



Ministério da Educação  
Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Genética e Bioquímica  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES EPÍTOPOS  
ESPECÍFICOS DO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SELECIONADOS  
POR BIBLIOTECAS DE *PHAGE DISPLAY***

---

Aluno: Carlos Roberto Prudencio

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA-MG

2008



Ministério da Educação  
Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Genética e Bioquímica  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES EPÍTOPOS  
ESPECÍFICOS DO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SELECIONADOS  
POR BIBLIOTECAS DE *PHAGE DISPLAY***

---

ALUNO: Carlos Roberto Prudencio

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

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

P971d Prudencio, Carlos Roberto, 1976-

Desenvolvimento de peptídeos recombinantes epítopos específicos do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* selecionados por bibliotecas de *Phage Display* / Carlos Roberto Prudencio. - 2008.  
150 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Vacinas sintéticas - Teses. 2. Biotecnologia animal - Teses. 3. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* - Teses. 4. Peptídeos - Vacinas - Teses..I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- . II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

---

CDU: 615.371

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação  
Palavras Chave: Epítopos, *Phage Display*, Vacinas, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

**DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES EPÍTOPOS  
ESPECÍFICOS DO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SELECIONADOS  
POR BIBLIOTECAS DE PHAGE DISPLAY.**

---

Carlos Roberto Prudencio

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Presidente:

Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho - UFU

Examinadores:

Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior - UFRS

Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - UFMG

Dr. Matias Pablo Juan Szabó - UFU

Dr. Marcelo Emílio Beletti - UFU

Data da Defesa: 27/05/2008

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

---

(Orientador)

Uberlândia, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

*Dedico ao meu pai Lilonio Honório Prudencio (in memorian),*

---

## AGRADECIMENTOS

---

Primeiramente, devo agradecer a minha família, Darcy e Ana Liza, pelo apoio, esforço e compreensão nestes momentos tão difíceis de minha.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, pela oportunidade e estímulo durante a orientação na realização desta tese de doutorado e na condução do Laboratório de Genética Molecular.

Aos professores e funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU.

Ao professor Matias Pablo Juan Szabó pelas importantes sugestões referentes aos testes clínicos.

A Daise Silva pelo suporte técnico referentes a padronização de algumas metodologias utilizadas neste trabalho.

Ao professor George P. Smith, University of Missouri, Columbia, EUA, por ter fornecido gratuitamente as bibliotecas de *Phage Display* do tipo Fd-tet e, principalmente, por ter desenvolvido a metodologia.

Aos professores Andrea Maranhão (UNB), Guilherme Oliveira (CPqRR/FIOCRUZ – BH) e Ana Maria Bonetti (UFU), por terem cedido as cêpas bacterianas para expressão de proteínas.

Ao bioinformata Prof. Dr. Jose Miguel Ortega (UFMG) pelas sugestões e análises.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular (UFU), em especial ao Guilherme Souza e Rone Cardoso 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, veterinária, pela colaboração.

À Vallée S/A e seus funcionários, especialmente o Dr. Moacir Marchiori Filho e às ex-funcionárias, Dra. Aline Aparecida Rezende Rodrigues e Andrea de Oliveira Marques Marra pelo incentivo e apoio durante a realização do projeto.

Às agências financiadoras FINEP, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro fundamental para a execução deste trabalho.

Ao grande arquiteto do universo, 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

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>APRESENTAÇÃO .....</b>                                                           | <b>1</b>  |
| <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>                                                  | <b>4</b>  |
| Taxionomia e filogenia do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....          | 4         |
| Origem .....                                                                        | 4         |
| Morfologia (Arthur, 1960) e (Nuñez et al., 1982).....                               | 5         |
| Hospedeiros.....                                                                    | 6         |
| Distribuição geográfica .....                                                       | 6         |
| Ciclo de vida .....                                                                 | 6         |
| Prejuízos econômicos.....                                                           | 8         |
| Resistência dos bovinos ao carrapato .....                                          | 9         |
| Tratamento carrapaticida e controle do carrapato .....                              | 11        |
| Outras formas de controle do carrapato: .....                                       | 13        |
| Controles alternativos .....                                                        | 13        |
| Vacinas .....                                                                       | 14        |
| <i>Phage Display</i> .....                                                          | 23        |
| Utilização de bibliotecas de <i>Phage Display</i> na identificação de biomoléculas  | 23        |
| Sistemas de <i>Phage Display</i> .....                                              | 26        |
| Tipos de Proteínas e peptídeos expressos na superfície viral.....                   | 27        |
| Aplicações .....                                                                    | 28        |
| Mapeamento de epítomos e mimeticidade .....                                         | 28        |
| Aplicações de Mimeticidade de ligação .....                                         | 29        |
| Caracterização de epítomos: uma nova direção para o desenvolvimento de vacinas..... | 30        |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                             | <b>32</b> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>                                                               | <b>46</b> |
| Geral .....                                                                         | 46        |
| Específicos .....                                                                   | 46        |

|                                                                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Capítulo único .....</b>                                                                                                                 | <b>47</b> |
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                                                          | <b>48</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                                                        | <b>50</b> |
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                     | <b>52</b> |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                             | <b>54</b> |
| Anticorpos.....                                                                                                                             | 54        |
| Preparação dos antígenos.....                                                                                                               | 54        |
| Preparação e caracterização dos anticorpos policlonais .....                                                                                | 54        |
| Seleção Biológica ( <i>Biopanning</i> ).....                                                                                                | 56        |
| Estratégias de seleção biológica .....                                                                                                      | 58        |
| Titulações e purificações dos fagos.....                                                                                                    | 61        |
| Seqüenciamento de DNA dos fagos.....                                                                                                        | 63        |
| Análises de <i>in silico</i> .....                                                                                                          | 64        |
| Análises de especificidade dos clones selecionados.....                                                                                     | 65        |
| <i>Phage</i> -ELISA.....                                                                                                                    | 66        |
| <i>Dot-Blots</i> .....                                                                                                                      | 67        |
| <i>Western Blot</i> .....                                                                                                                   | 67        |
| Teste dos fagos recombinantes como imunógenos do <i>Rhipicephalus</i><br>( <i>Boophilus</i> ) <i>microplus</i> . ....                       | 68        |
| Preparo do inóculo.....                                                                                                                     | 68        |
| Inoculações.....                                                                                                                            | 69        |
| Ensaio de infestação natural e desafio de bovinos .....                                                                                     | 71        |
| Ensaio de infestações natural em bovinos com carrapatos (imunotriagem) ....                                                                 | 72        |
| Testes cutâneo de hipersensibilidade dos clones de fagos em bovinos<br>infestados naturalmente.....                                         | 73        |
| Projeto e síntese dos genes artificiais contendo múltiplos mimetopos de<br><i>Rhipicephalus</i> ( <i>Boophilus</i> ) <i>microplus</i> ..... | 74        |
| Projeto dos genes artificiais .....                                                                                                         | 74        |

|                                                                                                                                                                             |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Síntese química, clonagem e expressão gênica.....                                                                                                                           | 74         |
| Expressão das proteínas recombinantes PRA e PRB .....                                                                                                                       | 75         |
| Teste de expressão .....                                                                                                                                                    | 75         |
| Análises da reatividade das proteínas expressas (PRA e PRB) no sistema heterólogo.....                                                                                      | 76         |
| Preparação das proteínas recombinantes .....                                                                                                                                | 77         |
| Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade .....                                                                                                | 78         |
| <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                                                                                      | <b>79</b>  |
| Produção e caracterização de soro hiperimune em galinhas imunizadas com os antígenos totais do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....                             | 79         |
| Obtenção de peptídeos miméticos de epítomos de proteínas do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> pela utilização de bibliotecas de <i>Phage Display</i> .....         | 84         |
| Análises das seqüências dos peptídeos selecionados. ....                                                                                                                    | 86         |
| Estudo da imunoreatividade dos clones recombinantes selecionados. ....                                                                                                      | 96         |
| Níveis de anticorpos no soro de camundongos, imunizados com clones de fagos, imunorreativos contra as proteínas totais de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> . .... | 105        |
| Desafio dos bovinos imunizados com clones de fagos.....                                                                                                                     | 109        |
| Imunotriagem.....                                                                                                                                                           | 111        |
| Teste de hipersensibilidade cutânea em bovinos infestados naturalmente com <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....                                                 | 114        |
| Construção das proteínas recombinantes e síntese dos genes artificiais .....                                                                                                | 123        |
| Análises de Imunogenecidade das proteínas recombinates.....                                                                                                                 | 128        |
| Preparação das proteínas recombinantes .....                                                                                                                                | 128        |
| <b>DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                                      | <b>132</b> |
| <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                                                      | <b>142</b> |
| <b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>                                                                                                                                            | <b>144</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                                                      | <b>145</b> |

## LISTA DE TABELAS

---

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1 - Determinações das taxas de enriquecimento durante as seleções biológicas. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 85  |
| Tabela 2 - Seqüência de aminoácidos dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelos anticorpos policlonais de galinhas imunizadas com proteínas totais de larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> . ....                                                                                                                                                                                                                 | 87  |
| Tabela 3 - Frequência dos aminoácidos constituintes das seqüências dos peptídeos selecionados pelas IgYs. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 88  |
| Tabela 4 - Determinação das seqüências consenso. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 89  |
| Tabela 5 - A similaridade entre as seqüências consenso com as proteínas do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> depositadas no <i>GENEBANK</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 91  |
| Tabela 6 - Busca de similaridade entre o total de peptídeos selecionados (107) em todas as estratégias de seleção (S1 – S7) contra o total de proteínas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> resgatadas do <i>GENEBANK</i> . ....                                                                                                                                                                                                 | 93  |
| Tabela 7 - Busca de similaridade entre uma população de peptídeos obtidas em cada uma das sete seleções (S1-S7) e as seqüências de proteínas do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> depositadas no <i>GENEBANK</i> . ....                                                                                                                                                                                                           | 94  |
| Tabela 8 - Alinhamentos em ordem decrescente de frequências de peptídeos mimetopos similares às proteínas depositadas no <i>GENEBANK</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 95  |
| Tabela 9 - Representação de similaridades entre os peptídeos recombinantes e as proteínas preditas de ESTs de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> depositadas no <i>GENEBANK</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                             | 95  |
| Tabela 10 - Número de carrapatos presentes no corpo dos animais (controle e imunizados com o conjunto de clones Seq. ID N° 18, 19, 20, 21, 22, 26, 32, 37 e 41), entre 4,5 e 8,0 mm de diâmetro, infestados artificialmente 12 dias após a primeira inoculação (19/05), com larvas do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (cepa de campo), totalizando duas infestações de 5000 larvas cada, com intervalo de 1 dia. .... | 110 |
| Tabela 11 - Compilação dos resultados obtidos nas diversas etapas de seleção de mimetopos específicos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 119 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1 - Seleção biológica com as bibliotecas de peptídeos .....                                                                                                                                                     | 25  |
| Figura 2 - Tipos de sistemas de <i>Phage Display</i> .....                                                                                                                                                             | 27  |
| Figura 3 - Bibliotecas combinatórias de peptídeos randômicos utilizadas nos experimentos de seleção biológica .....                                                                                                    | 58  |
| Figura 4 - Gel SDS-PAGE 10% de proteínas totais de larvas e teleóginas: (L)- Proteínas totais de larvas, (T) - Proteínas totais de teleóginas. ....                                                                    | 80  |
| Figura 5 - Resultados do ELISA expressados como títulos (Título = Diluição do soro baseado no valor do “cut off”).....                                                                                                 | 80  |
| Figura 6 - SDS-PAGE (16%) IgY obtidas por precipitação com sulfato de amônio e cromatografadas em resina de troca iônica.....                                                                                          | 81  |
| Figura 7 - SDS-PAGE (Gel 10%) de preparações de imunoglobulinas de galinhas obtidas através da purificação por imunoafinidade dos anticorpos com proteínas totais do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> . .... | 82  |
| Figura 8 - Caracterização das Imunoglobulinas de galinhas purificadas e eluídas por afinidade.....                                                                                                                     | 83  |
| Figura 9 - Teste <i>Phage</i> -ELISA para a verificação da imunorreatividade de 360 clones de fagos, obtidos na seleção S1.....                                                                                        | 97  |
| Figura 10 - <i>Phage</i> -ELISA de 48 clones de fagos, obtidos após a estratégia de seleção S3 (biblioteca Ph.D.-C7C).....                                                                                             | 97  |
| Figura 11 - Figura 11-A, B e C representa o <i>Phage</i> -ELISA dos clones selecionados na seleção S1, seleção S2 e a seleção S3.. ....                                                                                | 98  |
| Figura 12 - Determinação da imunoreatividade dos fagos por ensaios de <i>Dot Blot</i> . ....                                                                                                                           | 101 |
| Figura 13 - Ensaios de competição por Dot-blot.....                                                                                                                                                                    | 102 |
| Figura 14 - <i>Western Blot</i> dos clones de fagos imunorreativos obtidos na seleção S1.....                                                                                                                          | 103 |
| Figura 15 - <i>Western Blot</i> dos clones de fagos imunorreativos obtidos na seleção S2.....                                                                                                                          | 103 |
| Figura 16 - <i>Western Blot</i> dos fagos imunorreativos obtidos na seleção S3.. ....                                                                                                                                  | 104 |
| Figura 17 - <i>Western Blot</i> dos fagos obtidos na seleção S4, S5, S6 e S7.....                                                                                                                                      | 104 |

|                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 18 - Níveis de anticorpos no soro de camundongos imunizados com clones de fagos e peptídeos sintéticos contra as proteínas totais de larvas de carrapato, calculados pelo teste de ELISA, 90 dias após a primeira imunização..... | 106 |
| Figura 19 - Índice no soro de camundongos imunizados com clones de fagos contra os antígenos de larvas e teleóginas de carrapato, calculados pelo teste de ELISA, 90 dias após a primeira imunização.....                                | 107 |
| Figura 20 - Reatividade dos anticorpos no soro do grupo de camundongos imunizados com o peptídeo sintético correspondente a sequência Seq. ID No 18. ....                                                                                | 108 |
| Figura 21 - Níveis de anticorpos no soro de camundongos imunizados com clones de fagos contra as proteínas totais de larvas de carrapato, calculados pelo teste de ELISA, 19 dias após a primeira imunização.....                        | 109 |
| Figura 22 - Teste de oviposição em fêmeas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> após se desenvolverem em animais inoculados com fagos recombinantes.....                                                                         | 110 |
| Figura 23 - Contagem de carrapatos em bovinos infestados naturalmente com <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> ..                                                                                                                  | 112 |
| Figura 24 - <i>Dot-Blot</i> realizado no teste de imunotriagem para detecção de imunorreatividade dos clones contra os anticorpos de animais infestados naturalmente com o <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....              | 113 |
| Figura 25 - Teste de hipersensibilidade cutânea com antígenos totais de larvas em bovinos infestados naturalmente com <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> ..                                                                      | 115 |
| Figura 26 - Teste hipersensibilidade cutânea com fagos recombinantes no bovino 09 infestado naturalmente com <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> ..                                                                               | 116 |
| Figura 27 - Teste de hipersensibilidade cutânea com fagos na região cervical de bovinos infestados naturalmente com <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> . ....                                                                    | 117 |
| Figura 28 - Teste hipersensibilidade cutânea com fagos no pavilhão auditivo de bovinos infestados naturalmente com <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> . ....                                                                     | 118 |
| Figura 29 - Gene Artificial A: Alinhamento de DNA (Região otimizada). ....                                                                                                                                                               | 124 |
| Figura 30 - Gene Artificial B: Alinhamento de DNA (Região otimizada). ....                                                                                                                                                               | 125 |
| Figura 31 - Análises de conteúdo GC (Guanina e Citosina) nas seqüências artificiais dos genes A e B. ....                                                                                                                                | 126 |

|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 32 - Restrição enzimática do vetor pET32a. ....                                                                        | 127 |
| Figura 33 - Indução da expressão das proteínas PRA e PRB em extrato de <i>E. coli</i> ,<br>respectivamente.. ....             | 127 |
| Figura 34 - <i>Western Blot</i> da indução da expressão das proteínas PRA e PRB em<br><i>E. coli</i> .. ....                  | 128 |
| Figura 35 - Ensaio de solubilidade para a expressão de recombinantes pET32a<br>contendo a proteína PRA. ....                  | 129 |
| Figura 36 - Ensaio de solubilidade para a expressão de recombinantes pET32a<br>contendo a proteína PRA.. ....                 | 130 |
| Figura 37 - Processo de purificação da proteína recombinante e solubilização dos<br>corpos de inclusão.. ....                 | 130 |
| Figura 38 - Purificação das proteínas PRA e PRB por cromatografia de afinidade<br>Ni-NTA, analisada em gel SDS-PAGE 16%. .... | 131 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

|         |                                             |
|---------|---------------------------------------------|
| scFv    | Fragmento variável de cadeia única          |
| °C      | Graus Celsius                               |
| pComb3X | Vetor de clonagem.                          |
| BCIP    | fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo        |
| 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     | Catepsina de ovo de <i>Boophilus</i>        |
| DNA     | Ácido desoxirribonucleico                   |
| OD      | Densidade ótica                             |
| DTT     | Ditiotreitol                                |
| ECA     | Enzima conversora de angiotensina           |
| EDTA    | Etileno diamino tetra acetato               |
| IgG     | Imunoglobulina G                            |
| IgY     | Imunoglobolinas Y (Yolk)                    |
| IPTG    | Isopropil $\alpha$ -D-tiogalactosise        |
| M13KE   | Bacteriófagos filamentosos                  |
| NBT     | azul de nitrotetrazólio                     |
| 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               |
| TBS     | Trifosfato de sódio                         |
| PCR     | Reação em cadeia da polimerase              |
| PD      | <i>Phage Display</i>                        |
| PEG     | Polietileno glicol                          |
| pH      | Potencial Hidrogeniônico                    |

|                  |                                                                                     |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Ph.D             | Bibliotecas de <i>Phage Display</i>                                                 |
| Ph.D-C7C         | Biblioteca contendo peptídeos randômicos com 7 resíduos flanqueados por 2 cisteínas |
| PIII             | Proteína III do capsídio de bacteriófagos filamentosos                              |
| PVIII            | Proteína VIII do capsídio de bacteriófagos filamentosos                             |
| RNA <sub>m</sub> | RNA mensageiro                                                                      |
| SDS              | Dodecil Sulfato de Sódio                                                            |
| TBST             | Trifosfato de sódio com Tween 20                                                    |
| UFC              | Unidades formadoras de colônias                                                     |
| X-gal            | 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha$ -D-galactosideo                                 |
| GL               | Galinha imunizada com proteínas de larva                                            |
| GT               | Galinha imunizada com proteínas de teleógina                                        |
| BL               | Branco da reação com proteínas de larva                                             |
| BT               | Branco da reação com proteínas de teleógina                                         |
| SP               | soros pré-imunes.                                                                   |
| Ni               | Níquel                                                                              |

# ***APRESENTAÇÃO***

---

Melhores índices de produtividade na pecuária brasileira só poderão ser atingidos através do aprimoramento dos sistemas de produção de bovinos, o que será conseguido pela intensificação do manejo, melhor controle sanitário e pelo melhoramento genético dos rebanhos. Nesse contexto, as práticas de manejo visam propiciar maior lotação dos pastos, aumentando a concentração animal e a produtividade, dentro de um limite econômico viável. Essa situação pode favorecer a ocorrência de alterações nas relações entre os organismos envolvidos e conseqüentemente a necessidade de um maior controle dos parasitos dos bovinos, dentre os quais se destaca o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887).

