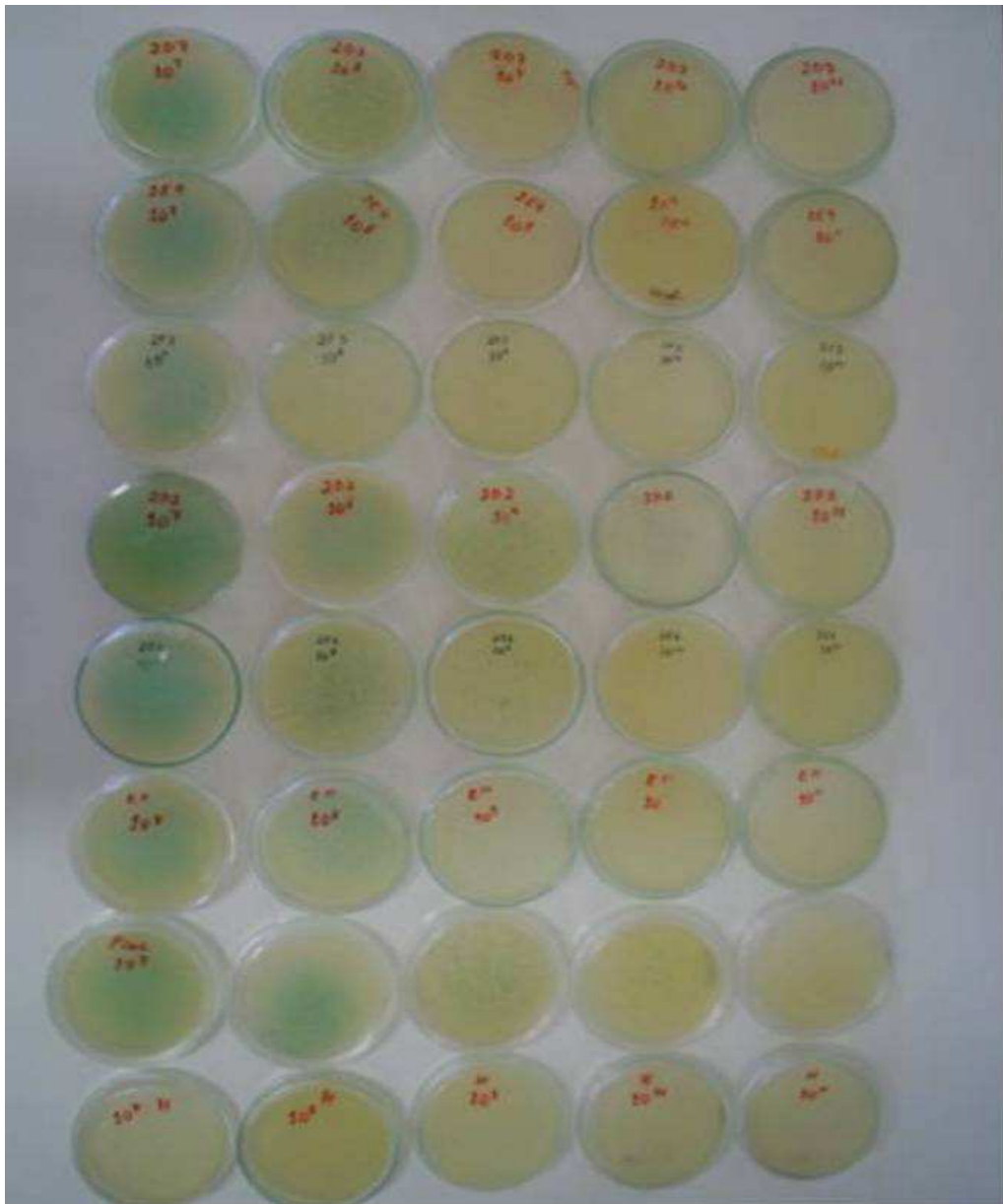


Figura 7. A solução de fagos a ser titulada foi submetida a diluições seriais de 10 vezes. Para a amplificação foram utilizadas as diluições de 10^7 a 10^{10} .

Imunização de camundongos e bovinos

Aos 12 dias, após a primeira imunização, alguns camundongos não responderam à imunização: 1 animal do clone 2D8 (VNYNGKEHLLIP), 1 animal do clone 2E11 (IDPLMFKYWYNM), 1 animal do clone E4 (IDSNHVYKDFLT), 1 animal do helper e 1 animal do PBS (Tabela 4).