O carrapato é o ectoparasito mais importante dos bovinos brasileiros, ocasionando um prejuízo que chega a ultrapassar os dois bilhões de dólares ao ano devido principalmente à mortalidade dos animais (próximo de 1,2%) e transmissão dos agentes causadores da Tristeza Parasitária Bovina (*Anaplasma sp.* e *Babesia spp.*), diminuição do ganho de peso (aproximadamente 6 Kg/animal/ano), danos ocasionado no couro, gastos com produtos químicos, instalações, equipamentos e mão de obra para o seu controle e diminuição da produção de leite.

O combate ao carrapato dos bovinos tem sido na maioria das vezes, realizado quase que exclusivamente na sua fase parasitária, com a utilização de carrapaticidas químicos, o que corresponde apenas a 5% do total da população de carrapatos numa propriedade. A aplicação desses produtos é feita por meio de aspersão, imersão, dorsal (pour-on) ou injetável (avermectinas e milbemicina). Cada método apresenta suas vantagens e desvantagens e a escolha depende, entre outros fatores, da região geográfica, tipo de criação, manejo e número de animais. Na maioria das propriedades o carrapaticida é aplicado mediante uma avaliação pessoal e empírica do produtor e variam de seis a vinte e quatro tratamentos por ano (controle tradicional). Porém, em algumas regiões, baseado em um trabalho especializado sobre o conhecimento da ecologia e epidemiologia do carrapato, os períodos de tratamentos são pré-definidos (controle estratégico), como nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste.

Os custos altos para o desenvolvimento de novas moléculas químicas chocam com a curta vida útil que elas apresentam e o uso apenas do controle

químico não é uma prática muito atrativa para o produtor rural do ponto de vista econômico, já que a eficiência destas moléculas diminui a cada ciclo de vida do carrapato com a seleção de genótipos mutantes resistentes.

A crescente preocupação com a contínua introdução de produtos químicos no meio ambiente, o seu alto custo, toxidez e o aparecimento da resistência, demandou a busca de outros métodos de controle de carrapatos. As vacinas apresentam uma atrativa alternativa à metodologia química tradicional para o controle de carrapatos, pois apresentam controle profilático e terapêutico, não são agentes químicos, e possuem menor custo e maior tempo para o desenvolvimento da resistência dos parasitos.

O desenvolvimento de vacinas contra o carrapato bovino surgiu na década de 30. Atualmente existem vacinas recombinantes de tecnologia australiana e cubana. Estas vacinas utilizam proteínas da membrana das células do intestino do carrapato para imunizar os animais, que irão produzir anticorpos que lesam principalmente o intestino do carrapato. Estas vacinas não asseguraram ao rebanho o grau de proteção desejado. A utilização de vacinas contra o carrapato bovino ainda é uma prática pouco utilizada na pecuária brasileira e mundial, pelo fato de não existirem no mercado, produtos com eficiência e que garanta o controle sem utilização de métodos químicos associados.

Estes dados combinados indicam a importância da busca de métodos alternativos de controle dos carrapatos em bovinos. Entre os métodos alternativos estão a busca e o desenvolvimento de antígenos mais eficientes para a constituição de uma vacina eficaz.

No presente trabalho, realizou-se uma busca na tentativa da identificação e caracterização de novos antígenos do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. O presente trabalho ainda demonstrou que um perfil geral dos epítomos de um organismo pode ser obtido e a construção de um banco de peptídeos epítomos específicos representa uma importante contribuição para o desenvolvimento de vacinas multi-antigênicas.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---

### Taxionomia e filogenia do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

---

Os Carrapatos (Filo Arthropoda; Subfilo Chelicerata; Classe Aracnida; Subclasse Acari; Ordem Parasitiformes; Subordem Metastigmata; Família Ixodidae) são de importância veterinária e médica em nível mundial devido à sua capacidade de provocar danos diretos e indiretos em animais e humanos. Felizmente, ocorreram grandes progressos na compreensão da evolução dos carrapatos desde meados dos anos noventa, quando os primeiros métodos moleculares foram aplicados no estudo da filogenia de carrapatos. Estudos filogenéticos provêm um quadro evolutivo para que os pesquisadores utilizem como auxílio na compreensão da biologia e dos fenótipos das espécies. Assim, foi possível a obtenção de um relativo consenso entre a maioria dos pesquisadores com relação à filogenia. Como exemplo, algumas espécies de *Rhipicephalus* estão mais estreitamente relacionadas com as espécies de *Boophilus* do que as próprias espécies de *Rhipicephalus* estão relacionadas entre si. Desta forma, o gênero *Boophilus* tornou – se, segundo esses trabalhos, um subgênero de *Rhipicephalus* com a denominação de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Barker e Murrell, 2002a). Atualmente, a nomenclatura final ainda não está definida.

### Origem

---

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 *Boophilus*, palavra que em grego significa “amigo do boi”, está compreendido dentro do gênero *Rhipicephalus*: *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*. O *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* está presente na América do Norte (Estados Unidos e México); o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é encontrado na América Central, América do Sul, Austrália, Oriente, Sul da Flórida,

Sul e Este da África; e o *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* é essencialmente uma espécie africana, distribuindo-se pelo sul e pelas regiões úmidas do Saara.

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

Morfologia (Arthur, 1960) e (Nuñez 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 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 denteição 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 moderado, mais compactas 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 de largura e chegam a atingir 13 mm de comprimento por 8 mm de

largura, quando totalmente ingurgitadas. Hipostômio curto, 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.

#### Hospedeiros

---

O principal hospedeiro do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o bovino, mas outros animais podem ser parasitados, entre eles búfalos, jumentos, burros, ovinos, caprinos, cães, gatos, porcos, veados, onças, preguiças, cangurus, coelhos e cervídeos (Riek, 1959).

#### Distribuição geográfica

---

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* distribui-se geograficamente entre os paralelos 32°N e 32°S, com alguns focos até 35°N e 35°S (Wharton, 1974). No Brasil, o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) 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 Arteché, 1984).

#### Ciclo de vida

---

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um parasito 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, inclusive as fêmeas fecundadas e ingurgitadas chamadas de teleóginas, caem desse hospedeiro. No 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 bovina influencia na fixação e sobrevivência das larvas, e verificar-se 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 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<sup>o</sup> 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 quize a dezessete dias, à temperatura de 27°C e umidade re lativa do ar superior a 80%

(Gonzáles, 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 *Rhipicephalus (Boophilus) 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 CO<sub>2</sub>. 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.

#### Prejuízos econômicos

---

Baseado nas informações fornecidas pelas Secretarias de Agricultura nos estados brasileiros, Horn e Arteché (1984) estimaram os seguintes prejuízos causados pelos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, que chegavam a 968 milhões de dólares: 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 *Rhipicephalus (Boophilus) 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.

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

#### 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 parasito. A saliva do carrapato reduz a função do macrófago e é imunossupressora (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 *Rhipicephalus (Boophilus) 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 *Rhipicephalus (Boophilus) 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 *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*.

Schleger et al. (1976) ao estudar as alterações teciduais ocorridas durante o parasitismo dos bovinos pelo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, verificaram que o grau de desgranulação 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). Uma hipótese abordada é que 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 auto limpeza 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.

#### 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 parasito. 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 consequência, 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 hiper excitação. A administração é tópica.

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 vinte e um 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*” (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 suscetibilidades aos agentes da tristeza parasitária bovina, precisam ser consideradas e adaptações devem ser feitas para se obter sucesso.

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 foram publicados os primeiros relatos de resistência aos endectocidas.

O conhecimento de novos genes e a determinação de marcadores moleculares relacionados à resistência de carrapatos a carrapaticidas permite uma rápida identificação destes genótipos, comparada aos tradicionais métodos utilizados, auxiliando na tomada de decisão para um melhor e mais eficaz método de controle (Pereira et al., 2004, Lino e Goulart 2003).

#### 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.

#### Controles alternativos

---

Como conceito original, as vacinas têm como objetivo imitar o desenvolvimento da imunidade adquirida naturalmente pela inoculação de componentes não patogênicos, mas imunogênicos do patógeno alvo, ou mesmo de organismos estreitamente relacionados. O termo “vaccine” (do latim “vacca”, que em português significa vaca) foi primeiramente descrito por Edward Jenner (1789) na descrição da inoculação de humanos com o vírus cowpox para conferir proteção contra o vírus da varíola infectante em humanos.

As vacinas apresentam uma atrativa alternativa à metodologia química tradicional para o controle do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, pois apresentam controle profilático e terapêutico dos agentes causadores de diversas doenças em humanos e animais, não são agentes químicos, possuem menor custo e maior tempo para o desenvolvimento da resistência dos parasitos (Willadsen, 1997).

A possibilidade para o desenvolvimento de vacinas contra o carrapato, processo cogitado anteriormente apenas para vírus, protozoários e bactérias viabilizou-se após as observações de que infestações de bovino em condições naturais desenvolver expressiva resposta imune contra os tecidos do carrapato. Esta observação levou diversos grupos à procura de antígenos de carrapatos capazes de conferir proteção ao bovino. A maior parte dos esforços para a procura de antígenos foi concentrada no aparelho digestivo e na glândula salivar do carrapato. Foi proposto também o emprego como antígenos na elaboração de uma vacina, proteínas do carrapato com funções fisiologicamente essenciais a sua sobrevivência e com as quais o sistema imune do bovino normalmente não entraria em contato. No entanto, a procura de bons alvos internos do animal esbarra na falta de conhecimento bioquímico mais detalhado da sua fisiologia.

Várias moléculas envolvidas na fisiologia do carrapato e sua interação com o hospedeiro têm sido descritas por diversos grupos de pesquisa. O estudo dessas proteínas possibilita a identificação de novos antígenos para o desenvolvimento de vacinas. Uma vez que estas tenham sido caracterizadas, os seus respectivos genes poderão ser clonados de modo que estas proteínas possam ser produzidas nas quantidades necessárias para testes de

imunoproteção. O fato de que anticorpos bovinos funcionais são encontrados em vários tecidos do carrapato expandiu o leque de moléculas-alvo para além daquelas presentes no intestino de forma que moléculas presentes em praticamente qualquer tecido do carrapato passaram a ser alvo potencial (Da Silva Vaz Junior, 1996).

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 e May, 1983).

No início dos estudos das vacinas contra carrapatos, Wikel (1981) e Ribeiro (1989), considerando o fato de o 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 natural. Para o bovino, a imunidade adquirida com estes antígenos era semelhante a uma primo infestação. Galun (1978), citado por Tellam et al. (1992), baseado nestes resultados, sugeriu então que bovinos fossem imunizados com antígenos, que em uma infestação 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 em bovinos com extrato bruto de *Rhipicephalus (Boophilus) 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 sequência de nucleotídeos do cDNA continha 1982 pares de base que precedia os 650 aminoácidos da Bm86, dos quais 10% eram cisteínas. 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.

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 45nm de diâmetro com grandes propriedades imunogênicas. Fêmeas ingurgitadas provenientes de animais vacinados apresentaram danos significantes, como resultado da resposta imunológica. A Bm86 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<sup>Plus</sup>®, que possui uma maior eficácia induzindo a produção de títulos mais altos de anticorpos (Willadsen, 1997).

As vacinas comercialmente disponíveis (TickGard®, TickGard<sup>Plus</sup>® na Austrália e Gavac® em Cuba), em testes de campo realizados no Brasil, apresentaram uma eficácia moderada e 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.

São exploradas atualmente, três formas distintas de abordagens no desenvolvimento de antígenos vacinais para o controle dos carrapatos:

exploração dos antígenos expostos, exploração dos antígenos ocultos e por último, a combinação de ambas as abordagens cuja denominação é “*dual antigens*”.

A primeira delas, a exploração de antígenos expostos (*exposed antigens*), baseia-se na observação da ocorrência de resistência natural do bovino adquirida depois de repetidas infestações com o ectoparasito o qual propicia a identificação de antígenos por imunidade naturalmente adquirida (Roberts, 1968; Wagland, 1975.; Willadsen, et al. 1989). Em uma recente revisão, os principais antígenos recombinantes testados e classificados como antígenos expostos foram: calreticulina, proteína ligante de imunoglobulinas, proteína ligante de histamina, P29, HL34, RIM36 e 64TRPs (Nuttall et al., 2006).

A segunda metodologia foi baseada na identificação dos antígenos ocultos (*concealed antigens*), os quais não são apresentados naturalmente ao sistema imune do hospedeiro sendo por isso necessário inoculações sucessivas para a geração de resposta imune (Willadsen e Kemp, 1988). Os antígenos desenvolvidos como vacinas recombinantes anti-carrapato, incluindo o antígeno constituinte das vacinas comerciais são: Bm86, Bm91, Bm95, Vitelina, BmPRM (paramiosina), HLS1 (serpina), Voraxina, HLS2, P27/P30 (proteína semelhante a troponina 1 e 4D8) (Nuttall et al., 2006).

Atualmente, um novo conceito é a identificação de antígenos que, quando usados como vacinas, alvejam epítomos antigênicos secretados e também ocultos. O único exemplo é o antígeno 64P isolado de *R. appendiculatus*. Embora o 64P seja um antígeno exposto, ele apresenta reação cruzada com antígenos do intestino, hemolinfa e glândulas salivares de carrapatos adultos e extratos totais de ninfas e larvas de *R. appendiculatus* (Trimnell et al., 2005; Trimnell et al., 2002). A ação dupla existente neste mecanismo, representada pela atuação dos mecanismos de defesa do hospedeiro no local de alimentação e no intestino, oferece uma estratégia de auto-sustentação para o controle do ectoparasito mantida por infestações naturais.

Além do antígeno Bm86, outras proteínas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram caracterizadas como imunógenos potencialmente constituintes de vacinas, mas nenhuma delas está ainda sendo utilizada como vacina

comercial. Os antígenos mais importantes são: as proteínas Bm91 (Riding et al., 1994) e BMA7 (Mckenna et al., 1998), um grupo de proteínas (massas moleculares variando entre 30 kDa a 200 kDa) pela utilização de um anticorpo monoclonal QU13 (Lee e Opdebeeck 1991). Outro anticorpo monoclonal, o BrBm2 reconhece uma proteína de 27 kDa de intestino, (Toro-Ortiz et al., 1997).

Antígenos relacionados com a ovogênese e desenvolvimento embrionário são: a vitelina (Logullo et al., 2002), BYC (*Boophilus* Yolk Catepsin) (Logullo et al., 1998) e uma cisteína endopeptidase degradadora de vitelina (VTDCE) (Seixas et al., 2003).

Proteínas relacionados com a digestão, estresse oxidativo e sistema imune: proteínas ligadoras de heme (HeLp), uma lipoproteína capaz de transportar heme para os diferentes tecidos (Maya-Monteiro et al., 2000) a THAP, uma protease ligadora de heme, relacionada à degradação de VT (Sorgine et al., 2000) e a própria VT, que é uma proteína ligadora de heme com papel antioxidante (Logullo et al., 2002). Uma cisteína endopeptidase denominada BmCL1 (Renard et al., 2000).

Riding et al. (1994) purificaram e caracterizaram uma proteína de membrana denominada Bm91. Esta proteína glicosilada localiza-se na glândula salivar e intestino dos carrapatos, tem peso molecular de 86 kDa e PI entre 4,8 e 5,2. A sequência parcial de aminoácidos mostra similaridades com a enzima conversora de angiotensina dos mamíferos, sugerindo que este antígeno possa 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).

Poucos antígenos foram testados em ensaios de vacinação como antígenos recombinantes efetivos. Embora diversas proteínas de carrapato tenham sido propostas como antígenos protetores específicos, ocorrem à necessidade da identificação e caracterização de novos antígenos para o controle de carrapatos (De la Fuente e Kocan, 2003; Willadsen, 2004).

Para o *Rhipicephalus appendiculatus* a proteína de cemento 64P quando utilizada para imunizar o hospedeiro, representou um avanço significativo por apresentar ação sistêmica contra o parasito (Trimnell et al., 2002).

A proteína da matriz da glândula salivar p29 de *Haemaphysalis longicornis* (Mulenga et al., 1999), a proteína HL34 de função desconhecida (Tsuda et al., 2001), a proteína serpina 2 inibidora de serino protease (Imamura et al., 2005), a proteína P27/p30 semelhante a troponina (You., 2005), representaram avanços importantes para o controle do *Haemaphysalis longicornis*.

As proteínas de *Ixodes scapularis* 4D8 e 4E6 de funções desconhecidas, e a nucleotidase 4F8, são alguns antígenos com funções importantes (Almazan et al., 2005ab) além do fator de engorgitamento AhEF do *Amblyomma hebraeum* (Weiss e Kaufman, 2004) tem afetado significativamente as infestações de carrapato em diversos experimentos.

As proteínas intestinais recombinantes Bm86 e Bm95 foram um marco no desenvolvimento de antígenos protetores para o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Willadsen et al., 1989; Rodriguez et al., 1994; Garcia-Garcia et al., 2000), a proteína Peptidase Bm91 (Willadsen et al., 1996).

Outros antígenos recombinantes não alcançaram o sucesso desejado, tais como a calreticulina (CRT) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Ferreira et al., 2002) e a paramiosina, no qual a proteína recombinante é ligante de IgG e colágeno (Ferreira et al., 2002).

Os resultados destes estudos experimentais têm demonstrado a viabilidade do controle das infestações pelo uso de múltiplos produtos gênicos que alvejam diversos mecanismos fisiológicos de carrapatos. 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 parasito, em particular do sistema digestivo.

O antígeno BMA7 isolado do *Rhipicephalus (Boophilus) 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 o gene desta proteína foi clonado e expressado 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 *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. Esta proteína purificada apresenta duas formas 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  $\alpha$  BYC 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 *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *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 ao 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 mistura de proteases (BMTI), que possui um efeito protetor de 72,8%, após a administração de três doses nos animais. Em um trabalho posterior, foi reportado um estudo conduzido para a evolução de um fragmento sintético de BmTI N-terminal como antígeno contra carrapatos em bovinos apresentando um nível de eficácia de 18,4% quando comparado com o grupo controle (Andreotti, 2007).

Por meio de análises de seqüências de cDNA protetores contra infestações experimentais com *I. scapularis* foi possível a obtenção de antígenos com potencial vacinal (Almazan et al., 2003). Nestes experimentos determinou-se a caracterização e utilização dos antígenos 4F8, 4D8 e 4E6 em formulações de vacinas anti-carrapato de amplo espectro (Almazan et al., 2005ab).

O uso de RNA de interferência (RNAi) para a determinação da função gênica foi demonstrada em várias espécies de carrapato incluindo o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sendo silenciado os antígenos: Bm86, Bm91 e subolesin. Os ovos gerados por fêmeas ingurgitadas injetadas com dsRNA para subolesin foi anormal, sugerindo que a subolesin poderia apresentar um papel no desenvolvimento embrionário. Os resultados apresentados por esta linha de pesquisa apresentaram novas possibilidades para a descoberta de novos antígenos (Nijhof et al., 2007; Kocan et al., 2007).