Os animais imunizados com o clone 2D7 (SNNADYKQSLLL) foram os que responderam com um maior IE, sendo diferente estatisticamente dos demais peptídeos, do *helper* e do PBS. A resposta dos camundongos imunizados com o clone 2E4 (DAWKMRLSQMYD) foi diferente estatisticamente do 2D7, do *helper* e do PBS, apresentando o segundo maior IE.

Aos 19 dias após a primeira imunização, e sete após a segunda, 1 animal do clone 2D2 (SPLNNFYKTQLR) e 1 animal do PBS não responderam. Os clones mais reativos foram o 2E6 (VNWNSWHKTNLS), que foi estatisticamente diferente de todos os outros, exceto do 2F3 (SIPTYTPDKVTY), o 2F3 (SIPTYTPDKVTY), que foi estatisticamente diferente de todos os outros exceto do 2E6, 2E4 (DAWKMRLSQMYD) e do *pool*, o *pool* que foi estatisticamente diferente do 2E6, do *helper* e do PBS, o *helper* que foi diferente estatisticamente do 2E6, 2F3 e do *Pool* e o PBS foi estatisticamente diferente do 2E4, 2E6, 2F3 e do *pool*.

Entre os dias 12 e 19 após a imunização, houve diferença estatística para os peptídeos: 2D2 (SPLNNFYKTQLR), 2E6 (VNWNSWHKTNLS), 2D7 (SNNADYKQSLLL), 2F3 (SIPTYTPDKVTY) e o *pool*. Para os peptídeos 2E6, 2F3 e *pool* houve um aumento do IE e para os peptídeos 2D2 e 2D7 ocorreu uma diminuição do IE.

Os soros dos animais imunizados com o peptídeo 2E4 (DAWKMRLSQMYD), que foi estatisticamente diferente do 2F3, do *helper* e do PBS, foram os mais reativos contra proteínas totais de larvas de carrapato (Tabela 5).

Tabela 4 Níveis de anticorpos no soro de camundongos contra os peptídeos complexados ao fago, fago *helper*, *pool* de fagos complexados e PBS, calculados pelo teste de ELISA, nos dias 12 e 19 após a primeira imunização.

Grupo	12 Dias		19 Dias	
2E4	3,70 ± 0,557	Ab	3,10 ± 0,173	Abcd
2D8	2,03 ± 1,069	Abc	2,43 ± 1,124	Acde
2F4	2,60 ± 1,375	Abc	2,60 ± 1,179	Acde
2D2	1,97 ± 0,851	Abc	1,50 ± 0,872	Bcde
2E6	1,50 ± 0,265	Bbc	4,87 ± 0,723	Aa
2D7	5,63 ± 0,764	Aa	2,83 ± 0,473	Bcde
2E11	1,70 ± 1,136	Abc	1,87 ± 0,208	Acde
E4	1,47 ± 0,513	Abc	1,80 ± 0,600	Acde
2F3	2,40 ± 1,179	Bbc	4,37 ± 0,710	Aab
Helper	1,07 ± 0,153	Ac	1,43 ± 0,252	Ade
Pool	1,63 ± 0,503	Bbc	3,27 ± 0,116	Abc
PBS	1,07 ± 0,351	Ac	1,13 ± 0,208	Ae

Os dados são médias ± desvio padrão.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, representam diferença estatística entre os dias de coleta.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre os grupos experimentais.

Para a comparação entre os dias de coleta foi utilizado o teste t-Student com o nível de significância de 5%.

Para a comparação entre os grupos experimentais foi utilizado a análise de variância, e quando houve diferença significativa, o teste de comparação múltipla Student Newman-Keuls com o nível de significância de 5% (P < 0,05)

Tabela 5 Níveis de anticorpos no soro de camundongos contra os peptídeos complexados ao fago, fago *helper*, *pool* de fagos complexados, PBS, e proteínas totais de larvas de carrapato, calculados pelo teste de ELISA, 19 dias após a primeira imunização.