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 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi isolada e purificada, assim como a proteína GP80 que foi purificada de larvas. Anticorpos produzidos contra estas duas proteínas reconhecem um polipeptídio 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.

As vacinas de DNA contendo vetores codificantes para o gene Bm86, apresentaram resultados encorajadores, embora ainda insuficientes para proteção adequada (De Rose et al., 1999; Ruiz et al., 2007).

Os problemas referentes ao desenvolvimento e produção de vacinas convencionais para o controle do carrapato são desafiadores, pois ainda não se chegou a uma solução satisfatória pela utilização das metodologias tradicionais de cultivo. O procedimento de purificação e obtenção de imunógenos para carrapatos *in natura* necessita de um procedimento complexo para se tornar

viável comercialmente. Por outro lado, proteínas recombinantes são normalmente baseadas em apenas um antígeno e podem não produzir o mesmo efeito imunoprotetor da proteína similar original. Vacinas baseadas em antígenos sintetizados quimicamente apresentam custo acima das vacinas anteriores e em alguns casos também podem não funcionar como a proteína original.

Em função do que foi apresentado referente às formas de controle dos carrapatos por meio de vacinas, para se obter uma vacina ideal, as características necessárias seriam: a atividade contra várias espécies de carrapatos, atividade contra vários estágios, imunidade duradoura, impedimento à fixação dos carrapatos, redução da incidência de doenças nos hospedeiros, ausência de resistência e apresentar um custo efetivo (Nuttall et al., 2006; Tellam et al., 2002).

Uma vacina com reais possibilidades de substituir o uso de acaricidas ainda não está disponível, seria importante o estudo das capacidades imunogênicas dos antígenos já disponíveis e a associação de novos antígenos a serem descobertos. A identificação de diversas proteínas com potencial para serem utilizadas em vacinas contra o carrapato permite estimar que as duas vacinas atuais, com eficácia parcial, tornem-se mais eficientes com o acréscimo de novos imunógenos, uso de adjuvantes específicos e de citocinas, levando as alterações na forma de inoculação e apresentação dos imunógenos ao sistema imunológico do bovino (Vaz Junior et al., 2004). Na pesquisa de vacinas recombinantes para o controle dos carrapatos, tem sido demonstrado que os protótipos contendo mais de um antígeno são mais eficazes do que aqueles com apenas um antígeno (Willadsen et al., 1996).

Neste contexto, as biotécnicas moleculares ocupam um espaço central para o fornecimento de informações no campo de parasitologia e apresenta ser um caminho extremamente promissor para se chegar a vacinas eficazes. Com os estudos científicos e o desenvolvimento tecnológico no campo da proteômica e da genômica de parasitos, torna-se possível a identificação e correlação de dados para o desenvolvimento e comercialização de novos medicamentos, minimizando custos e diminuindo o tempo gasto no desenho de novos produtos. Com estas novas possibilidades torna-se desejável o mapeamento e a identificação dos principais epítomos que conferem proteção. Este mapeamento poderia identificar

os principais epítomos responsáveis por conferirem resposta imune efetiva e eliminar os epítomos relacionados ao desenvolvimento dos mecanismos de evasão da resposta imune do parasito frente ao hospedeiro (Dalton e Mulcahy, 2001).

De forma geral, podemos concluir que os estudos realizados até o momento justificam a confiança sobre a viabilidade do desenvolvimento de uma vacina baseada nas proteínas já descritas e a pesquisa de novas proteínas a serem descobertas consideradas de extrema importância. Pelo exposto, uma vacina baseada na seleção específica de epítomos do carrapato abrangendo diferentes antígenos de diferentes fases e órgãos, representa uma possibilidade extremamente viável na constituição de uma vacina poli-imunogênica comparada às demais metodologias existentes.

#### *Phage Display*

---

A descoberta de novas drogas envolve, na maioria dos casos, a busca de substâncias ativas dentre milhares de componentes provenientes de misturas complexas utilizando-se métodos de seleção *in vitro*. Os candidatos selecionados nos testes *in vitro* são então submetidos a testes *in vivo* onde se espera que produzam a atividade desejada para a nova droga, com o mínimo de efeitos colaterais (revisto por Benhar, 2001).

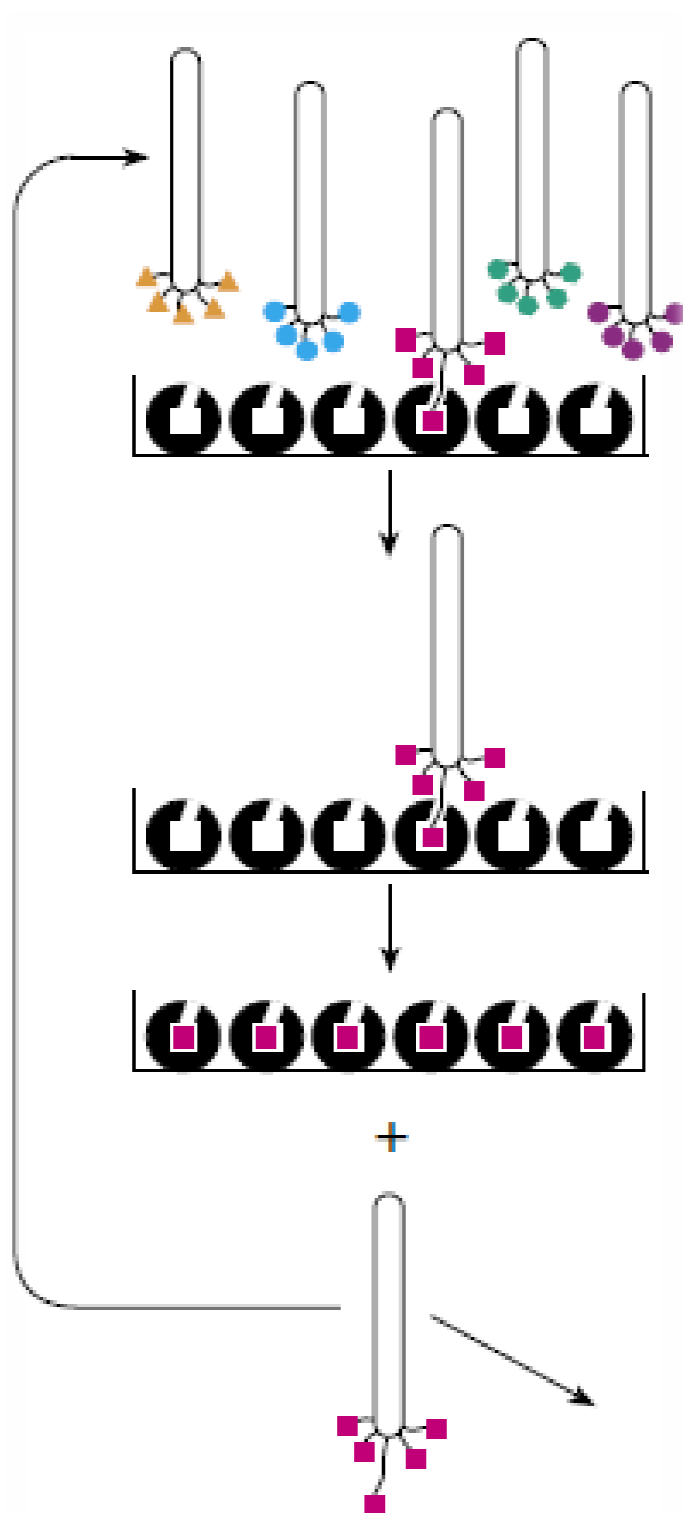
Atualmente existem métodos artificiais capazes de gerar um grande número de moléculas distintas para depois selecionar dentre elas os melhores candidatos com relação à atividade desejada para novos compostos. O princípio baseia-se na geração de uma biblioteca envolvendo um conjunto de variantes que envolvam todas as possíveis combinações dos peptídeos ou proteínas de interesse. Dentre estas metodologias, encontramos as bibliotecas combinatórias de peptídeos e a expressão na superfície de bacteriófagos (*Phage Display*). Esta metodologia tem provado ser uma técnica muito poderosa na obtenção de bibliotecas contendo milhões ou até mesmo bilhões de diferentes peptídeos ou proteínas.

#### *Utilização de bibliotecas de Phage Display para a identificação de biomoléculas.*

---

A tecnologia do *Phage Display*, tradução do inglês como sendo expressão em fagos, é uma metodologia capaz de selecionar peptídeos ou proteínas com diversas finalidades. A técnica consiste em sucessivos ciclos de seleção, lavagem, eluição e amplificação de fagos filamentosos que expressam seqüências randômicas de peptídeos que se ligam por afinidade, a diversas moléculas protéicas ou mesmo não protéicas. Bibliotecas comerciais de peptídeos podem ser utilizadas para a seleção de peptídeos recombinantes que mimetizam epítomos naturais. Estes clones são seqüenciados e as seqüências traduzidas e posteriormente, são realizados testes imunológicos para demonstrar sua reatividade contra o alvo de interesse (Barbas et al., 2001), (Figura 1).

A metodologia de *Phage Display* ou exposição de biomoléculas em fagos, foi desenvolvida inicialmente por Smith (Smith, 1985), ao conseguir a expressão da enzima de restrição *EcoRI* através da fusão com a proteína três (pIII) do capsídeo do fago. O *Phage Display* permite a seleção de peptídeos e ou proteínas, incluindo anticorpos e peptídeos, com alta afinidade e especificidade para vários alvos. A vantagem crucial dessa tecnologia está na ligação direta que existe entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, mostrando a evolução dos ligantes selecionados até moléculas otimizadas (Azzazy e Highmuth, 2002).



Uma biblioteca de fagos, cada expressando uma sequência peptídica diferente, é exposta a uma placa sensibilizada com o alvo.

Fagos não ligantes são descartados durante as lavagens.

O fago ligado especificamente é eluído com um excesso molar de um ligante conhecido para o alvo ou pela alteração do pH.

O conjunto de fagos eluídos é amplificado e o processo é repetido por 3 - 4 ciclos.

Após 3 - 4 ciclos, os clones individuais são isolados e sequenciados.

Figura 1 - Seleção biológica com as bibliotecas de peptídeos (Ph.D. peptide library, New England Biolabs).

A partícula do fago filamentososo é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa protéica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX). 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 (Brigido e Maranhão, 2002). Assim, geralmente 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. 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 de peptídeos sintéticos fusionados na pVIII.

#### Sistemas de *Phage Display*

---

Os sistemas de *Phage Display* podem ser classificados de acordo com a organização dos genes da capa protéica. Estes sistemas de expressão na pIII e pVIII estão ilustrados na Figura 2. No vetor tipo 3, ocorre um único cromossomo (genoma) contendo um único gene o qual recebe insertos de DNA exógeno e codifica apenas um tipo da proteína PIII. Similarmente, no tipo 8 ocorre a expressão de peptídeos em cada cópia da pVIII. No vetor tipo 88, o genoma do fago carrega duas cópias do gene VIII, codificantes para dois diferentes tipos de molécula pVIII; um é recombinante e o outro é selvagem. O sistema 8+8 diferencia do sistema do tipo 88 no qual os dois genes VIII estão em genomas separados.

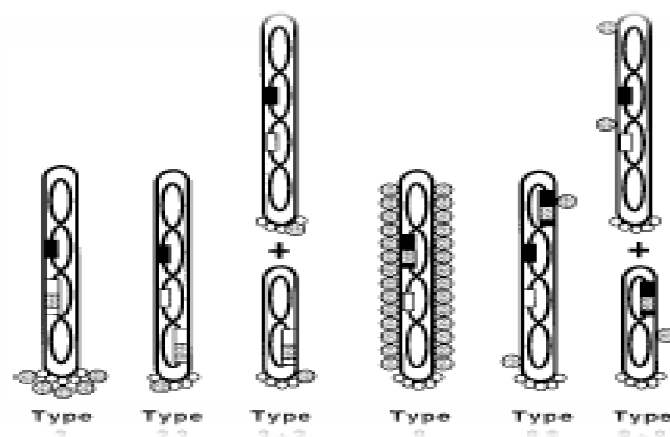


Figura 2 - Tipos de sistemas de *Phage Display*. Os fagos estão representados pela estrutura vertical longa e oval e as estruturas curtas e verticais representam os fagomídeos. O DNA de fita simples está representado pelas linhas torcidas dentro dos vírios e os segmentos codificantes das camadas protéicas PIII e PVIII estão representados por retângulos pretos e brancos, respectivamente. A divisão dentro dos retângulos representa as seqüências codificantes exógenas dispostas dentro do gene codificante para as proteínas virais, e os círculos pontilhados na superfície viral representam os peptídeos especificados pelas seqüências codificantes. Os cinco círculos brancos representam o domínio N-terminal das cinco moléculas PIII.

#### Tipos de proteínas e peptídeos expressos na superfície viral

O tipo mais comum de expressão em fagos são as bibliotecas de peptídeos randômicos. Neste caso, o inserto de DNA é derivado a partir de oligonucleotídeos degenerados, os quais são sintetizados quimicamente pela adição de misturas de nucleotídeos (em vez de nucleotídeos únicos) em uma cadeia nucleotídica crescente. Na seqüência degenerada NNKNNKNNKNNK, por exemplo, cada N é uma equação molar de A, G, C, e T; cada K é uma mistura equivalente de G e T; cada NNK é uma mistura de 32 trincas que incluem códons para os 20 aminoácidos naturais; e uma seqüência completa de 12 bases é uma mistura equivalente de mais de milhões ( $32^4$ ) diferentes tipos moleculares codificando todos os 160000 ( $20^4$ ) resíduos possíveis. Os códons degenerados,

em contraposição a utilização de oligonucleotídeos degenerados, podem gerar seqüências com menor tendência de prevalência para determinados códons dos peptídeos randômicos. Uma biblioteca de peptídeos randômicos apresenta em torno de um bilhão de fagos suficientes para representar a maioria dos 64 milhões de uma biblioteca 6-mer, mas insuficientes para representar as  $3 \times 10^{19}$  possíveis combinações para 15-mers.

## Aplicações

### Mapeamento de epítomos e mimeticidade

---

Apesar da técnica de *Phage Display* ter sido primeiramente introduzida há aproximadamente 20 anos, as aplicações e desenvolvimento desta tecnologia estão apenas começando a ser exploradas. A utilização da tecnologia de *Phage Display* irá levar à produção de uma enorme gama de ligantes, incluindo proteínas tais como anticorpos recombinantes e peptídeos com especificidades pré-definidas. A seleção destas bibliotecas apresenta uma grande versatilidade para a obtenção de peptídeos específicos para anticorpos monoclonais e ou policlonais, reconhecedores de epítomos lineares contínuos ou descontínuos, assim como epítomos conformacionais e até mesmo epítomos não protéicos.

Um epítomo é o menor determinante na superfície de um ligante com o qual o receptor esteja relacionado, mantendo contato específico definido geometricamente e quimicamente. Caso o ligante seja uma proteína, O epítomo em alguns casos pode ser contínuo, compreendendo poucos aminoácidos críticos adjacentes na seqüência primária. Por exemplo, anticorpos específicos para epítomos contínuos em antígenos protéicos apresentam contatos de três a quatro aminoácidos críticos sobre um segmento de seis resíduos. Entretanto, mais freqüentemente, epítomos protéicos são mais complexos. Muitos são descontínuos os quais compreendem resíduos críticos que são distantes na seqüência primária, mas próximos na conformação nativa. Muitos epítomos, incluindo os descontínuos, são dependentes da conformação pela necessidade do contexto da estrutura protéica geral na formação de uma conformação adequada para a ligação.

Em diversos contextos é altamente desejável mapear os epítomos de uma região específica do ligante protéico natural. Caso o epítopo seja contínuo e não dependente de conformação, bibliotecas de peptídeos randômicos proporcionam uma maneira fácil e barata de alcançar este objetivo. O receptor (alvo biológico) é utilizado para selecionar peptídeos randômicos ligantes e as seqüências motivo nos peptídeos selecionados são comparadas as seqüências de aminoácidos críticos constituintes do ligante natural do alvo biológico, possibilitando o mapeamento de epítomos de uma região específica.

A seleção de peptídeos por afinidade biológica através da utilização de bibliotecas randômicas de peptídeos revela freqüentemente ligantes inesperados que não se alinham em epítomos lineares e também não apresentam seqüências conhecidas. Isto ocorre principalmente quando os epítomos naturais do receptor são de origem não protéica, descontínuos ou mesmo proteínas dependentes de conformação. O termo mimetopos refere-se a pequenos peptídeos que se ligam especificamente a um sítio de ligação do receptor e que mimetizam o epítopo natural sem apresentar similaridade com a seqüência natural de aminoácidos do alvo natural. Esta definição também abrange os casos em que o ligante natural não seja proteína. Mimetopos são usualmente de pouco valor para o mapeamento de epítomos naturais, mas apresentam importantes aplicações na área de vacinas.

#### Aplicações de mimeticidade de ligação

---

Em 1993 foi demonstrado que a mimeticidade de epítomos descontínuos era possível para peptídeos mimetopos. Este aspecto foi de crucial importância, uma vez que a maioria dos anticorpos reconhece e se liga aos epítomos descontínuos (epítomos conformacionais) (Marvin, 1994). Desta forma, mimetopos podem ser identificados sem informação prévia a respeito da especificidade dos anticorpos (Parmley e Smith, 1988; Parmley e Smith, 1989). O aspecto referente à conformação dos peptídeos foi de crucial importância pelo desenvolvimento de bibliotecas constritas (conformacionais). Os resíduos constantes foram incluídos nas bibliotecas randômicas, sendo freqüentemente resíduos de cisteínas, provocando nos peptídeos de toda a biblioteca uma dobra. Bibliotecas constritas apresentam uma estrutura com maior estabilidade e maior propensão para interagir com a molécula alvo (Felici et al., 1991).

## Caracterização de epítomos: Uma nova direção para o desenvolvimento de vacinas

---

Quando o receptor utilizado para uma seleção por afinidade é um anticorpo, os peptídeos selecionados a partir de bibliotecas de peptídeos randômicos são chamados miméticos antigênicos dos epítomos naturais correspondentes ao determinante antigênico que provoca a seleção específica. Quando esses peptídeos são usados para imunizar animais *naïve*, alguns são capazes de gerar novos anticorpos que apresentam reatividade cruzada com o epítomo natural, mesmo sem nunca haver contato prévio direto com o alvo (Pasqualini et al., 1995; Folgori et al., 1994; Meola et al., 1995). Tais peptídeos são considerados miméticos imunogênicos bem como miméticos antigênicos. A possibilidade do uso de peptídeos obtidos através do mapeamento de epítomos apresenta grande potencial para a confecção de vacinas sintéticas. Somente miméticos antigênicos e que também são miméticos imunogênicos apresentam potencial vacinal por serem protetores e um anticorpo gerado deve ser reativo com um epítomo natural no patógeno (Smith e Petrenko, 1997).

O *Phage Display* tem sido recentemente utilizado por pesquisadores para o desenvolvimento de vacinas contra muitas doenças. Os anticorpos têm sido encontrados após a vacinação com mimetopos em vários estudos objetivando proteção contra diversos agentes patológicos: HIV-1 (Scala et al., 1999; De Berardinis et al., 2000), hepatite viral do tipo B e C (Puntoriero et al., 1998), doença de Alzheimer (Frenkel Solomon, 2002), imunoterapias de alergias (Cramer, 1993 ; McConnell et al., 1994), entre outros.

Uma especial aplicação desta metodologia para animais de médio porte foi realizada por Manoutcharian et al, (2004). Os autores utilizaram pela primeira vez fagos recombinantes como vacinas em suínos e verificou a capacidade de indução de resposta imune por fagos contendo peptídeos recombinantes da *Taenia solium*, agente causador da cisticercose em humanos.

Estes trabalhos demonstram que o perfil antigênico completo de um organismo pode ser obtido através de seleções de bibliotecas de peptídeos expressos em fagos e revelam o potencial da utilização de fagos expressando epítomos como vacinas.

A identificação e caracterização dos epítomos capazes de gerar resposta imune contra os carrapatos possibilitam a utilização de peptídeos recombinantes ou mesmo sintetizados quimicamente objetivando fins vacinais. Assim, trabalha-se apenas a região imunogênica do antígeno, sendo desnecessária a utilização da proteína completa. Além disso, estas vacinas apresentam algumas características desejáveis como alto grau de pureza, caracterização química conhecida, ausência de contaminantes, produção em larga escala, fácil armazenagem devido à alta estabilidade, ausência de enzimas proteolíticas, baixo custo (Patarroyo et al., 2002).

Pela utilização de uma metodologia rápida, eficiente e capaz de fornecer novos antígenos protetores, o presente trabalho descreve uma série de procedimentos técnicos *in vitro* e *in vivo* que culminaram com a seleção de peptídeos epítomos específicos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, que podem propiciar um avanço significativo na pesquisa de vacinas com potencial aplicação no controle efetivo deste parasito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Almazan, C.; Blas-Machado, U.; Kocan, K.M.; Yoshioka, J.H.; Blouin, E.F.; Mangold, A.J.; de la Fuente, J. Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. *Vaccine*, v.23, p.4403–4416, 2005a.
- Almazan, C.; Kocan, K.M.; Bergman, D.K.; Garcia-Garcia, J.C.; Blouin, E.F.; de la Fuente, J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine*, v.21, p.1492–1501, 2003.
- Almazan, C.; Kocan, K.M.; Blouin, E.F.; de la Fuente, J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*, v.23, p.5294–5298, 2005b.
- Andreotti, R. A synthetic BmTi n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection. *Experimental parasitology*, v. 116, p.66-70, 2007.
- 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.

- Barker, S.C. e Murrell, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. *Experimental and Applied Acarology*, v.28, p.55–68, 2002.
- Barros, A.T.M. e Evans, D.E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovinos, *B. microplus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira, Seropédica*, RJ, v.9, n. 1/2, p.17-21, 1989.
- Benhar, I. Biotechnological applications of *Phage* and cell display. *Biotechnol. Adv.* V.19(1), p.1-33, 2001.
- 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.
- 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.
- Cramer, R.; Suter, M. Display of biologically active proteins on the surface of genetic information responsible for their production. *Gene*, v.137, p.69-75, 1993.
- Da Silva Vaz Junior, Martinez, R.H.; Oliveira, A.; Heck, A.; Logullo, C.; Gonzales, J.C.; Dewes, H.; Masuda, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet. Parasitol.* p.62, v.155-160, 1996.

- Dalton, J.P.; Mulcahy, G. Parasite vaccines-a reality? *Veterinary Parasitology*, v.98, p.149–167, 2001.
- Davis, G.P. Genetic parameters for tropical beef cattle in northern Australia a review. *Aust. J. Agric. Res.*, v.44, p.179, 1993.
- De Berardinis, P.; Sartorius, R.; Fanutti, C.; Perham, R.N.; Del Pozzo, G.; Guardiola, J. *Phage Display* of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses, *Nat. Biotech.*, v.18, p.873-876, 2000.
- De la Fuente, J.; Kocan, K.M. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Expert. Rev. Vaccines*, v.2, p.583–593, 2003.
- De Rose, R.; McKenna, R.V.; Cobon, G.; Tennent, J.; Zakrewski, H; Gale, K.; et al. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. *Vet. Immunol. Immunopath.* V.71, p.151-60, 1999.
- 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.
- 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.
- Felici, F.; Castagnoli, L.; Musacchio, A.; Jappelli, R.; Cesareni, G. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.*, v.222, p.301-310, 1991.
- 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.
- Folgori, A.; Tafi, R.; Meola, A.; Felici, F.; Galfre, G.; Cortese, R.; Monaci, P.; Nicosia, A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera, *EMBO J.* v.13, p.2236-2243, 1994.
- Fortes, E. *Parasitologia Veterinária*. Porto Alegre, Sulina, edição , 453p., 1987.
- 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.
- 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.
- Furlong, J.; Martins, J.R.; Prata, M.C.A . Controle estratégico do carrapato dos ovinos. *A Hora Veterinária*, v.23, n.137, p. 53-56, 2004.
- 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, J. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*. v.18, n.21, p.2275-87, 2000.
- 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.

Gonzales, J. C. Parasitologia Veterinária Moderna. 1.ed. Passo Fundo: Editora Universidade de Passo Fundo, v.2. 127p. 2002a.

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

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

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

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 on the parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). Aust J. Zool, v.3, p.145–55, 1955.

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

Imamura, S.; da Silva Vaz Junior, I.; Sugino, M.; Ohashi, K.; Onuma, M. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. Vaccine. V.23(10), p.1301-11, 2005.

- Jenner, E., An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, a Disease Known by the Name of Cow Pox, 1878.
- Johnston, L. A.; Kemp, D. H.; Pearson, R. D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on ticks populations. Int. J. Parasitol., v.16, n.1, p.27-34, 1986.
- Kocan, K.M.; Manzano-Roman, R.; de la Fuente, J. Transovarial silencing of the subolesin gene in three-host ixodid tick species after injection of replete females with subolesin dsRNA. Parasitology Research, v.100(6), p.1411-1415, 2007.
- Lee, R.P. e Opdebeeck, J.P. Isolation of protective antigens from the gut of *Boophilus microplus* using monoclonal antibodies. Immunol. V.72, p.121-126, 1991.
- Legg, J. Some observations on the life history of the cattle tick (*Boophilus australis*). Proc. R. Soc. Queensland, v. 41, p.121-132, 1930.
- Lino, G.R.; Goulart, L.R. Clonagem e seqüenciamento de um fragmento gênico, obtido por AFLP, de uma provável ciclina de *Boophilus microplus* resistentes a carrapaticidas. Bioscience Journal, v.19, n.3, 2003.
- 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.
- Logullo, C.; Moraes, J.; Dansa-Petretski, M.; Vaz, I.S.; Masuda, A.; Sorgine, M.H.; Braz, G.R.; Masuda, H.; Oliveira, P.L. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.32(12), p.1805-1811, 2002.

- 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.
- Madalena, F.E.; Teodoro, R.H.; Lemos, A.M.; Oliveira, G.P. Causes of variation of field burdens of cattle ticks (*B. microplus*). Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, v.VIII, n.2, p.361-75, 1985.
- Manoutcharian, K.; Diaz-Orea, A.; Gevorkian, G.; Fragoso, G.; Acero, G.; Gonzalez, E.; Aluja, A.; Villalobos, N.; Conde, E.G.; Sciutto, E. Recombinant bacterio*Phage* -based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2004.
- Marvin, D.A.; Hale, R.D.; Nave, C.; Helmer-Citterich, M. Molecular models and structural comparisons of native and mutant class I filamentous bacterio*Phage* s Ff (fd, f1, M13), If1 and IKE. J Mol Biol, v.235(1), p.260–286, 1994.
- May, R.M. Parasitic infections as regulators of animal populations. Am. Scient., v. 71, p. 36-45, 1983.
- Maya-Monteiro, C.M.; Daffre, S.; Logullo, C.; Lara, F.A.; Alves, E.W.; Capurro, M.I.; Zingali, R. Almeida, I.C. Oliveira, P.I. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. J Biol Chem., v.275, p.36584-36589, 2000.
- McConnell, S. J.; Kendall, M. L.; Reilly, T. M.; Hoess, R. H. Constrained peptide libraries as a tool for finding mimotopes. Gene, v.151, p.115-8, 1994.
- 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. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous *Phage* . J. Immunol. v.154, p.3162-3172, 1995.

- 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.
- Mulenga, A.; Sugimoto, C.; Sako, Y.; Ohashi, K.; Musoke, A.; Shubash, M.; Onuma, M. Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infect Immun.*, v.67, p.1652–1681, 1999,
- Nijhof, A.M.; Taoufik, A.; de la Fuente, J.; Kocan, K.M.; de Vries, E.; Jongejan, F. Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference *International Journal for Parasitology*, v.37(6),p.653-662, 2007.
- Nuñez, J.L.; Cobeñas, M.E.M.; Moltedo, H.L. *Boophilus microplus*, La garrapata comum del ganado vacuno. Hemisfério Sur 1a Ed. Bs. Rep. Argentina, 184p., 1982.
- Nuttall, P.A.; Trimnell, A.R.; Kazimirova, M.; Labuda, M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*, v.28, p.155–163, 2006.
- 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.F.; Smith, G. P. Antibody-selectable filamentous fd *Phage* vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, v.73, p.305-318, 1988.
- Parmley, S.F.; Smith, G.P. Filamentous fusion *Phage* cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. *Adv Exp Med Biol.*, v.251, p.215-8. 1989.
- Pasqualini, R.; Koivunen, E.; Ruoslahti, E. A peptide isolated from *Phage Display* libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J. Cell Biol.* V.130, p.1189-1196, 1995.

- 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, C.D.; Souza, G.R.L.; Franco, M.M; Kerr, W.E. Identificação de mutações no gene do canal de sódio associadas a resistência em *Boophilus microplus* por RT-PCR assimétrico de baixa estringência. *Bioscience Journal*, v.20, n.2, 2004.
- Pereira, M.C. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): revisão taxionômica e morfobiológica. Dissertação de Mestrado, USP, São Paulo, 123p., 1980.
- 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.
- 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.
- Renard, G.; Garcia, J.F.; Cardoso, F.C.; Richter, M.F.; Sakanari, J.A.; Ozaki, L.S. *Insect Biochem. Mol. Biol.* v.30, p.1017-1026, 2000.
- RIBEIRO, J.M. Role of saliva in tick/host interactions. *Expl Appl Acarol.*, 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.
- Roberts, J.A. Acquisition by the host of resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). Journal Parasitol. v.54(4), p.657-62, 1968.
- 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. Sêmina, v.6, n.2, p.69-74, 1985.
- 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.
- Ruiz, L.M. Immune response in mice and cattle after immunization with a *Boophilus microplus* DNA vaccine containing bm86 gene. Veterinary Parasitology, v.144, p.138–145, 2007.
- Scala, G.; Chen, X.; Liu, W.; Telles, J.N.; Cohen, O.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.
- 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.
- Seixas, A.; Dos Santos, P.C.; Velloso, F.F.; Da Silva, Vaz I. Jr.; Masuda, A.; Horn, F., Termignoni, C. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. Parasitol. v.126, p.155-1563, 2003.

- 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.
- 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.
- 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.
- Sorgine, M.H.; Logullo, C.; Zingali, R.B.; Paiva-Silva, G.O.; Juliano, L.; Oliveira, P.L. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus* . J. Biol. Chem., v.275, p.28659-28665, 2000.
- Spinosa, H.S.; Górniak, S.L.; Bernardi, M.M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A, 2ª 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.
- 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*. J. Agric. Res. v.34, p.329-39, 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.; Smith, D.; Kemp, D. H. Vaccination against ticks. In: Yong, W. K. *Animal parasite control using biotechnology*. Boca Raton: CRC Press, p.303-331, 1992.
- 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<sup>a</sup> ed, 482p., 2000.
- Toro-Ortiz, R.D.; DA Silva vaz JR., I.; Gonzales, J.C. ; Masuda, A. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. *Vet. Parasitol.*, v.69, p.297-306, 1997.
- Trimnell, A.R.; Davies, G.M.; Lissina, O.; Hails, R.S.; Nuttall, P.A. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*, v.23, p.4329–4341, 2005.
- Trimnell, A.R.; Hails, R.S.; Nuttall, P.A. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine*, v.20, p.3560–3568, 2002.
- Tsuda, A.; Mulenga, A.; Sugimoto, C.; Nakajima, M.; Ohashi, K.; Onuma, M. cDNA cloning, characterization and vaccine effect analysis of *Haemaphysalis longicornis* tick saliva proteins. *Vaccine*, v.19, p.4287–4296, 2001.
- 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.
- Vaz Junior, I. da Silva; Logullo, C.; Termignoni, C.; Lagerblad de Oliveira, P.; Masuda, A. Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG, 2004.
- 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.
- Veríssimo, C.J. Relatório de estágio sobre o carrapato *Boophilus microplus*. Zootecnia, v.25, n.4, p.295-332, 1987.
- Wagland, B.M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos Indicus*) cattle. I Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20.000 larvae. Aust. J. Agric. Res. v.26, p.1073–80, 1975.
- Walker, A.R. Estudios inmunologicos em relación al control de garrapatas. In: Semin. Intern. Med. Bovina 4, Memorias, p.80-87, 1987.
- Wang, H.; Nuttall, P.A. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite, Cell Mol. Life Sci., v.56, p.286–295, 1999.
- Wang, Y.S.; Fan, H.J.; Li, Y.; Shi, Z.L.; Pan, Y.; Lu, C.P. Development of a multi-mimotope peptide as a vaccine immunogen for infectious bursal disease virus. Vaccine, v.25, p.4447–4455, 2007.
- Weiss, B.L.; Kaufman, W.R. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.101, p.5874–5892, 2004.
- Wharton, R.H. Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. In: PAL, R. & Wharton, R.H. Control of arthropods of medical and veterinary importance. Plenum Press, London, 1974.

- 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.
- 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. Anti-tick vaccines, Parasitology, v.129:S1–S2, 2004.
- 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.; Kemp, D.H. Vaccination with concealed antigens for tick control. Parasitology Today, v.4, p.196-198, 1988.
- You, M.J. Immunization of mice with recombinant P27/30 protein confers protection against hard tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) infestation. J Vet Sci. V.6(1), p.47-51, 2005.

## OBJETIVOS

---

### Geral:

---

- Seleção e a caracterização de peptídeos recombinantes obtidos a partir da seleção em bibliotecas de *Phage Display* para o desenvolvimento de peptídeos epítomos específicos do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

### Específicos:

---

- Produção e caracterização dos anticorpos policlonais IgY de galinhas imunizadas com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.
- Seleção das bibliotecas de *Phage Display* contra o alvo biológico.
- Caracterização das seqüências dos clones de fagos por *in silico*, antigenicidade e imunogenicidade.
- Determinação do reconhecimento imune humoral e celular em animais infestados naturalmente com carrapatos.
- Projeto, síntese, expressão e purificação de proteínas recombinantes multi-epítomos expressadas em *E. coli*.

*Capítulo único*

**DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES EPÍTOPOS  
ESPECÍFICOS DO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SELECIONADOS  
POR BIBLIOTECAS DE *PHAGE DISPLAY***

---

## RESUMO

---

Os carrapatos tem provocado significativas perdas econômicas na produção animal mundial na ordem de bilhões de dólares anuais. Embora vários antígenos específicos tenham sido empregados em testes vacinais, nenhum tem propiciado controle eficaz, sendo necessária a identificação de novos antígenos, bem como de novas estratégias vacinais. A tecnologia de Phage Display tem sido amplamente empregada no mapeamento de estruturas antigênicas as quais tem servido como base para o desenvolvimento de vacinas moleculares e representa uma alternativa as metodologias tradicionais. No presente trabalho, utilizou-se a tecnologia para o mapeamento de epítomos do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e, para validar os peptídeos selecionados como potencial imunógenos, foi adotado um processo com múltiplas etapas de caracterização dos clones previamente aos ensaios clínicos. Esta estratégia foi estabelecida com o objetivo de reduzir o número de clones a ser testados em bovinos como imunógenos candidatos. Foram utilizadas para a seleção seis bibliotecas distintas de peptídeos randômicos expressados em bacteriófagos filamentosos e sete estratégias de seleção contra as imunoglobulinas (IgY) purificadas de soro hiperimune de galinhas imunizadas com proteínas totais de larvas e adultos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. As seqüências do DNA correspondente aos insertos dos fagos selecionados foram seqüenciados, traduzidos e analisados por análises *in silico*. Foram realizados testes de ELISA, *Dot-Blot*, imunização em camundongos, determinação da resposta imune humoral de bovinos naturalmente infestados, e a medição da hipersensibilidade cutânea com o objetivo de evoluir o potencial destes fagotopos como candidatos efetivos a novos imunógenos. Foram gerados 107 peptídeos distintos em um total de 281 seqüências, sendo alguns destes similares às seqüências protéicas lineares do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Os peptídeos sem similaridades significativas com proteínas conhecidas, mas que apresentaram seqüências consenso entre os peptídeos obtidos, foram agrupados e classificados como epítomos conformacionais ou considerados como mimetopos de antígenos protéicos desconhecidos do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Entre os clones testados por *Dot-Blot*, os 40 mais reativos foram posteriormente testados em ensaios de imunização em

camundongos e também submetidos ao reconhecimento humoral de bovinos naturalmente infestados com carrapatos. Adicionalmente, utilizou-se o teste cutâneo de hipersensibilidade para a análise da imunidade celular. Os soros de camundongos imunizados com os clones de fagos foram reativos as proteínas de carrapato indicando que os fagotopos foram capazes de gerar resposta imune antígeno específica, embora nem todos os fagos fossem reconhecidos pelo soro de animais naturalmente infestados (*Bos taurus* e *Bos indicus*). Após a caracterização e validação, quatro fagotopos foram escolhidos para a realização dos testes cutâneos, os quais apresentaram graus variados de reatividade. Uma das vantagens da utilização do vírus M13 recombinante, contendo o peptídeo recombinante fusionado na proteína PIII do vírus, é que o próprio capsídio atua como adjuvante e pode ser testado diretamente após a seleção sem procedimentos adicionais de preparo do antígeno. Finalmente, as seqüências determinadas foram utilizadas para a produção e expressão de um sistema recombinante de múltiplos antígenos peptídicos (MAPS). Foram escolhidos 10 peptideos para a expressão na forma de multi-epitopos, os quais serão futuramente utilizados em ensaios clínicos. O presente trabalho demonstrou que um perfil geral dos epítomos pode ser obtido através da utilização de bibliotecas de peptídeos randômicos expressados em bacteriófagos filamentosos contra anticorpos obtidos de soro hiperimune e revela o potencial da seleção e utilização peptídeos epítomos específicos como potenciais vacinas recombinantes multi-antigênicas para o controle do carrapato bovino.