Grupo	19 Dias		Ag Total 19 Dias	
2E4	3,10 ± 0,173	Abcd	3,00 ± 1,609	Aa
2D8	2,43 ± 1,124	Acde	2,20 ± 0,700	Aabc
2F4	2,60 ± 1,179	Acde	2,60 ± 0,436	Aab
2D2	1,50 ± 0,872	Acde	1,57 ± 0,493	Aabc
2E6	4,87 ± 0,723	Aa	2,13 ± 0,322	Babc
2D7	2,83 ± 0,473	Acde	1,37 ± 0,252	Aabc
2E11	1,87 ± 0,208	Acde	1,87 ± 0,306	Aabc
E4	1,80 ± 0,600	Acde	2,40 ± 0,436	Aabc
2F3	4,37 ± 0,710	Aab	0,83 ± 0,153	Bc
Helper	1,43 ± 0,252	Ade	1,17 ± 0,153	Abc
Pool	3,27 ± 0,116	Abc	1,57 ± 0,404	Babc
PBS	1,13 ± 0,208	Ae	1,00 ± 0,200	Abc

Os dados são médias ± desvio padrão.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, representam diferença estatística entre os dias de coleta.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre os grupos experimentais.

Para a comparação entre o dia de coleta 19 dos peptídeos com o antígeno total, foi utilizado o teste t-Student com o nível de significância de 5%.

Para a comparação entre os grupos experimentais foi utilizado a análise de variância, e quando houve diferença significativa, o teste de comparação múltipla Student Newman-Keuls com o nível de significância de 5% (P < 0,05)

Doze dias após a primeira imunização os soros dos 2 bovinos imunizados com o *pool* não foram reativos aos peptídeos 2D8, 2F4, 2D2, 2E6 e 1 dos bovinos não respondeu ao E4, *pool*, *helper* e PBS. Os clones mais reativos foram o 2F3 (SIPTYTPDKVITY), que foi estatisticamente diferente do 2D8 (VNYNGKEHLLIP) e 2D2 (SPLNNFYKTQLR), o 2D7 (SNNADYKQSLLL) e o 2E4 (DAWKMRLSQMYD), que não diferiram estatisticamente dos outros clones, do *helper*, do *pool* e do PBS (Tabela 6).

Os clones mais reativos dos bovinos foram: 2E4 (DAWKMRLSQMYD), 2D7 (SNNADYKQSLLL) e o 2F3 (SIPTYTPDKVITY). Estes três peptídeos não diferiram estatisticamente entre si, mas foram diferentes em relação aos outros, com exceção do 2F3.

Entre os dias 12 e 19 após a imunização, houve diferença estatística apenas para o peptídeo 2D2 (SPLNNFYKTQLR), em que houve um aumento do IE.

Tabela 6 – Níveis de anticorpos, calculados pelo teste de Elisa, no soro de bovinos imunizados com o *pool* de peptídeos contra cada um dos peptídeos complexados ao fago, o *pool* de fagos complexados, o PBS e dos bovinos imunizados com o fago *helper* contra o mesmo, nos dias 12 e 19 após a primeira imunização.

Grupo	12 Dias		19 Dias	
2E4	1,60 ± 0,424	Aab	2,15 ± 0,071	Aa
2D8	0,65 ± 0,354	Ab	1,00 ± 0,141	Ae
2F4	0,80 ± 0,283	Aab	1,15 ± 0,071	Acde
2D2	0,70 ± 0,000	Bb	1,45 ± 0,071	Abcd
2E6	1,00 ± 0,000	Aab	1,50 ± 0,283	Abcd
2D7	1,70 ± 0,141	Aab	2,10 ± 0,141	Aa
2E11	1,50 ± 0,141	Aab	1,55 ± 0,071	Abc
E4	1,35 ± 0,495	Aab	1,30 ± 0,141	Acde
2F3	1,85 ± 0,212	Aa	1,85 ± 0,071	Aab
Helper	1,00 ± 0,424	Aab	1,30 ± 0,141	Acde
P	1,20 ± 0,283	Aab	1,50 ± 0,141	Abcd
PBS	1,05 ± 0,212	Aab	1,05 ± 0,071	Ade

Os dados são médias ± desvio padrão.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, representam diferença estatística entre os dias de coleta.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre os grupos experimentais.

Para a comparação entre os dias de coleta foi utilizado o teste t-Student com o nível de significância de 5%.

Para a comparação entre os grupos experimentais foi utilizado a análise de variância, e quando houve diferença significativa, o teste de comparação múltipla Student Newman-Keuls com o nível de significância de 5% ($P < 0,05$). O Índice Elisa foi calculado tal como para os camundongos.