Palavras-Chave: Epítomos, *Phage Display*, Vacinas, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

## ABSTRACT

---

### DEVELOPMENT OF EPITOPE SPECIFIC RECOMBINANT PEPTIDES OF THE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SELECTED BY PHAGE DISPLAY LIBRARIES

---

Ticks are implicated in serious economic losses to animal production worldwide in the order of billions of dollars. Although many antigens have been in vaccine tests, none has been effective in the control of ticks, which justifies the development of new antigens as well as new vaccine strategies. *Phage Display* techniques have been widely employed to map epitope structures, which have served as the basis for developing molecular vaccines. In the present study, we have applied this technique to map specific epitopes of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and to validate the peptides as potential immunogens, we have adopted a process of selection prior to final field tests. This strategy was established in order to reduce the number of clones to be tested in the field. Six *Phage* -displayed random peptide libraries were selected with seven different strategies against the purified hyperimmune serum of chickens (IgY) that were immunized with total proteins of larvae and adults of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. The selected *Phage* clones were sequenced, translated and analyzed through bioinformatics. To evaluate the potential of these phagotopes as effective candidate vaccines, ELISA assays, dot-blot, mice immunization (MI), humoral immune response (HIR) of cattle against the clones and a cutaneous hypersensitivity tests in cattle were performed. The selected *Phage* clones were analyzed through bioinformatics, generating 107 different peptides in a total of 281 sequences. Some selected phagotopes showed excellent matches with linear sequences of known proteins of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Peptides that did not present significant matches with known proteins, but shared extensive homology among each other, were clustered and classified as conformational epitopes of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, or considered as mimotopes of unknown proteic antigens. Among all clones tested by dot-blots, the 40 most reactive ones were further screened by HIR and MI. The mice sera raised against the *Phage* clones clearly recognized tick proteins indicating that the phagotope-induced immune responses were antigen-specific, but not all could be identified by the sera of naturally

infested cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). Four clones were then selected to go through the cutaneous hypersensitivity tests, and apparently all of them were effective at different degrees. The stringent selection processes coupled with this scheme of validation assays allowed us to narrow down the number of peptides that should be tested in the field. One of the advantages of using whole recombinant M13 virus, carrying the recombinant peptide in fusion with the pIII protein of the virus, is that its capsid acts as adjuvant and could be tested directly without any further mixture. Additionally, we have finally used anergy skin tests (cutaneous hypersensitivity tests) once they are sometimes used to guide clinical decisions. We have assumed that cutaneous hypersensitivity tests measure a common property of cellular immune function relevant to the outcome, which together with the humoral response in naturally infested animals may provide us with sequences of peptides that may be relevant as vaccines. Finally, we have used those sequences to produce multiple antigen peptide system (MAPS), which will be used in future field tests. The present work demonstrates that the whole epitope profile can be obtained through screening the *Phage Displayed* peptide libraries with the hyperimmune serum and reveals the potential of using epitope-displaying *Phage*s as peptide vaccines against ticks.

**Keywords:** Epitopes, *Phage Display*, vaccines, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

## INTRODUÇÃO

---

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um dos artrópodes mais importantes parasitas de bovinos. Este parasitismo causa grandes perdas econômicas na pecuária da América do Sul, Central e Oceania. As perdas são decorrentes dos efeitos diretos, tais como a ingestão de sangue e a espoliação, e indiretos, como a transmissão de agentes patogênicos para os bovinos (Horn e Artech, 1984).

Os métodos utilizados para o tratamento e controle das infestações por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* podem ser divididos em biológicos e químicos. A aplicação de produtos químicos, o método mais utilizado, tem como desvantagens a seleção de parasitas resistentes aos produtos acaricidas e a presença de resíduos nos produtos de origem animal destinados ao consumo humano. Uma alternativa para o uso de produtos químicos é o método biológico, especialmente o uso de vacinas. Várias são as vantagens das vacinas em relação aos químicos: são livres de resíduos específicos, apresentam menor possibilidade de seleção de parasitas resistentes e o processo de desenvolvimento pode ser mais barato do que muitos químicos (Willadsen, 1997).

Nos últimos anos algumas vacinas com eficácia parcial foram baseadas em um antígeno denominado Bm86 presente no tubo digestivo de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Willadsen et al., 1989; Gough e Kemp, 1993, Rodríguez et al., 1995 e Patarroyo et al., 2002). O estudo com os antígenos de carrapato têm demonstrado a sua melhor eficácia contra esta espécie quando combinado com produtos químicos (Redondo et al., 1999) ou mesmo a associação de múltiplos antígenos para a constituição de uma vacina efetiva (Willadsen, 2004; Nuttall et al., 2006). Determinados antígenos desenvolvidos para o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ou espécies correlacionadas estão em fase de testes e apresentam ser promissores (Almazan et al., 2005; De La Fuente e Kogan, 2003; Andreotti et al. (2002); Nascimento-Silva et al. 2008; Patarroyo et al., 2002).

Desta forma, para melhorar o controle por meio de vacinas e excluir a associação ao tratamento químico, torna-se importante a investigação e

caracterização de novos antígenos que apresentem proteção significativa (Garcia-Garcia et al., 1999).

A metodologia do *Phage Display* pode servir como uma ferramenta útil para o desenvolvimento de novas vacinas por meio da obtenção de mimetopos baseadas em peptídeos recombinantes obtidos após a seleção de bibliotecas combinatórias de peptídeos e ou mesmo anticorpos (Benhar 2001; Irving et al., 2001). A técnica é uma forma de seleção em que uma biblioteca de peptídeos ou proteínas com as seqüências aleatórias são expressas no exterior da partícula viral, enquanto o material genético codificante para cada resíduo encontra-se no genoma viral. 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 (Noren e Noren 2001; Barbas et al., 2001).

A imunização com fagos recombinantes poderia induzir respostas imunitárias de anticorpos contra o peptídeo expressado no fago e apresentar reação cruzada contra o antígeno original do alvo biológico, o que indica que os mimetopos poderiam ser usados como candidatos de uma nova geração de vacinas moleculares, mesmo sem a necessidade de conhecimento prévio do antígeno (Meola et al., 1995; Bastien et al., 1997; Rudolf et al., 1998). A seleção e uso de peptídeos epítomos específicos (ou seja, fagotopos) como vacina tornou - se uma estratégia promissora em diversos trabalhos (Wang et al 2007; Yang et al., 2005; Manoutcharian et al., 2004; Yang e Shiuan, 2003).

A estratégia de desenvolvimento de peptídeos vacinais (fagotopos) ainda não foi reportada no desenvolvimento de antígenos vacinais para carrapatos. Neste trabalho, foram exploradas diversas estratégias de seleção de fagotopos por bibliotecas de *Phage Display* objetivando o mapeamento e a constituição de um banco de peptídeos epítomos específicos do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Os clones de fagos foram testados *in vitro* e *in vivo* para determinação do potencial destes antígenos na constituição de uma futura vacina recombinante poli-imunogênica.

## MATERIAL E MÉTODOS

---

### Anticorpos

---

#### *Preparação dos antígenos*

---

Para a obtenção do inóculo a ser utilizado nas imunizações, as proteínas totais foram isoladas de larvas (1 dia) e teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por uma breve maceração em nitrogênio líquido e acrescentado éter etílico para o desengorduramento das proteínas durante 18 horas. Para obtenção do tecido do intestino, aparelho reprodutor e aparelho bucal de teleóginas foi realizado lavagens seriadas do tecido e foi adicionado tampão de extração no macerado (40mM Hepes pH 7,4, 10mM EDTA, 2mM EGTA, 1mM DTT, 1mM Benzamidina, 0,5mM PMSF) e centrifugado por 40 minutos a 4000g. O sobrenadante foi colhido e dialisado extensivamente em PBS, sendo posteriormente quantificado por Bradford e verificado o perfil protéico por SDS-PAGE (10%).

#### *Preparação e caracterização dos anticorpos policlonais*

---

Foram utilizadas para a imunização, galinhas de três semanas de idade, da raça White-Leghorn. 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 e teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, por via intramuscular, em intervalos de 14 dias para cada dose. A primeira dose continha adjuvante completo de Freund (*Sigma Chemical Co, USA*) e as doses subseqüentes adjuvante incompleto de Freund (*Sigma Chemical Co, USA*). Os animais imunizados foram sangrados a partir da terceira dose e avaliados quanto à produção de anticorpos pelo método ELISA.

Para o ensaio Imunoenzimático (ELISA), placas de microtitulação de alta afinidade (*NUNC*) foram sensibilizadas com 10 µg de proteínas totais de larvas e teleóginas de carrapato, diluídas em tampão carbonato/ bicarbonato, durante toda a noite a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com PBST, com leite em pó desnatado a 5% (bloto), para adição das amostras de soro das galinhas antes

e após as imunizações e incubadas por 60 minutos a 37°C. Após esse período, as placas foram lavadas e adicionados anticorpos secundários (IgG de coelho anti IgY de galinha) diluído em bloto 5%, durante 60 minutos. O conjugado imunoenzimático [IgG de cabra anti-IgG de coelho ligado à peroxidase (*Sigma Chemical Co, USA*)] 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, o sangue e também os ovos das galinhas inoculadas com os antígenos foram coletados para a obtenção de imunoglobulinas policlonais.

As IgYs específicas para proteínas de larvas e carrapatos adultos (teleóginas) foram obtidas a partir do soro e dos ovos. As IgYs dos ovos foram concentradas inicialmente pelo método de diluição em água e posteriormente, precipitadas por sulfato de amônio em salina. Realizou-se também em seguida a cromatografia em DEAE-Sephacel (tampão 0,02M Tris-HCl, pH 4,5) e as frações contendo IgY foram liofilizadas e armazenadas a 4°C. A purificação de IgY a partir do soro e dos ovos de galinhas foram também realizadas com o uso da coluna *HiTrap IgY Purification HP, 5 mL (Amersham Biosciences)*. Foi utilizado um sistema completo de cromatografia líquida modelo *Akta Purifier (Amersham Bioscience)*. O sistema foi preenchido com tampão de eluição ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, pH 7.5), e então conectada à coluna. A coluna foi lavada com 5 volumes (25 mL) de cada tampão: ligação ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,5 M, pH 7.5), eluição e limpeza ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, 30% volume/volume de isopropanol, pH 7,5). Em seguida a coluna foi equilibrada com 5 volumes de tampão de ligação, e foi injetada amostra. A coluna foi lavada com 10 volumes da mesma (50 mL) de tampão de ligação. As IgY foram então eluídas com 10 volumes da coluna de tampão de eluição, sendo coletadas amostras de 1 mL que foram quantificadas no espectrofotômetro à 280 nm. A resina foi regenerada com 8 volumes (40 mL) de tampão de limpeza, e reequilibrada com 5 volumes de tampão de ligação. À medida que as amostras eram eluídas na resina de purificação, as leituras ópticas ( $\text{OD}_{280\text{nm}}$ ) das frações eram obtidas.

Para diálise das amostras obtidas foi utilizada uma membrana de celulose *Fisherbrand® (regenerated cellulose-DYALYSIS tubing)*. As amostras purificadas foram colocadas em tubos de diálise (tubos 1 a 8), concentradas em sacarose por 1 hora a 4°C e em seguida dialisadas em PBS (solução tampão fosfato salina: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, pH 7.4) por 12 horas a 4°C. As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro à 280nm.

Para averiguar a qualidade das amostras de IgYs purificadas foi utilizado SDS-PAGE (16%). O tampão da amostra continha 1% SDS, 1% Tris pH 6,8, azul de bromofenol 0,02% e 20% glicerol, contendo ou não agentes redutores. A 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, com voltagem de 100V. Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi colocado em uma solução de azul de Coomassie R-250 como corante de proteínas.

Para a análise de Western Blotting das proteínas totais de larvas e teleóginas de carrapato, realizou-se a eletroforese (SDS-PAGE, 16%) e a eletrotransferência das proteínas do gel em membrana de nitrocelulose (NC, *Sigma*) de acordo com as técnicas descritas por Sambrook, et al. (1989), com algumas modificações. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada por bloto 5% e incubada com os anticorpos purificados (IgY) diluídos em bloto 5% durante toda a noite a 4°C. Anticorpos de coelhos anti IgY diluídos em bloto 5% foram incubados em temperatura ambiente durante duas horas. Por fim, anticorpos de cabra anti IgGs de coelhos marcados com a fosfatase alcalina foram incubados durante 2 horas em temperatura ambiente e a reatividade específica foi determinada pela adição de substrato [NBT/BCIP].

#### Seleção Biológica (*Biopanning*)

---

Para a obtenção dos mimetopos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, foram utilizadas 6 bibliotecas distintas, construídas a partir destes fagos filamentosos, compreendendo 3 vetores diferentes (M13, fUSE e f88) (Figura 3).

As bibliotecas expressas em fagos M13 filamentosos (*New England Biolabs*) são compostas por peptídeos randômicos seguidos por uma curta sequência espaçadora Gly-Gly-Gly fusionada à região N - terminal da proteína capsídica menor (Proteína III). A biblioteca Ph.D.12 mer e a biblioteca Ph.D.7 cys

apresentam 12 e 7 peptídeos aleatórios, respectivamente. A biblioteca Ph.D.7cys contém peptídeos cíclicos enquanto a Ph.D.12mer são linearizados pela delimitação por cisteínas nas extremidades peptídicas. Estas bibliotecas consistiam de aproximadamente  $2,8 \times 10^{11}$  clones independentes, os quais representam as  $1,9 \times 10^9$  possíveis combinações de resíduos de aminoácidos. Todas as cinco cópias da proteína III capsídica dos fagos contém peptídeos randômicos aminoterminais (Noren e Noren, 2001).

Foram utilizadas 4 bibliotecas compreendendo os vetores f88 (f88 15 mer, f88 cys 3, f88 cys 6) e o vetor fUSE (fUSE 6 mer), cedidas gentilmente pelo Smith Lab., sendo os peptídeos das bibliotecas f88 15 mer, f88 cys 3, f88 cys 6 expressos na PVIII e os peptídeos da biblioteca fUSE 6mer expressos na pIII. Os vetores f88 15 mer e fUSE expressam peptídeos lineares e os vetores f88 cys 3 e cys 6, expressam peptídeos cíclicos.

#### Tipos (88) de bibliotecas baseadas no vetor de fagos M13

##### Ph.D.-12mer™

```
NNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKGGTGGAGGT
NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMCCACCTCCA
X X X X X X X X X X X X X G G G
```

→ Start of mature peptide-pIII fusion

##### Ph.D.-C7C™

```
GCTTGTNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKTGCGGTGGAGGTTCG
CGAACANNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMACGCCACCTCCAAGC
A C X X X X X X X C G G G S
```

→Start of mature peptide-pIII fusion

#### Tipos (88) de bibliotecas baseadas no vetor de fagos f88-4

##### f88-4/15-mer; 9273 bases

```
NNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKCCCTGCAGAA
NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMGGACGTCTT
X X X X X X X X X X X X X X X P A E
```

→ Mature pVIII

##### f88-4/Cys3; 9273 bases

```
NNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKCCCTGCAGAA
NNMNNMNNMNNMNNMACANNMNNMNNMACANNMNNMNNMGGACGTCTT
X X X X X C X X X C X X X X P A E
```

→ Mature pVIII

##### f88-4/Cys6; 9279 bases

```
NNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKCCCTGCAGAA
```

NNMNNMNNMNNMACANNMNNMNNMNNMNNMNNMACANNMNNMNNMNNMGGACGTCTT  
 X X X X C X X X X X C X X X X P A E  
 → Mature pVIII

Tipos (88) de bibliotecas baseadas no vetor de fagos fUSE.

fUSE5/6-mer; 9225 bases  
 NNKNNKNNKNNKNNKNNKGGGGCCGCT  
 NNMNNMNNMNNMNNMNNMCCCCGGCGA  
 X X X X X X G A A  
 → Mature pIII

Figura 3 – Bibliotecas combinatórias de peptídeos randômicos utilizadas nos experimentos de seleção biológica.

### *Estratégias de seleção biológica*

Na seleção biológica por imunoafinidade foram utilizadas 7 estratégias distintas conforme a seguinte classificação:

Estratégia 1: Os anticorpos policlonais de galinhas foram submetidos a uma purificação por afinidade ao imunógeno de acordo com as técnicas descritas por Sambrook et al., (1989), com algumas modificações. Os extratos protéicos de teleóginas do carrapato foi adsorvido em uma membrana de nitrocelulose (Ge Healthcare) durante todo a noite à 4°C e posteriormente bloqu eada por leite em pó 5%, durante 1 hora a temperatura ambiente. A membrana contendo as proteínas foi incubada com a fração parcialmente purificada de IgY durante toda noite a 4°C e posteriormente lavadas com PBST uma vez e mais três vezes com PBS, monitoradas por leitura no espectrofotômetro no final da lavagem para averiguação do desprendimento de proteínas da membrana. Os anticorpos foram eluídos por 100mM de glicina pH 2.8, por 30 minutos e imediatamente após a eluição, foram neutralizados por 100mM de tris pH 8.0 e a concentração do eluído foi estimado por espectrofotometria (OD 280nm). Desta forma, com o objetivo de aumentar a especificidade da seleção dos peptídeos, as IgY policlonais utilizadas na seleção foram purificadas por afinidade contra as proteínas totais do parasito pela eluição da fração ligante. Por este método, apenas IgY específicas para o carrapato foram submetidas à seleção contra as bibliotecas de peptídeos randômicos.

Foram adsorvidos no orifício de uma placa de microtitulação de 96 poços (Maxisorp - Nunc) 150 uL de IgY policlonais anti proteínas totais de teleóginas

purificadas por afinidade ao imunógeno (100 ug/mL em 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.6), determinada por absorvância de UV em um comprimento de onda de 280 nm. O cálculo da concentração viral foi baseado na fórmula: a solução de anticorpos na concentração de 1 mg/ml da uma absorvância de 1,4 para IgY. As placas foram incubadas durante a noite a 4°C em um recipiente contendo papel toalha umidificado. A placa foi bloqueada com 250 uL de tampão de bloqueio (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.6, 5 mg/ml BSA) por 2 h a temperatura de 4°C. A placa foi lavada seis vezes com TBST (TBS contendo 0.1% Tween-20 v/v), foram acrescentados nos orifícios da placa 4 x10<sup>10</sup> fagos da biblioteca Ph.D.12 mer (*New England Biolabs*) diluídos em 100 uL 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 uL do tampão de eluição (0,2 M glicina-HCl, pH 2.2, contendo 1 mg/mL BSA) por 10 min a temperatura ambiente e imediatamente neutralizados com 15 uL do tampão de neutralização (1M Tris-HCl, pH 8.0). Alíquotas dos fagos eluídos foram utilizadas para a determinação da titulação. O eluato remanescente contendo fagos foi utilizado para a reamplificação, para a próxima passagem, pela infecção em *E. coli* ER2738. Foram realizadas três passagens para o enriquecimento dos fagos contendo os peptídeos ligantes.

Estratégia 2: Neste processo, foi utilizado a mesma biblioteca e o mesmo processo de seleção descrito anteriormente, exceto a alteração do alvo biológico pela adsorção em placas de ELISA (*Maxisorp - Nunc*) de IgY policlonais anti proteínas totais de larvas de carrapato de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* purificadas por afinidade ao imunógeno.

Estratégia 3: O processo foi semelhante ao anterior diferindo-se pela utilização da biblioteca Ph.D.7cys (*New England Biolabs*). A seleção ocorreu como na estratégia 1 tendo como diferença a eluição por competição e os anticorpos policlonais, como alvo biológico para seleção, não foram purificados por afinidade ao imunógeno.

Estratégia 4: Foi utilizada uma biblioteca linear f88-15 mer. Placas de microtitulação (*Maxisorp - Nunc*) foram sensibilizadas com estreptavidina por 1h 37°C e posteriormente bloqueadas por bloto a 37°C durante 1h. As IgYs foram

conjugadas com biotina, tanto as anti-larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, quanto as IgYs purificadas de soro pré imunes das galinhas utilizadas como controle negativo. Após 3 lavagens da placa com TBST, as IgYs purificadas de soro pré e pós imunes do grupo de animais imunizados com proteínas de larvas de carrapato foram adicionados em orifícios por 2h em temperatura ambiente, sob agitação. Após 6 lavagens com TBST, foi realizado a pré adsorção da biblioteca contra as IgYs pré-imunes por 1 h a 37 °C. O sobrenadante foi coletado e incubado posteriormente com as IgYs obtidas do soro pós imune (alvo biológico). Foram realizadas 4 seleções para obtenção do enriquecimento da sub-população de fagos.

Estratégias 5: A seleção ocorreu conforme a estratégia 3, exceto pela utilização da biblioteca Cys 3. Para esta biblioteca, o título de entrada foi de  $2 \times 10^{12}$  pv na primeira entrada e  $1 \times 10^{12}$  pv nas demais entradas para o novo ciclo de seleção.

Estratégias 6: Foi utilizada a biblioteca conformacional f88cys6. Neste caso, anticorpos de coelhos anti IgY foram adsorvidos em orifícios de uma placa de microtitulação (*Maxisorp - Nunc*) durante 1 hora a 37°C e bloqueada posteriormente com bloto 5% durante 1 hora a 37°C. Após as lavagens com TBST, o soro dos animais pré e pós imunes às proteínas de larvas de carrapato foram adicionados em orifícios separados para incubação por 2h em temperatura ambiente, sob agitação. Após 6 lavagens com TBST, foi realizado a pré adsorção da biblioteca contra as IgYs pré-imunes por 1 h a 37 °C. O sobrenadante foi coletado e incubado posteriormente com as IgYs obtidas do soro pós imune (alvo biológico). Foram realizadas 3 seleções para obtenção do enriquecimento da sub-população de fagos.

Estratégias 7: Metodologia distinta da utilizada na estratégia 5 no qual foi utilizada a biblioteca fUSE6mer. A eluição dos fagos ligantes ao alvo ocorreu através da competição com os antígenos totais em solução. Nesta seleção não foram realizados os passos de pre-adsorção da biblioteca contra soro negativo.

Para as bibliotecas do tipo Ph.D. (*New england Biolabs*), durante e após a seleção por imunoafinidade, a caracterização dos clones selecionados foi através do sistema de  $\alpha$ -complementação. O vetor de fago utilizado contém o gene lacZ, , permitindo que clones reativos sejam selecionados pela coloração das colônias (azuis positivas ou brancas negativas). O resultado se expressa por U.F.C.

(unidades formadoras de colônias). Para as demais bibliotecas as titulações ocorreram resistência aos antibióticos. Nestes caso, o resultado se expressa em T.U. (unidades transdutoras).

#### *Titulações e purificações dos fagos*

---

Para as titulações foi feito uma mistura de fago e bactérias em agarose na superfície, sendo plaqueada em meio LB contendo X-gal (40 ug/mL) e IPTG (0.5 mM). Durante as etapas, uma pequena amostra do eluato (10 µL) foi titulada e o remanescente foi utilizado para reamplificação, realizada em 20 mL de cultura de *E. coli* (ER2537) em fase inicial de crescimento ( $OD_{600} \leq 0,3$ ), contendo tetraciclina, incubando-se a cultura por 4-5 horas em agitador com temperatura a 37°C, antes do procedimento de precipitação dos fagos e posterior titulação.

A cultura foi transferida para um tubo *Oakridge* (*Hitachi*, 50 mL) e centrifugada (10 min, 11300G). As células residuais foram descartadas e o sobrenadante transferido para um tubo limpo e re-centrifugado. Foi pipetado 80% do sobrenadante para um tubo esterilizado onde foi adicionado 20% do volume de PEG/NaCl (20% peso/volume de Polietileno glicol-8000, NaCl 2,5M, água), e a mistura permaneceu em repouso por 12 horas a 4°C.

No dia seguinte, a precipitação foi centrifugada 15 minutos a 11300G à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi centrifugado brevemente, para que o sobrenadante residual pudesse ser removido. O precipitado foi ressuspensionado em 1,0 mL de TBS, transferido para um microtubo e centrifugado por 5 minutos, 11300G à 4°C para sedimentar os resíduos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo para a adição de PEG/NaCl (1/6 do volume). A mistura foi incubada em gelo por 1 hora e então centrifugada (10 min, 14000 r.p.m, 4°C). O sobrenadante foi descartado, e a centrifugação foi repetida para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi ressuspensionado em 200µL de TBS, obtendo-se então o eluato amplificado, pronto para a titulação.

Os fagos reamplificados a partir do primeiro ciclo de seleção foram utilizados em um segundo ciclo e assim subsequente, por um total de três ciclos, sendo que a partir do segundo ciclo a estringência do tampão de lavagem foi aumentada de 0,1% para 0,5% de Tween-20 em todas as lavagens.

Para todas as titulações foram utilizados 1 µL dos fagos, diluídos em 9,0

μL de meio de cultura LB. As diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ , para eluato não amplificado e de  $10^{-8}$  a  $10^{-11}$ , para fagos amplificados) foram incubadas com 200 μL de *E. coli* (ER2738) em fase de crescimento inicial por 5 minutos e plaqueadas em meio LB contendo IPTG (0,5 mM) e X-gal (40 μg/mL), juntamente com 3,0 mL de agarose Top (10 g de bacto-triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 1 g de MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O / litro).

Após a incubação em estufa por toda a noite à 37°C, as colônias azuis foram contadas para a obtenção dos títulos de entrada e saída para todos os ciclos de seleção (número de colônias azuis x fator de diluição).

As colônias que apresentaram coloração azul, demonstrando a hidrólise do substrato X-Gal e a expressão do gene da β-galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738, foram reamplificadas separadamente em placas *deepwell* para o armazenamento dos clones selecionados. Para isso, cada colônia isolada obtida do 4º ciclo não amplificado foi dispensada em um poço da *deepwell* contendo 1,0 mL de meio de cultura com *E. coli* em fase de crescimento inicial. A placa foi incubada por 12 horas à 37°C, sob agitação. A placa *deepwell* foi centrifugada por 60 minutos a 1,55g, para a retirada do sobrenadante da cultura. Seu conteúdo foi transferido para uma outra placa *Deepwell* e então foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de polietileno glicol-8000, NaCl 2,5 M) incubando-a por 12 horas à 4°C. A placa foi centrifugada por 1 hora a 1550g, o sobrenadante descartado, e o precipitado suspenso em 200 μL de PBS.

A amplificação dos fagos das bibliotecas expressas nos vetores Fd-tet de cada ciclo de seleção de *biopanning* foi iniciado pela adição 5 ml de uma cultura de *E. coli* K91 em fase exponencial de crescimento. Após uma incubação de 10 minutos a 37°C, a resistência a tetraciclina foi iniciada pela adição de 95 mL de meio LB contendo tetraciclina em uma concentração de 0.2 ug /mL por 30 minutos a 37°C, sob agitação de 250 r.p.m. A tetraciclina foi adicionada a uma concentração final de 15ug/mL. A propagação de células de bactérias infectadas foi realizada a 37°C, durante a noite com agitação de 250 r.p.m. Após 12 horas de crescimento, a suspensão de células de bactérias foi concentrada duas vezes (11300g e 22100g). Os fagos resultantes foram purificados do sobrenadante por precipitação em PEG-8000/NaCl (1/6 do volume) durante toda a noite a 4°C. Em uma segunda precipitação, o pellet diluído em TBS e PEG-8000/NaCl (1/6 do

volume) foi incubada em gelo por 2 horas e então centrifugada (10 min, 22100g, 4°C). O sobrenadante foi descartado e a centrifugação foi repetida para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de TBS, obtendo-se então o eluato amplificado pronto para a titulação.

A concentração de fagos (partículas virais por mL) foi determinada por absorbância de UV em um comprimento de onda entre 240 e 320 nm, tendo como ponto de absorção máximo a 269nm. O cálculo da concentração viral foi baseado na fórmula: partículas virais (p.v.) por mL =  $(A_{269} \times 6 \times 10^{16})$  / número de nucleotídeos no genoma do fago). O estoque final de fagos foi armazenado a 4°C em TBS. O eluato final foi titulado para fornecer colônias separadas para ser propagadas de forma independente.

#### *Seqüenciamento de DNA dos fagos*

---

Para a obtenção de DNA dos fagos, 10 µL dos fagos purificados em placa *deepwell* foram adicionados a 1 mL de cultura de ER2738 em fase de crescimento inicial em tubos Falcon de 15 mL, onde permaneceram sob agitação vigorosa por 20 horas à 37°C. Após o crescimento, as culturas foram transferidas para microtubos para a sedimentação das bactérias que foram centrifugadas por 10 minutos a 1550g. 500 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo, e acrescidos a este, 200 µL de PEG-NaCl, incubando o tubo em seguida à temperatura ambiente por 10 minutos. Após centrifugar por 10 minutos a 22100g, foi descartado o sobrenadante, e o precipitado foi ressuspensionado em 100 µL de Tampão Iodeto (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaI 4 M), e então foi adicionados 250 µL de etanol absoluto, incubando o tubo por 10-20 minutos à temperatura ambiente. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 22100g, descartando o sobrenadante, e em seguida, foi lavado o precipitado com 500 µL de etanol 70%, centrifugando mais uma vez por 10 minutos a 22100g. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em 20 µL de água ultra pura estéril.

O seqüenciamento foi realizado utilizando o kit DYEnamic™ ET dye termination (GE Healthcare, USA) e um seqüenciador automático *MegaBace 1000* (Amersham Biosciences). Para a reação do seqüenciamento, foi utilizado os *primers* M13 (5'-<sub>HO</sub>CCCTCATAGTTAGCGTAACG -3'- *invitrogen*), f88-4/15-mer (5'- <sub>HO</sub>AGAAGTCCGAAGACGATGA - 3' - *Invitrogen*) e fUSE5/6-mer (5'-

$\text{HO}$ GGAGTATGTCTTTTAAGT-3' - *Invitrogen*) que amplifica a região do DNA do fago correspondente aos insertos dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionados na proteína PIII.

A análise das seqüências de DNA provenientes do seqüenciador automático foi processada em *software* do próprio equipamento (*Sequence Analyser, Base Caller, Cimarron 3.12, Phred 15*). Logo após esta pré-análise, as seqüências dos vetores foram retiradas e somente aqueles insertos com resíduos perfeitos foram traduzidas.

#### *Análises in silico*

---

As seqüências de DNA geradas pelo seqüenciamento foram analisadas utilizando-se programas *in silico* disponíveis:

A tradução das seqüências de aminoácidos obtidas no seqüenciamento foi realizada pelo programa DNA2PRO7 (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro7.aspx>);

A população dos peptídeos foi caracterizada quanto à freqüência de aminoácidos pelo programa AAFREGS (<http://relic.bio.anl.gov/aafreqs.aspx>). Inicialmente, foi utilizado o programa AAFREQ (<http://relic.bio.anl.gov/aafreqs.aspx>) para o cálculo da freqüência dos aminoácidos dentro da população e também sua freqüência na respectiva posição predominante dentro do inserto recombinante, indicando quais aminoácidos foram super ou sub-representados.

Os motivos protéicos dos peptídeos foram gerados pelo MOTIF2 (<http://relic.bio.anl.gov/motif2.aspx>). O programa não permite substituições de aminoácidos conservativas, mas junções idênticas. É considerado um motivo conservado para os peptídeos alinhados quando é longo o suficiente para gerar uma estrutura secundária parcial. O programa MOTIF2 identifica motivos contínuos e descontínuos dentro de uma população de peptídeos.

O programa FASTAcom (<http://relic.bio.anl.gov/fastaconsen.aspx>) procura por similaridade entre seqüências consenso, podendo ser contínuas ou descontínuas, com múltiplas proteínas conhecidas do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* obtidas no *GENEBANK*. O número mínimo de identidade considerada válida é de três Aminoácidos para cada consenso.

A procura por similaridade entre seqüências peptídicas foi realizada pelo

programa *Clustal W* através de alinhamento múltiplo.

A procura por similaridade e motivos protéicos entre os peptídeos e proteínas do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi realizada em banco de dados públicos depositadas no *GENEBANK* através do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Para a análise foi utilizada a função “*Search for Short Nearly Exact Matches*” através da matriz PAM30 do programa de *software* BLAST. Os peptídeos contendo aminoácidos com quatro ou mais identidades foram determinados como mimetopos das seqüências protéicas alinhadas nos bancos de dados.

Para encontrar os padrões protéicos e a linhagem taxonômica referindo-se às famílias de proteínas e domínios comuns em espécies, gêneros ou táxons a qual os peptídeos pertencem, foi utilizado o programa PROSCAN (PROSITE SCAN). Este programa examina os peptídeos contra o PROSITE, um banco de dados de famílias de proteínas e domínios que consiste de locais biologicamente significantes, padrões e perfis que ajudam a identificar confiantemente a família conhecida da proteína, caso exista uma ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_prosite.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html)).

Para a determinação da similaridade entre cada peptídeo e um grupo de proteínas preditas a partir de ESTs obtidas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, foi utilizado o programa tBLASTn com os seguintes parâmetros: “`$blastall -p tblastn -i peptideos -d ests -e 100 -b 1 -F f -o result`”. Desta forma, foi executado o programa tBLASTn dos 107 peptídeos contra as 44130 ests ( `$formatdb -i ests -p F -o T`) com um valor de E muito alto pra garantir o melhor alinhamento, foi imprimido apenas 1 alinhamento para cada peptídeo com -b com filtro “*low complexity*” desligado e a saída impressa em “*result*”.

Foram utilizados programas complementares de tradução das seqüências gênicas (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>), determinação da predição de pesos moleculares de proteínas (<http://ca.expasy.org/tools/tagident.html>) e ajustes de *codon usage* das seqüências.

#### Análises de especificidade dos clones selecionados

---

Nesta etapa os clones obtidos por seleção biológica foram identificados e validados, sendo que os estudos de imunoreatividade e imunogenicidade foram

realizados em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente os clones foram testados para determinação da antigenicidade por ELISA, *Dot-Blot*, *Dot-Blot* inibição e *Western blot*. A verificação do perfil de imunogenicidade foi verificada por ensaios de imunização em camundongos e bovinos, além de estudos para determinação de reconhecimento imune em animais infestados naturalmente (imunotriagem). Em um teste preliminar os animais foram imunizados e desafiados para a determinação de possíveis efeitos de proteção do hospedeiro contra o parasito.

#### *Phage -ELISA*

---

Os testes de ELISA foram realizados para determinação da reatividade dos peptídeos recombinantes (expressos nos fagos selecionados) contra os anticorpos presentes no soro das galinhas, imunizadas com proteínas totais do carrapato bovino. Uma placa de alta afinidade (*NUNC*) foi sensibilizada com 1 µg/poço do anticorpo policlonal purificado IgY anti-carrapato (alvo biológico utilizado nas seleções biológicas) diluído em 100 µL/poço de tampão carbonato ( $\text{NaHCO}_3$  60 mM, pH 9,6) e incubada por 12 horas, sob agitação, à 4°C. Após 3 lavagens com PBS-T 0,05% (PBS + 0,05% volume/volume de Tween 20), foram adicionados 250 µL de tampão de bloqueio (PBS-T 0,05% - leite em pó desnatado 5%), sendo a placa incubada por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi então lavada por mais 6 vezes e adicionados 100 µL de solução contendo fago (um clone em cada poço). Após a incubação por 1 hora à 37°C, realizou-se mais 6 lavagens. Para a detecção, utilizou-se o anticorpo conjugado anti-M13 marcado com peroxidase na diluição de 1:5000 (*GE helathcare*) diluído em solução de bloqueio, com incubação por 1 hora à 37°C. Em seguida, a placa foi lavada por mais 6 vezes e então revelada com 100 µL/poço de uma solução contendo OPD (O- Phenylenediamine dihydrochrloide – *Sigma Chemical*),  $\text{H}_2\text{O}_2$  e tampão citrato (0,1 M). A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4M. A leitura da absorbância foi feita em leitor *Multiscan Plus* (*Thermo Plate*) versão 2.03, com filtro 492nm. Os clones de fagos foram submetidos a incubação com soros positivos, negativos e tampão respectivamente. Foi utilizado como controle negativo o fago M13 selvagem e também os anticorpos policlonais purificados de soro de animais pré-imune, não reativo as proteínas totais de carrapato. O índice

ELISA (IE) para os ensaios 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 da DO do fago M13 (controle negativo, fago sem inserto). Os IEs maiores que 1 foram considerados positivos e os IEs menores que 1 foram considerados negativos.

#### *Dot-Blots*

---

No experimento de Dot-Blot uma membrana de nitrocelulose foi sensibilizada com 2 µL de cada clone selecionado ( $10^7$  clones totais) por amostra. A membrana foi incubada, lavada três vezes por 5 minutos cada com TBST (TBS + 0,1% volume/volume de Tween 20). Após as lavagens a membrana foi bloqueada por 1 hora à temperatura ambiente com 1 mL de tampão de bloqueio (PBS-T 0,1% - leite em pó desnatado 5%). Sobre a membrana recortada disposta em canaletas individuais, foi pipetado 100 µL de bloto com soro policlonal (IgY anti-proteínas de carrapato) na diluição de 1/100 em tampão de bloqueio. Anteriormente a incubação do soro na membrana, o soro foi pré adsorvido com proteínas de extratos de células bacterianas ER2738 e partículas virais de fago M13 selvagem. A membrana foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação orbital. Após este período a membrana foi lavada novamente 5 vezes com TBST. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de galinha conjugado com fosfatase alcalina 1:5000 (*Sigma Chemical*) em tampão de bloqueio e incubada por mais 1h, temperatura ambiente. A reação foi revelada com o substrato NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate -*Sigma Chemical*). O fago M13 selvagem foi utilizado como controle negativo e os antígenos totais de carrapato como controles positivos.

Os experimentos de inibição foram realizados da mesma forma que o *Dot-Blot*, exceto pela adição de um passo de pré-incubação do soro com proteínas de carrapato previamente a incubação na membrana. Concentrações variadas de proteínas totais foram adicionadas na ordem de 0 a 200 µg/canaleta.