Desafio dos bovinos imunizados

Os bovinos desafiados doze dias após a primeira inoculação, não apresentaram, 24 dias após a primeira infestação, carrapato entre 4,5 e 8,0 mm (WHARTON et al. 1970). Sabe-se que para um animal susceptível, a proporção de larvas que conseguem fixar-se nele e completar o ciclo é de 20% (WILLADSEN et al., 1977, citado por VERÍSSIMO, 1990).

Avaliações por bioinformática

A similaridade dos peptídeos selecionados, 2E4 (DAWKMRLSQMYD), 2D7 (SNNADYKQSLLL), 2E6 (VNWNSWHKTNLS) e 2F3 (SIPTYTPDKVTY) com as proteínas do carrapato *B. microplus* depositadas no GENE BANK (<http://www.ncbi.nlm.gov>) foi avaliada (Tabela 7) e demonstrou-se que, dentre as quatro proteínas alvo alinhadas, a calreticulina foi a que obteve maior número de alinhamentos, incluindo 3 dos 4 peptídeos acima citados.

Tabela 7 Proteínas do *Boophilus microplus* similares aos peptídeos selecionados alinhados pelo BLAST

Proteína ligante	Homologia GENE BANK	Antigenicidade da Proteína
Precursor de calreticulina gb AAN03709.1]	DAWKMRLSQMYD 1 DAWK 4 DAWK 30 DAWK 33 SNNADYKQSLLL 2 NNADYK 7 NN +YK 266 NNPEYK 271 SIPTYTPDKVTY 3 PTYTPD 8 P YTPD 296 PEYTPD 301	
Enzima semelhante a conversora de angiotensina gb AAB04998].1	SNNADYKQSLLL 1 SNNADYKQSL 10 SN DY Q++ 79 SNIT DYNQNM 88	
Esterase gb AAF00496.1]	VNWN SWHKTNLS 5 SWHKTN 10 SW KTN 189 SWIKTN 194	
Lipocalina gb AAS59160.1]	DAWKMRLSQMYD 1 DAWK 4 DAWK 40 DAWK 43	

DISCUSSÃO

No presente experimento, inicialmente o soro policlonal foi produzido em galinhas previamente sensibilizadas com proteínas totais de larvas de carrapato. Pelo processo de *biopanning*, em que a biblioteca de peptídeos expostos em fagos é colocada contra o alvo, foi possível isolar os peptídeos com similaridades estruturais às proteínas totais de larvas de carrapato, através de vários ciclos de seleção por imunoafinidade contra IgY específicas para as proteínas totais do parasita (PARMLEY e SMITH, 1988). Embora, não tenha sido verificado o enriquecimento da subpopulação de fagos similares às proteínas totais de larvas, ocorreu um aumento da afinidade dos peptídeos contra o alvo em questão.

Os peptídeos que apresentaram maior frequência de clones e com maior índice antigênico (bioinformática e *dot blotting* com soro de galinha), foram selecionados para a imunização de camundongos e bovinos. O ciclo de imunizações segundo Barbas et al. (2001) não ficou completo pois seria necessária mais uma imunização com 28 dias após a primeira (segundo *booster*) e mais uma coleta de sangue com 14 dias após a revacinação para posterior teste de ELISA.

Analisando-se os dados iniciais pode-se inferir que os peptídeos em fagos induziram resposta imune, avaliado pelo cálculo do índice ELISA, e os mais imunogênicos foram 2D7 (SNNADYKQSLLL), 2E6 (VNWNSWHKTNLS), 2F3 (SIPTYTPDKVTY) e o 2E4 (DAWKMRLSQMYD).

O teste de ELISA confirmou o índice de antigenicidade predita para os peptídeos 2D7 (SNNADYKQSLLL), 2E6 (VNWNSWHKTNLS) e 2F3 (SIPTYTPDKVTY). O peptídeo 2E4 (DAWKMRLSQMYD) não foi considerado antigênico pelo *Protean* (Lasergene softwares), mas sim pelo teste de Elisa. Isto reforça a importância da avaliação biológica para a determinação da antigenicidade.

Patarroyo et al. (2000) utilizaram a metodologia de predição de regiões antigênicas da proteína Bm86 e desenvolveram três peptídeos sintéticos, que

apresentaram antigenicidade e imunogenicidade similares à proteína original.

As seqüências selecionadas no presente trabalho apresentam os motivos proteicos NxxxKxxL (2D7, 2E6 e 2E4) e o motivo TPDKS (2E4). Estas seqüências alinharam-se com algumas proteínas do carrapato, principalmente, a calreticulina. A calreticulina (CRT) é uma proteína ligante de cálcio, altamente conservada (COPPOLINO e DEDHAR, 1998), encontrada em todas as células de eucariotos, exceto nos eritrócitos. Está localizada principalmente no retículo endoplasmático (RE) das células, onde atua como um controle de qualidade da proteína (KOVACS et al., 1998). Pode ser encontrada em outros compartimentos celulares e com outras funções biológicas, sendo liberada extracelularmente pelas células durante infecção, stress, e morte celular. Nas reações imunológicas a calreticulina pode se ligar ao C1q, um subcomponente do primeiro componente do complemento. Após ser excretada pela célula a calreticulina pode interferir com a ativação da cascata do sistema complemento no local da inflamação pela ligação com o C1q, interferindo na interação com o complexo imune associado ao anticorpo. Vários estudos mostraram que a calreticulina humana tem 50-60% de aminoácidos idênticos a proteínas encontradas nos parasitas de humanos, como o: *Onchocerca volulus* (filária), *Schistosoma mansoni* (tremadoda), *Plasmodium falciparum* (protozoário da malária). O mesmo motivo de ligação ao C1q presente nestas formas de CRT derivada destes parasitas pode ter a função de prevenir a ativação do sistema complemento pelos hospedeiros. Jaworski et al. (1995) observaram que espécies do carrapato *Amblyomma americanum* ao se alimentarem nos hospedeiros, secretam calreticulina junto com outros fatores anti-complemento. Outras funções atribuídas à CRT são: o domínio N-terminal da CRT modula a expressão dos genes do receptor de glicocorticóide, tanto *in vitro* como *in vivo*, via interação proteína com proteína; o domínio C-terminal da CRT interage especificamente com fatores da coagulação (IX, X, protrobina) estudada da calreticulina; o domínio P tem uma significativa similaridade com a calnexina (proteína da membrana do ER), que tem função chaperona (JOSHI et al., 1996).

Ferreira et al. (2002) clonaram, caracterizaram a seqüência e analisaram a expressão da calreticulina, codificando o cDNA do *B. microplus*. A similaridade e as análises filogenéticas indicaram uma forte relação com outras seqüências de CRT de artrópodes. A proteína recombinante (rBmCRT) induziu a produção de anticorpos em coelhos. Em bovinos, infestados pelo carrapato *B. microplus*, esta proteína não foi capaz de induzir resposta imune humoral (IgG). A CRT, em muitas situações tem mostrado ser altamente imunogênica para mamíferos. A CRT da *Dirofilaria immitis* foi reconhecida pelo soro de cães infestados (TSUJI et al., 1998). Pacientes humanos com oncocercose (ROKEACH et al., 1994), esquistossomose (KHALIFE et al., 1993), infestados com *Tripanossoma cruzi* (MARCELAIN et al., 2000) ou *Necator americanus* (PRITCHART et al., 1999) apresentaram anticorpos que reconheceram a CRT dos respectivos parasitas. A CRT do *Amblyomma americanum* foi reconhecida pelo soro de coelhos e humanos infestados pelo carrapato (SANDERS et al., 1998, 1999). A rBmCRT não produziu resposta imune humoral em bovinos infestados por *B. microplus*, embora tenha sido reconhecida pelo soro de cães infestados por *Rhipicephalus sanguineus*. A reação cruzada entre anticorpos anti-CRT já foi demonstrada entre carrapatos (SANDERS et al., 1998, 1999).

O peptídeo 2E4 também se alinhou a proteínas da família das lipocalinas, que têm função imunológica e de hemostasia.

Os peptídeos 2D7 e 2E6 alinharam-se com as proteínas enzima conversora de angiotensina e esterases, respectivamente. A enzima conversora de angiotensina (ACE) é uma carboxipeptidase, que tem como principais funções nos mamíferos o controle da pressão sanguínea, a homeostasia dos fluídos e eletrólitos e participação em alguns processos relacionados à reprodução e imunidade (JARMEY et al., 1995). Nos artrópodes, os substratos tradicionais da ACE, tais como angiotensina I, bradicinina e substância P, não tem sido demonstrado. A atividades desta carboxipeptidase só foi relatada em artrópodes para a *Musca domestica*. Jarmey et al. (1995) encontraram similaridade da ACE com a Bm91, proteína do intestino do carrapato identificada como um antígeno protetor para uma vacina contra carrapatos. O peptídeo 2E6 alinhou com esterases presentes na

saliva do carrapato. ANDREOTTI (2002) identificou uma proteína inibidora de serino-proteases (BMTI) que possui um efeito protetor de 72,8%, após a administração de três doses nos animais. A vacina continua em teste.