#### *Western Blot*

---

Nos experimentos de *Western Blot* as amostras referentes aos clones de fagos foram tratadas com DTT e imediatamente aquecidas em banho-maria por 2 min a 95°C aplicados em eletroforese. As amostras foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Amersham Pharmacia*) e bloqueadas com solução de bloqueio. Foi utilizado como anticorpo primário as IgY policlonais, purificadas de soro de galinhas, anti proteínas totais de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Após lavar 5 vezes com TBST durante 5 minutos cada, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de galinha marcado com a fosfatase alcalina na proporção de 1/5000 em tampão de bloqueio durante 1 hora a temperatura ambiente. Após este período as membranas foram lavadas 5 vezes com TBST e a revelação ocorreu pela adição do substrato NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5 – bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate -*Sigma Chemical*). Este processo foi necessário para assegurar que os peptídeos expressos na proteína III dos clones selecionados foram reconhecidos especificamente pelo anticorpo de proteínas de carrapato.

Teste dos fagos recombinantes como imunógenos do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

---

#### *Preparo do inóculo*

---

Para a amplificação de cada clone a ser testado em ensaios de imunizações e imunotriagem, foi utilizada a proporção de 1 µL de tetraciclina (20mg/mL) para cada 1 mL do meio LB (Luria Bertane) líquido em *erlenmeyers* (concentração final de 20ug/mL), totalizando 5mL. A este meio foi inoculada uma colônia isolada de bactéria, cepa de *E. coli* ER2738 resistente à tetraciclina, que se multiplicou durante 6 horas a 37°C com agitação de 200 rpm. O meio de cultura foi diluído na proporção de 1/100, ou seja, 5 mL de bactérias em 500 mL de meio LB com tetraciclina (20ug/mL). As bactérias foram infectadas pelos fagos na quantidade de 50 µL (aproximadamente 1x10<sup>11</sup>ufc) e mantidas sob agitação constante de 200 rpm a 37°C, por 20 horas. A cultura final foi transferida para tubos de centrifuga e submetida à 11,300g por 10 minutos, à 4°C, por 2 vezes, para eliminar os pellets de bactérias. Aproximadamente 80% do sobrenadante foi transferido para outro tubo acrescentando-se um volume de 80 mL de PEG (polietilenoglicol 8000 + NaCl 2,5 M), na proporção de 1/6, e incubado *overnight* a

4°C, com a finalidade de precipitar os fagos. Após a incubação, o preparado foi centrifugado a 11,300g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* novamente centrifugado por 1 minuto. O *pellet* foi diluído em 10 mL de tampão TBS em tubos falcon de 15 mL e centrifugado à 1550g por 40 minutos, à 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foi acrescentado 1/6 de PEG e incubado por 60 minutos. Novamente foi centrifugado a 1550g por 40 minutos à 4°C e o sobrenadante foi descartado. O sobrenadante residual foi retirado e o *pellet* diluído em 4mL de TBS.

Os fagos foram quantificados em partículas virais por mL por espectrofotometria direta em espectrofotômetro utilizando leitura de UV a 269nm, como descrito nos experimentos anteriores.

Para a titulação dos clones, a solução de fagos titulada foi submetida a diluições seriais de 10 vezes em meio LB líquido. Para amplificação foram utilizadas as diluições de  $10^{-7}$  a  $10^{-12}$ . Em cada diluição foi acrescentado 200µL da cultura de ER2738 na fase *mid-log*. Esta mistura foi agitada brevemente e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. As células infectadas foram transferidas para tubos de cultura contendo 3 mL de agarose top a 45°C, (invertidos rapidamente) e espalhadas sobre uma placa de petri contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e tetracilina. Para cada diluição foi utilizada uma placa, que foi vedada com parafilme, invertida e incubada 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.

### *Inoculações*

---

#### Inoculações de clones de fagos em camundongos

---

Fagos purificados foram utilizados para a imunização de fêmeas de seis semanas de idade e peso médio de 28 gramas da linhagem BALB/c através de injeções subcutâneas. Cada imunização consistiu em aproximadamente  $10^{12}$  pv (partículas virais) diluídos em 100uL de TBS, sem a presença de adjuvantes, exceto em alguns casos específicos citados posteriormente. Nas imunizações foram utilizados cinquenta grupos, contendo cinco animais por grupo, sendo que a imunização foi feita com trinta e sete clones diferentes, fago selvagem M13 e fd-

tet, três peptídeos sintéticos, três fagos representantes destes peptídeos sintéticos e controles de reação adequados. O tampão TBS e o fago M13 selvagem foram utilizados como controles negativos e as proteínas totais de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* como controles positivos. Não foi utilizado adjuvante para as imunizações, exceto para os peptídeos sintéticos e os controles correspondentes, sendo adjuvante completo de *Freund* (*Sigma Chemical Co, USA*) na primeira imunização e o incompleto de *Freund* (*Sigma Chemical Co, USA*) nas demais, pela via subcutânea. Os animais foram imunizados a cada duas semanas perfazendo sete imunizações no total. As coletas de sangue, pela veia orbital, foram realizadas nos dias 0, 30, 60 e 90 após as imunizações.

Na escolha dos clones foram utilizados os seguintes critérios: maior frequência peptídica, maior reatividade por *Phage* -ELISA, *Dot-Blot*, *Western Blot* e ensaios de inibição por *dot-blot*. Os seguintes clones foram testados: Seq. ID Nº 1, Seq. ID Nº 2, Seq. ID Nº 7, Seq. ID Nº 10, Seq. ID Nº 11, Seq. ID Nº 12, Seq. ID Nº 14, Seq. ID Nº 15, Seq. ID Nº 17, Seq. ID Nº 18, Seq. ID Nº 22, Seq. ID Nº 25, Seq. ID Nº 26, Seq. ID Nº 27, Seq. ID Nº 28, Seq. ID Nº 32, Seq. ID Nº 40, Seq. ID Nº 41, Seq. ID Nº 47, Seq. ID Nº 48, Seq. ID Nº 50, Seq. ID Nº 51, Seq. ID Nº 67, Seq. ID Nº 69, Seq. ID Nº 70, Seq. ID Nº 75, Seq. ID Nº 76, Seq. ID Nº 80, Seq. ID Nº 82, Seq. ID Nº 83, Seq. ID Nº 91, Seq. ID Nº 92, Seq. ID Nº 93 e Seq. ID Nº 94.

Os níveis de anticorpos específicos no soro dos camundongos foram mensurados como se segue: cada amostra de sangue foi fracionada em tubos tipo *eppendorf* e armazenadas a -20° C. Placas de microtitulação de fundo chato (96 well: *Nunc, Roskilde, Denmark*) foram sensibilizadas com proteínas totais diluídas em PBS, pH 7,2 na dose 1 ug/mL, *overnight* à 4°C. Após a sensibilização as placas foram lavadas e os soros dos animais foram adicionados a cada poço, diluídos em solução de bloqueio na diluição de 1:100 e incubados durante 2 horas à 37°C. Após este período, as placas foram lavadas e incubadas com conjugado anti-camundongo complexado com peroxidase, diluídos em solução de bloqueio na proporção de 1:5000, durante 1 hora à 37°C. O substrato utilizado para a revelação foi o OPD e a paralisação da reação foi feita com ácido sulfúrico. A leitura de absorbância foi determinada a 492 nm em leitor de microplaca (*Flow Titertek Multiskan Plus - USA*).

No segundo teste de inoculações em camundongos, para a imunização

com os clones foram utilizados camundongos fêmeas de seis semanas de idade e peso médio de 28 gramas da linhagem *Swiis*. Doze grupos de três animais em cada grupo, foram imunizados com nove clones diferentes (Seq. ID Nº 18, Seq. ID Nº 19, Seq. ID Nº 20, Seq. ID Nº 21, Seq. ID Nº 22, Seq. ID Nº 26, Seq. ID Nº 32, Seq. ID Nº 37, Seq. ID Nº 41) controle do tampão PBS, fago M13 selvagem e o *pool* dos fagos (conjunto destes clones em uma mesma dosagem) na dose de  $2,5 \times 10^{12}$  ufc em um volume de 100 µL, 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.

Após as imunizações os níveis de anticorpos específicos no soro de camundongos foram mensurados da seguinte forma: cada amostra de soro foi aliquotada em tubos tipo *ependorf* e armazenadas a -20° C. Placas de microtitulação de fundo chato (96 well: *Nunc, Roskilde, Denmark*) foram sensibilizadas separadamente com os clones e também proteínas totais diluídos em PBS, pH 7,2, na dose de  $5 \times 10^{10}$  ufc/mL, *overnight* à temperatura ambiente. Após a 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-bovino 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 e a paralisação da reação feita com ácido sulfúrico. A leitura de absorbância foi determinada a 492 nm em leitor de microplaca (*Flow Titertek Multiskan Plus - USA*).

## Ensaio de infestação natural e desafio de bovinos

---

### Ensaio de desafio com carrapatos em bovinos inoculados com clones de fagos

---

Nesta etapa bovinos da raça holandesa foram submetidos ao desafio com carrapatos após serem inoculados com os clones de fagos. Para isto, um mês antes das imunizações, os animais passaram por uma série de quatro banhos a cada sete dias, com carrapaticidas comerciais (organofosforados), na tentativa de eliminar todos os carrapatos presentes, decorrentes de infestações de campo anteriores (infestação média). Seq. ID Nº

Nos ensaios preliminares de imunização dois grupos com dois animais machos, com idade aproximada de 18 meses, foram utilizados para o teste de inoculação e desafio. Os animais foram imunizados por via intramuscular com um *pool* dos clones mais reativos (Seq. ID Nº 18, Seq. ID Nº 19, Seq. ID Nº 20, Seq. ID Nº 21, Seq. ID Nº 22, Seq. ID Nº 26, Seq. ID Nº 32, Seq. ID Nº 37, Seq. ID Nº 41) na dose de  $2,5 \times 10^{12}$  ufc (grupo 1) e o fago M13 selvagem na mesma dose (grupo 2), em um volume de 1mL, com adjuvante incompleto 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.

Doze dias após a primeira inoculação os animais foram infestados com larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (cepa Vallée), foram feitas duas infestações com 5.000 larvas em cada uma, com intervalo de um dia. Os animais foram monitorados duas vezes ao dia durante os primeiros dias de inoculação para a checagem de possíveis reações cutâneas de hipersensibilidade aos fagos.

Observações clínicas semanalmente foram realizadas até o 24º dia após a primeira infestação. Os carrapatos adultos ao desprenderem-se foram coletados do chão das baias, as quais foram devidamente preparadas para as coletas, e realizou-se a identificação dos carrapatos de acordo com as baias. Cada fêmea foi pesada em uma balança de precisão e preparada para a postura dos ovos em uma estufa a 27°C e 80% de umidade (Oba, 1976). Os ovos foram pesados e dispostos em uma estufa durante 30 dias para o processo de eclosão. As larvas foram também pesadas em uma escala de precisão (Massard et al, 1995). Os dados dos parâmetros biológicos (contagem, peso das fêmeas adultas, peso dos ovos, larvas e estado fisiológico geral) foram analisados após a observação dos dados.

#### *Ensaios de infestações natural em bovinos com carrapatos (imunotriagem)*

---

Inicialmente foi realizado um teste de imunotriagem no qual 16 bovinos, sendo 8 da raça nelore e 8 da raça holandesa, foram infestados naturalmente com larvas de carrapatos. Após a observação de um padrão de contagem de carrapatos medindo de 4,5 a 8mm, no flanco direito de cada animal, foram escolhidos 4 animais (dois de cada raça), um animal com alta contagem e outro

com baixa contagem, na tentativa de buscar uma relação entre os animais com maior susceptibilidade e outros com maior resistência em situações de infestação natural.

Após a determinação do padrão de resposta a infestação, os soros dos animais foram colhidos, processados e realizado um ensaio de *Dot-Blot* (metodologia descrita anteriormente) para determinação de imunoreatividade de IgGs de bovino. Os seguintes clones foram testados: Seq. ID Nº 1, Seq. ID Nº 2, Seq. ID Nº 7, Seq. ID Nº 10, Seq. ID Nº 11, Seq. ID Nº 12, Seq. ID Nº 14, Seq. ID Nº 15, Seq. ID Nº 17, Seq. ID Nº 18, Seq. ID Nº 22, Seq. ID Nº 25, Seq. ID Nº 26, Seq. ID Nº 27, Seq. ID Nº 28, Seq. ID Nº 32, Seq. ID Nº 40, Seq. ID Nº 41, Seq. ID Nº 47, Seq. ID Nº 48, Seq. ID Nº 50, Seq. ID Nº 51, Seq. ID Nº 67, Seq. ID Nº 69, Seq. ID Nº 70, Seq. ID Nº 75, Seq. ID Nº 76, Seq. ID Nº 80, Seq. ID Nº 82, Seq. ID Nº 83, Seq. ID Nº 91, Seq. ID Nº 92, Seq. ID Nº 93, Seq. ID Nº 94. O fago M13 selvagem foi utilizado como controle negativo e as proteínas totais de carrapato como controle positivo.

#### *Testes cutâneo de hipersensibilidade dos clones de fagos em bovinos infestados naturalmente*

---

Testes de hipersensibilidade cutânea foram realizados com a inoculação dos clones de fagos no tecido subcutâneo de bovinos infestados com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e mantidos em sistema de pastejo controlado. As inoculações foram realizadas na lateral do pescoço e no dorso das orelhas. Previamente, a região a ser inoculada foi tricotomizada e desinfetada com álcool na concentração de 70%. Foram utilizados 4 clones distintos para o experimento, sendo eles: C1 – Seq. ID Nº 2, C2 - Seq. ID Nº 18, C3 - Seq. ID Nº 32, C4 - Seq. ID Nº 47. O fago M13 selvagem representou o controle negativo do fago, o TBS como controle negativo do tampão e o antígeno total de larvas como controle positivo. Foram inoculadas no pescoço três diferentes dosagens dos fagos, compreendendo  $10^{13}$ ,  $10^{12}$  e  $10^{11}$  partículas virais. Na orelha foi inoculado apenas a concentração de  $10^{13}$  partículas virais. Para as leituras foi utilizado um espessímetro de papel. As leituras foram realizadas em intervalos específicos de tempo, compreendendo o período de 0 a 96 horas a partir do momento da inoculação dos clones de fagos.

## Síntese dos genes artificiais contendo múltiplos mimetopos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

---

Nesta etapa foi realizado o desenvolvimento do sistema de múltiplos peptídeos miméticos (ou MAPs - *Multiple Antigens Peptides*) a partir dos clones de fagos selecionados e caracterizados por *Phage Display*.

### Projeto dos genes artificiais

---

No gene A definido como multi-mimético foi determinada a utilização das seqüências de 10 mimetopos distintos, escolhido pelos estudos *in vivo* e *in vitro* dos clones de fagos. Os mimetopos foram arranjados em *tandem* para o gene A (na ordem de Seq. ID Nº 47, Seq. ID Nº 70, Seq. ID Nº 50, Seq. ID Nº 18, Seq. ID Nº 7, Seq. ID Nº 26, Seq. ID Nº 41, Seq. ID Nº 22, Seq. ID Nº 2, Seq. ID Nº 15). Foram inseridos 4 espaçadores peptídicos (GGGS) entre cada mimetopo disposto na seqüência do gene A. Em três peptídeos deste gene (Seq. ID Nº 47, Seq. ID Nº 70 e Seq. ID Nº 50) foram utilizadas duas cisteínas flanqueando a seqüência peptídica além de uma Alanina N-terminal. No gene B, o procedimento foi idêntico a síntese do gene A utilizando apenas o mimetopo conformacional Seq. ID Nº 47 em 10 repetições em tandem tendo o mesmo espaçador (GGGS), além de duas cisteínas flanqueando a seqüência peptídica e uma alanina como estabilizadora da estrutura N-terminal peptídica .

### Síntese química, clonagem e expressão gênica

---

Os genes artificiais A e B foram sintetizados quimicamente e clonados pela empresa genscrip ([www.genscript.com](http://www.genscript.com)). Inicialmente a seqüência de DNA dos genes artificiais foi determinada e disposta em *tandem*, tendo sítios de restrição para as enzimas *Kpn1* e *Not1*. Para evitar repetições de determinados nucleotídeos, com isto impossibilitar a construção correta do gene artificial, as seqüências foram submetidas aos ajustes de *códon usage*. Neste processo, para possibilitar a síntese química, as seqüências de aminoácidos que apresentaram códons redundantes foram alternadas para manter o mesmo aminoácido e alternância da seqüência nucleotídica, mantendo o equilíbrio entre as 4 bases de nucleotídeos presentes na seqüência artificial. Em seguida as seqüências dos *oligopeptídeos* foram sintetizadas, ligadas e clonadas no vetor pUC18 e sub-

clonadas no vetor de expressão pET32a (*novagen*). Para a confirmação do processo as seqüências foram checadas pelo seqüenciamento de DNA dos insertos presentes no vetor de clonagem (dados não mostrados).

#### Expressão das proteínas recombinantes PRA e PRB

---

Para a expressão das proteínas recombinantes PRA e PRB, foram realizadas sub-clonagens do vetor pUC18 para o vetor de expressão em procariotos pET32a (*Novagen*) utilizando os sítios de restrição das enzimas *Kpn1* e *Not1*. Os vetores de expressão resultantes foram transformados em *E. coli* top 10, *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* origami B (DE3) pLysS. Na transformação metade do sistema de ligação (inserto e vetor) foi inoculada em células competentes e incubada no gelo por 30 minutos. Após esse tempo, foi submetido a um choque térmico a 42°C por 90 segundos seguindo-se de uma rápida incubação no gelo por mais 2 minutos. Foi adicionado meio LB às células transformadas e o crescimento da cultura foi realizado sob agitação de 250 rpm por 1 hora a 37°C. Em seguida, os produtos da transformação foram plaqueados em duas placas contendo LB ágar e ampicilina. Estas placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Após a transformação colônias isoladas foram inoculadas em meio LB contendo ampicilina e as culturas foram crescidas sob agitação de 250 rpm a 37°C por 16 horas. Foram realizadas extrações de plasmídeos por lise alcalina das culturas para obtenção do plasmídeo intacto (pET32a), seguidas da digestão destes com *Kpn1* e *Not1* para confirmação da presença do inserto.

#### Teste de expressão

---

Foi realizada uma cinética de expressão das proteínas recombinantes para determinação da presença destas proteínas no extrato bruto de bactérias *E. coli* origami B (DE3) pLysS. As colônias transformadas foram crescidas em cultura e induzidas com isopropyl-d-thiogalactopyranoside (IPTG).

Antes de iniciar a indução foram preparadas células competentes *E. coli* origami B DE3 (pLysS). Em seguida o plasmídeo pET32a, contendo o inserto para os respectivos genes, foi incubado com estas células competentes recém-preparadas, no gelo por 30 minutos. A partir desse momento foi feito o processo de transformação como descrito anteriormente. Após a transformação foi feito um

pré-inóculo, em tubos estéreis, de 1 clone isolado da placa de transformação com meio LB contendo ampicilina. A cultura foi crescida sob agitação de 250 rpm a 37°C por 16 horas. Um inóculo foi feito a partir do pré-inóculo, com meio LB contendo ampicilina, seguindo-se de incubação sob agitação de 250rpm a 37°C por 30 minutos. Em seguida o crescimento celular foi acompanhado até atingir OD<sub>600nm</sub> igual a 0,9. Neste momento, retirou-se uma alíquota (tempo zero), que foi centrifugada e descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em tampão de amostra 2x SDS-PAGE. No restante da cultura foi adicionado IPTG 1mM e incubou-se a 37°C sob agitação de 250 rpm.