Há mais de três décadas tem se buscado desenvolver uma vacina eficaz contra o carrapato *B. microplus*, em função dos prejuízos que o seu parasitismo acarreta à pecuária mundial. A proteína Bm86 foi identificada como antígeno para a composição de vacina, chegando a ser comercializada como é o caso da TickGard e TickGard Plus com a Bm86 clonada em *E. coli* (WILLADSEN et al., 1989 e WILLADSEN et al., 1997) e a Gavac com a Bm86 clonada em *P. pastoris* (RODRIGUEZ et al., 1994), mas não apresentando ainda a eficácia ideal para uma vacina protetora, além da necessidade da aplicação de produtos químicos concomitantemente. Outros antígenos foram e estão sendo estudados: a Bm91 (RINDING et al., 1994), BMA7 (MCKENNA et al., 1998), BYC (LOGULLO et al., 1998), Bm95 (GARCIA-GARCIA, 2000), pró-catepsina e antígeno B (WILLADSEN, 2001), peptídeos sintéticos (PATARROYO et al., 2002), serino-proteases (ANDREOTTI, 2002), vitelina e GP80 (TELLAN et al., 2002), na tentativa de encontrar a vacina ideal.

No presente estudo foram utilizados anticorpos policlonais para selecionar epítomos lineares, que induziram resposta imune tanto em camundongos com em bovinos. Outros estudos estão sendo conduzidos para caracterizar a sensibilidade e especificidade aos peptídeos selecionados.

CONCLUSÃO

- A seleção de peptídeos por *phage display* apresentou-se eficiente para obtenção de seqüências consenso a partir de anticorpos policlonais;
- Peptídeos obtidos apresentaram alinhamentos similares com proteínas antigênicas do *Boophilus microplus*;
- Obteve-se resposta imune em camundongos e bovinos contra os peptídeos selecionados;
- Bovinos infestados não apresentaram quantidade de carrapatos de tamanho entre 4,5 e 8,0 mm para contagem.
- Peptídeos que conferiram resposta imune com os maiores títulos, alinharam-se com a calreticulina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreotti, R.; Gomes, A.; Malavazi-Piza, K.C.; Sasaki, S.D.; Sampaio, C.A.M.; Tanaka, A.S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International Immuno Pharmacology*, v. 2, p.557– 563, 2002.

Barbas, C.F.III; Burton, D.R.; Scott, J.K.; Silverman, G.J. Phage Display: A Laboratory Manual. Plain view, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Barbas, C.F.III; Bain, J.D.; Hoekstra, D.M.; Lerner, R.A. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 89, p. 4457, 1992.

Coppolino, M.G.; Dedhar, S. Calreticulin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 30, p. 553-558, 1998.

De Berardinis, P.D.; Sartorius, R.; Fanutti, C.; Perham, R.N.; Pozzo, G.D.; Guardiola, J. Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses. *Nat. Biotech.*, v. 18, p. 873-876, 2000.

Ferreira, C.A.S.; Da Silva Vaz Jr., I.; Silva, S.S.; Haag, K.L.; Valenzuela, J.G.; Masuda, A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Experimental Parasitology*, v. 101, p. 25-34, 2002.

Frenkel, D.; Solomon, B. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.* v. 16, p. 5675-5679, 2002.

Garcia-Garcia, J.C.; Montero, C.; Redondo, M.; Vargas, M.; Canales, M.; Boue, O.; Rodriguez, M.; Joglar, M.; Machado, H.; Gonzalez, I.L.; Valdes, M.; Mendez, L.; De La Fuente. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus J. Vaccine*, v.18, n. 21, p.2275-87, 2000.

Grisi, L.; Massard, C.L.; Moya Borja, G.E.; Pereira, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

Horn, S.C.; Arteché, C.C.P. Carrapato, berne e bicheira, inquérito nacional, 1983, divulgado pelo Ministério da Agricultura, Brasília, maio de 1984.

Huerta, M.; de Aluja, A.S.; Fragoso, G.; Toledo, A.; Villalobos, N.; Hernández, M.; Gevorkian, G.; Acero, G.; Díaz, A.; Alvarez, I.; Ávila, R.; Beltrán, C.; García, G.; Martínez, J.J.; Larralde, C.; Sciutto, E. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural México. *Vaccine*, v. 20, p.262-266, 2001.

Jarmey, J.M.; Riding, G.A.; Pearson, R.D.; McKenna, R.V.; Willadsen, P. Carboxypeptidase from *Boophilus microplus*: a "concealed" antigen with similarity to angiotensin-converting enzyme. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, v. 25, n. 9, p. 969-974, 1995.

Jaworski, D.C.; Simmen, F.A.; Lamoreaux, W.; Coons, L.B.; Muller, M.T.; Needham, G.R. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *J. Insect Physiol.*, v. 41, n.4, p.369-375, 1995.

Joshi, M.; Pogue, G.P.; Duncan, R.C.; Lee, N.S.; Singh, N.K.; Atreya, C.D.; Dwyer, D.M.; Nakhasi, H.L. Isolation and characterization of *Leishmania donovani* calreticulin gene and its conservation of the RNA binding activity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 81, p.53-64, 1996.

Khalife, J.; Pierce, R.J.; Godin, C.; Capron, A. Cloning and sequencing of the gene encoding *Schistosoma mansoni* calreticulin. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 62, p.313-316, 1993.

Kovacs, H.; Campbell, I.D.; Strong, P.; Johnson, S.; Ward, F.J.; Reid, K.B.M.; Eggleton, P. Evidence that C1q binds specifically to CH₂-like immunoglobulin γ motifs present in the autoantigen calreticulin and interferes with complement activation. *Biochemistry*, v. 37, p. 17865-17874, 1998.

Lemamy, G.J. High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): characterization and potential use in clinical cancer studies. *Int. J. Cancer*, v. 80, p. 896-902, 1999.

Logullo, C.; Da Silva Vaz, J.R.; Sorgine, M.H.F.; Paiva, I.; Silva, G.O.; Faria, F.S.; Zingali, R.; Rosa De Lima, M.; Abreu, L.; Oliveira, E.F.; Alves, E.W.; Masuda, H.; Gonzales, J.C.; Masuda, A.; Oliveira, P.L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitol.*, v. 116, p. 525-532, 1998.

Marcelain, K.; Colombo, A.; Molina, M.C.; Ferreira, L.; Lorca, M.; Aguilon, J.C.; Ferreira, A. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Trop.*, v. 75, p. 291-300, 2000.

Mckenna, R.V.; Riding, G.A.; Jarmey, J.A.; Pearson, R.D.; Willadsen, P. Vaccination of cattle against *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. *Parasite Immunology*, v. 20, p. 325-36, 1998.

Mulenga, A; Sugimoto, C.; Onuma, M. Issues in tick vaccine development identification and characterization of potencial candidate vaccine antigens. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 1353-1361, 2000.

Noren, K. A.; Noren C.J. Construction of High-Complexity Combinatorial Phage Display Peptide Libraries. *Methods*, v. 23, p. 169–178, 2001.

Parmley, S.; Smith, G. Antibody-selectable filamentous fd phagevectors: affinity purification of target genes. *Gene*, v. 73, p. 305–318. 1988.

Patarroyo, J.H.; Portela, R.W.; De Castro, R.O. ; Couto Pimentel, J.; Guzman, F.; Patarroyo, M.E.; Vargas, M.I.; Prates, A.A.; Dias Mendes, M.A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 88, p.163–172, 2002.

Petrenko, V.A.; Smith, G.P. Phage from landscape libraries as substitute antibodies. *Protein Eng.*, v. 13, p. 589-592, 2000.

Pritchard, D.I.; Brown, A.; Kasper, G.; Mcelroy, P.; Loukas, A.; Hewitt, C.; Berry, C.; Fullkrug, R.; Beck, E. A hookworm allergen which strongly resembles calreticulin. *Parasite Immunol.*, v. 21, p. 439-450, 1999.

Puntoriero, G.; Meola, A.; Lahm, A.; Zucchelli, S.; Ercole, B.B.; Tafi, R.; Pezzanera, M.; Mondelli, M.U.; Cortese, R.; Tramontano, A.; Galfre, G., Nicosia, A. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *Embo J.*, v. 17, p. 3521-3533, 1998.

Rader, C.; Barbas III, C.F. Phage display of combinatorial antibody libraries. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 8, p. 503-508, 1997.

Riding, G.A.; Jarmey, J.; Mckenna, R.V.; Pearson, R.; Cobon, G.S.; Willadsen, P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*: purification, localization and possible function. *J. Immunol.*, v. 153, p. 5158-66, 1994.

Robertson, M. W. Phage and *Escherichia coli* expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor alfa-subunit ectodomain. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p.12736-12743, 1993.

Rodriguez, M.; Rubiera, R.; Manuel, P.; Montesinos, R.; Cremata, J.; Falcon, V.; Sanchez, G.; Bringas, R.; Cordov, S.; Valdes, M.; Lleonart, R.; Herrera, L.; De La Fuente, J. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J. Biotech.*, v. 33, p.135-146,1994.

Rokeach, L.A.; Zimmerman, P.A.; Unnasch, T.R. Epitopes of the *Onchocerca volvulus* RAL1 antigen, a member of the calreticulin family of proteins, recognized by sera from patients with onchocerciasis. *Infect Immun.*, v. 62, p. 3696-3704, 1994.

Sanders, M.L.; Glass, G.E.; Nadelman, R.B.; Wormser, G.P.; Scott, A.L.; Raha, S.; Ritchie, B.C.; Jaworski, D.C.; Schwartz, B.S. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* (Say) and are correlated with tick engorgement indices. *Am. J. Epidemiol.*, v. 149, p. 777-784, 1999.

Sanders, M.L.; Jaworski, D.C.; Sanchez, J.L.; DeFraitas, R.F.; Glass, G.E.; Scott, A.L.; Raha, S.; Ritchie, B.C.; Needham, G.R.; Schwartz, B.S. Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a

biomarker of tick exposure in human. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 59, p. 279-285, 1998.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, p.18.60-18.75, 1989.

Scala, G.; Chen, X.; Liu, W.; Telles, J.N.; O'Cohen, J.; Vaccarezza, M.; Igarashi, T.; Fauci, A. S. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1 positive sera. *J Immunol.*, v. 162, p. 6155-6161, 1999.

Sciutto, E.; Fragoso, G.; Fleury, A.; Laclette, J.P.; Sotelo, J.; Aluja, A.; Vargas, L.; Larralde, C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect.*, v. 2, p. 1875-1890, 2000.

Silva Vaz Jr, I.; Logullo, C.; Sorgine, M.; Velloso, F.F.; Lima, M.F.R.; Gonzalez, J.C.; Masuda, H.; Oliveira, P.L.; Masuda, A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 66, p. 331-341, 1998.

Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v.228, p. 1315-1317, 1985.

Soumillion, P.; Jespers, L.; Bouchet, M.; Marchand-Brynaert, J.; Winter, G.; Fastrez, J. Selection of β -lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. *J. Mol. Biol.*, v. 237, p. 415-422, 1994.

Tellam, R.L.; Kemp, D.; Riding, A.G.; Briscoe, A.S.; Smith, B.D.; Sharp, B.P.; Irving, B.D.; Willadsen, P. A reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Veterinary Parasitology*, v. 103, p. 141-156, 2002.

Tizard, I.R. *Veterinary immunology*. Saunders Company, 6^a ed, 482p, 2000.

Tsuji, N.; Morales, T.H.; Ozols, V.V.; Carmody, A.B.; Chandrashekar, R. Molecular characterization of a calcium-binding protein from the filarial parasite

Dirofilaria immitis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 97, p. 69-79, 1998.

Wharton, R.H.; Utech, K.B.W.; Turner, H.G. Resistance to the cattle tick *Boophilus microplus* In a herd of Australian Illawarra. Shorthorn cattle: its assessment and heritability. *Austral. J. Agric. Res.*, v. 21, p. 163-181, 1970.

Willadsen, P. Novel vaccines for ectoparasites. *Veterinary Parasitology*, v. 71, p. 209-22, 1997.

Willadsen, P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary Parasitology*, v. 101, p. 353–367, 2001.

Willadsen, P.; Cobon, G.; Hungerford, J. The role of vaccination in current and future strategies for tick control. In: Seminario Internacional de Parasitología Animal. Acapulco, Mexico. Proceedings, p. 88-100, 1995.

Willadsen, P.; Kemp, D.H. Vaccination with concealed antigens for tick control. *Parasitology Today*, v.4, p. 196-198, 1988.

Willadsen, P.; Riding, G.A.; Mckenna, R.V.; Kemp, D.H.; Tellam, R.L.; Nielsen, J.N. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J. Immunology*, v. 143, p. 1346–51, 1989.