Alíquotas de células foram retiradas a cada 1 hora para análise em SDS-PAGE. Cada alíquota coletada foi centrifugada, descartando o sobrenadante e ressuspendendo o pellet em tampão de amostra 2x SDS-PAGE. As alíquotas dos tempos 0, 1, 2 e 3 foram analisadas em 2 géis por SDS-PAGE. Após a corrida, o primeiro gel foi corado com azul de *Coomassie* R-250 (*Sigma*) descorado com metanol 30% e ácido acético glacial 7% e observado em transiluminador. O segundo gel foi utilizado para imunodeteção por *Western blot*. Foram comparadas a presença e ausência de bandas correspondentes às proteínas recombinantes PRA e PRB antes e depois da indução por IPTG em diferentes intervalos de tempo.

#### *Análises da reatividade das proteínas expressas (PRA e PRB) no sistema heterólogo*

---

As amostras obtidas no experimento anterior foram também submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 16%) para a realização do *Western Blot*. O gel foi eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose (*GE healthcare*). A membrana foi bloqueada por 2 horas com leite em pó desnatado diluído na concentração de 5% em TBS-T (0,01%) e mantido sob temperatura ambiente e agitação constante. Os anticorpos policlonais de galinhas, reconhecedores de proteínas totais de carrapatos, utilizados para a seleção dos peptídeos isolados nas seleções das bibliotecas de *Phage Display* foram utilizados como anticorpos primários. Foi utilizada a diluição de 1:500 em tampão de bloqueio. Nesta etapa o tampão de bloqueio continha extrato bruto de bactérias *E. coli* origami B (DE3) pLysS não transformadas, as quais foram

utilizadas como adsorvente do soro. A mistura de anticorpos primários foi incubada por 1 hora antes da adição à membrana em um processo de pré-adsorção e posteriormente mais 1 hora de incubação com a membrana, sendo todo o processo realizado em temperatura ambiente, com agitação constante. A membrana foi lavada com PBS-T por 3 vezes durante 10 minutos cada e incubada por 1 hora a temperatura ambiente com IgG de cabra anti-IgY de galinhas conjugadas com a fosfatase alcalina. Após 3 lavagens com TBS durante 30 minutos, as proteínas reativas na membrana foram detectadas colorimetricamente com o substrato 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)/nitro-blue tetrazolium (NBT).

#### *Preparação das proteínas recombinantes*

---

As células de *E. coli* origami B (DE3) pLysS transformadas (gene A e gene B) foram crescidas em culturas de 1 litro e induzidas por IPTG (1mM), foram coletadas após 5 horas de indução, concentradas por centrifugação (5500 rpm por 15 min) e lavadas uma vez com o tampão 1 de lise celular (1mM EDTA pH 8.0, 50mM Tris-HCl, pH 8.0 e 100mM de NaCl), na proporção de 3 mL para cada grama do *pellet* de células. Para cada grama de *pellet* foi adicionado 4uL de PMSF 100mM e 80 uL de solução de lisozima (10 mg/mL) e mantido sob agitação por 20 minutos. Foi adicionado posteriormente 4 mg de ácido deoxílico por grama de *E. coli*. e incubado a 37°C até o lisado se tornar viscoso, sendo adicionado 20 uL de 1mg/mL de DNase 1 por grama de *E. coli*. As células foram mantidas por 30 minutos até a perda da viscosidade. Para peletizar os corpos de inclusão o lisado de células foi centrifugado em máxima velocidade por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado, sendo o *pellet* dissolvido em 1mL de água por grama de *E. coli*. Após centrifugação o precipitado foi brevemente lavado com uréia 5M diluída em 100mM de Tris-HCl (pH 8). A solubilização dos corpos de inclusão foi realizada após a centrifugação dos *pellets* ressuspendidos no tampão de solubilização dos corpos de inclusão contendo 0,1 mM de PMSF e mantidos a temperatura ambiente por 1 hora. Foi adicionado 9 volumes do tampão 2 de solubilização dos corpos de inclusão e a mistura foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. O pH da solução foi ajustado com 12 M de HCl para 8 e incubados por pelo menos 30 minutos em temperatura ambiente. A mistura foi

centrifugada em máxima velocidade por 15 minutos, em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante coletado e dializado em 20mM Tris–HCl (pH 8.5) por 48 horas. As preparações com as proteínas recombinantes foram analisadas por SDS-PAGE 16% e armazenadas a -20 °C até o uso.

#### *Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade*

---

A proteína recombinante expressa foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e *Sepharose (HisTrap™)* (amershan biosciences). As preparações com as proteínas recombinantes foram analisadas em SDS-PAGE 16% e armazenadas a -20 °C até o uso.

## RESULTADOS

---

Inicialmente, na seleção biológica por imunoafinidade, foi necessário a geração de anticorpos policlonais anti-proteínas totais de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* objetivando não só a seleção dos peptídeos randômicos expressos nas bibliotecas de *Phage Display*, mas principalmente descobrir novos antígenos ocultos que pudessem ser reconhecidos pelo sistema imune da galinha, um animal não hospedeiro deste parasito. Neste processo o alvo biológico foi as IgY policlonais desenvolvidas em galinhas, obtidas pelas imunizações com extrato protéico total dos estágios de larvas e teleóginas. Após a obtenção dos clones foram realizados diversos experimentos *in vitro* e *in vivo*, para a validação do processo de seleção e caracterização dos clones. Finalmente, alguns peptídeos foram escolhidos para a construção de um sistema recombinante de múltiplos epítomos, ligados em *tandem*, os quais foram expressos em um sistema heterólogo de procarioto.

Produção e caracterização de soro hiperimune em galinhas imunizadas com os antígenos totais do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

---

Esta etapa inicial teve como objetivo a extração das proteínas totais, análise da resposta imune de galinhas imunizadas com estes inóculos, purificação das imunoglobulinas específicas do soro e ovos e verificação do reconhecimento dos anticorpos de galinhas imunizadas com os extratos protéicos totais de larvas e adultos do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Galinhas foram imunizadas com proteínas totais, extraídas de larvas e teleóginas do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, para a produção de soro policlonal. O perfil protéico da extração das proteínas totais foi verificado por SDS-PAGE 10% (Figura 4). Nesta figura, as linhas A e B representam as proteínas totais extraídas de larvas e adultos, respectivamente. O resultado foi condizente com o perfil protéico desejado, tendo diversas bandas protéicas de intensidades e pesos moleculares variados.

Foram utilizadas para a imunização galinhas de três semanas de idade, da raça *White-Leghorn*. Todos os animais imunizados desenvolveram anticorpos reativos ao extrato protéico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, em contraste

com os animais controles negativos (Figura 5). Os títulos de anticorpos foram acima de 145800 para larvas e acima de 16200 para adultos.

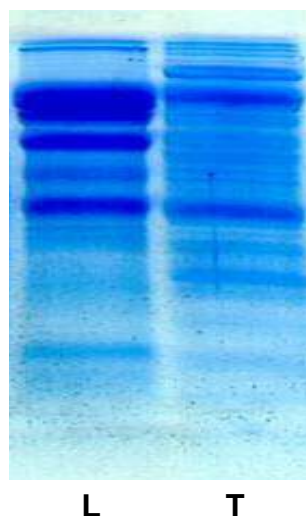


Figura 4 - Gel SDS-PAGE 10%, representando proteínas totais de larvas (L) e teleóginas (T).

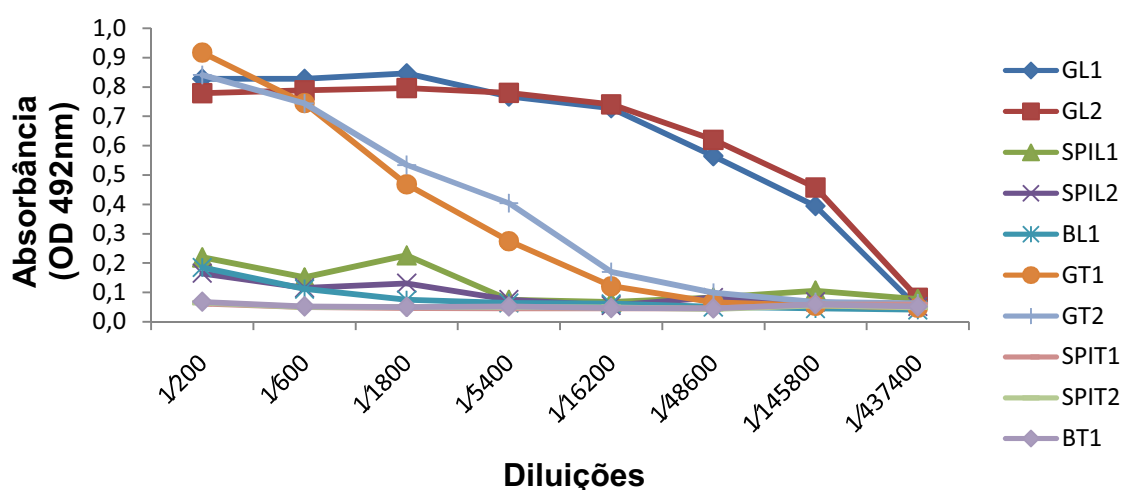


Figura 5 - Resultados do ELISA expressados como títulos (Título = diluição do soro baseado no valor do *cut off*). O gráfico foi representado pela disposição dos valores de ELISA (OD 492nm) em função da diluição (3 vezes) dos soros testados. Na legenda: galinhas imunizadas com antígenos de larvas (GL1 e GL2), galinhas imunizadas com proteínas de adultos (GT1 e GT2), soros pré-ímenes (SPIL1, SPIL2, SPIT1 e SPIT2) e os controles negativos de reação (BL1 e BT1).

Os anticorpos presentes no soro e ovos foram precipitados por sulfato de amônio e cromatografados em colunas de troca iônica. As imunoglobulinas purificadas foram caracterizadas parcialmente quanto à pureza por SDS-PAGE (Figura 6). O Processo de purificação de imunoglobulinas a partir do soro e ovos de galinhas mostrou ser eficiente. A Figura 6 mostra um padrão de eletroforese das preparações de IgYs purificadas comparadas com soro total (colunas A e B), assim como um padrão de purificação rotineiro para IgGs de coelhos em nosso laboratório (C) em condições não redutoras. Foram utilizadas condições redutoras por dithiothreitol-DDT (colunas D e E) para a determinação das cadeias leves e pesadas. Foi verificada a presença de uma banda forte de aproximadamente 180 kDa no soro correspondente ao peso molecular da IgY (colunas F). Sob condições redutoras com DTT ocorreu a presença de uma banda com peso molecular de aproximadamente 66 kDa, sendo a cadeia pesada do anticorpo e duas bandas menores correspondentes a aproximadamente 28 kDa, sendo a cadeia leve. Foi possível demonstrar a boa seletividade na purificação dos anticorpos por sulfato de amônio associada a uma eficiente cromatografia de troca iônica.

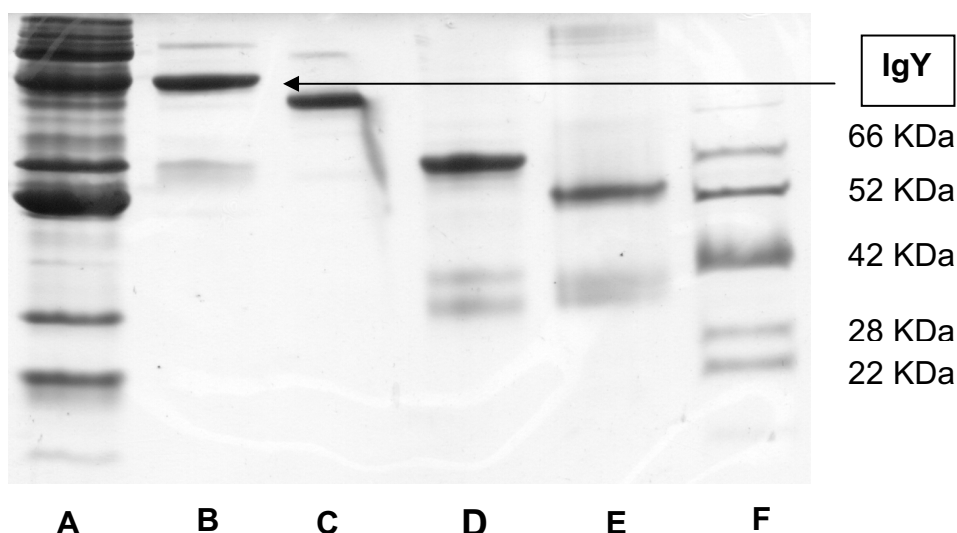


Figura 6 - SDS-PAGE (16%) - IgYs obtidas por precipitação com sulfato de amônio e cromatografadas em resina de troca iônica. colunas A - amostra de soro total de galinhas, colunas B – Fração de IgY obtida do void , colunas C – IgG de coelho purificada, colunas D e E – amostras B e C reduzidas por DTT, colunas F – Marcador de baixo peso molecular

Foi realizado um método alternativo para a purificação por afinidade dos anticorpos policlonais específicos de carrapato. O extrato protéico de carrapato foi adsorvido em uma membrana de nitrocelulose e a membrana contendo as proteínas foi incubada com a fração parcialmente purificada de IgY. Posteriormente as membranas foram lavadas com PBST e monitoradas por leituras no espectrofotômetro no final da lavagem para averiguação do desprendimento de proteínas da membrana. Os anticorpos foram eluídos, neutralizados e a concentração do eluato foi estimado por espectrofotometria (OD 280nm) e a qualidade verificada por SDS-PAGE 10% (Figura 7). Neste experimento foi verificada a presença de bandas de menor intensidade para anticorpos eluídos de proteínas totais de larvas e adultos (colunas C e D, respectivamente) quando comparadas as bandas da fração de anticorpos IgY anti larvas e adultos parcialmente purificada no experimento anterior (colunas A e B, respectivamente).

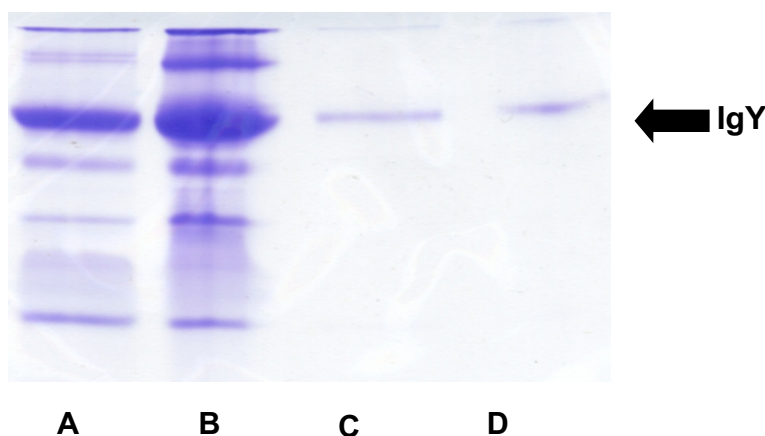


Figura 7 - SDS-PAGE (Gel 10%) de preparações de imunoglobulinas de galinhas, obtidas através da purificação por imunoafinidade dos anticorpos com proteínas totais do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A seta indica as imunoglobulinas de galinha. Colunas A e B pool das frações de IgY obtidas pela precipitação por sulfato de amônio e cromatografadas para IgY anti-larvas e teleóginas, respectivamente. Linhas C e D representam a fração do eluído de IgY após eluição ácida e neutralização para as frações de anticorpos anti-larvas e teleóginas, respectivamente.

Por fim, para verificar a funcionalidade dos anticorpos policlonais purificados, foi realizado um experimento de *Western blotting* (Figura 8). Os resultados mostraram reatividade das IgYs contra as principais proteínas dos estádios de larvas (A) e adultos (B) do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente as diversas diluições da fração de anticorpos IgY purificadas (1:180, 1:360, 1:720, 1:1440). Foram identificadas bandas fracas para as proteínas de menor peso molecular, bem como bandas fortes com massas moleculares maiores.

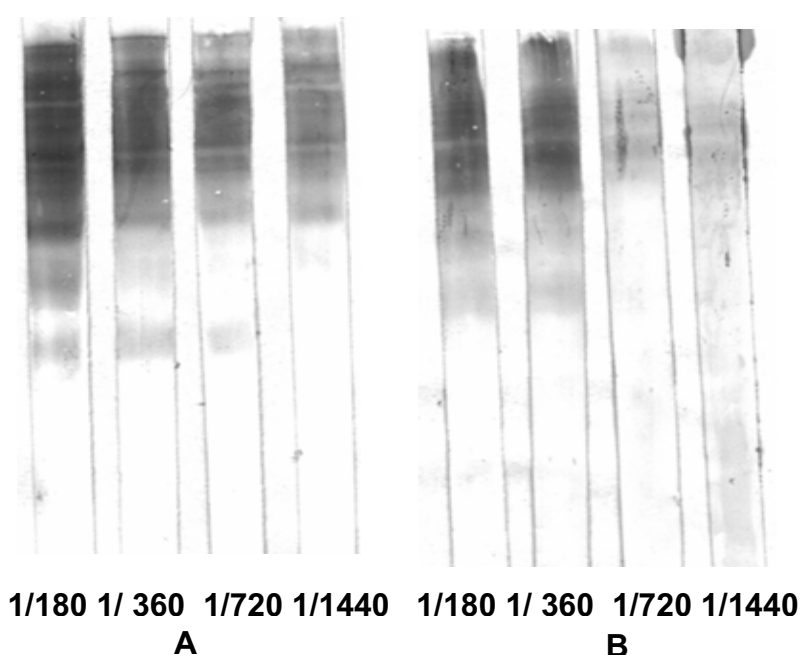


Figura 8: Caracterização das imunoglobulinas de galinhas purificadas e eluídas por afinidade. Pelo experimento de *Western blot* foi possível verificar o reconhecimento das proteínas de larvas (A) e adultos (B) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em diferentes diluições dos anticorpos policlonais (IgY).

Desta forma, pela purificação e análise da resposta imune em galinhas imunizadas com extrato protéico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi possível demonstrar a capacidade de utilizar galinhas como fonte produtora de anticorpos policlonais específicos e estes foram funcionalmente reativos contra as proteínas da fase larval e adulta de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Obtenção de peptídeos miméticos de epítomos de proteínas do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pela utilização de bibliotecas de *Phage Display*

---

Esta etapa refere-se à seleção e caracterização dos peptídeos recombinantes miméticos e motivos protéicos. Diversos parâmetros podem ser utilizados para indicar o sucesso da seleção de cada peptídeo, como pode ser visualizado na Tabela 1. Os mesmos parâmetros foram anteriormente utilizados por Rodi e colaboradores (2002). A Tabela 1 apresenta o enriquecimento das seleções pelos títulos obtidos durante as etapas de seleção biológica. As seleções estão indicadas pela letra S, foram realizadas no total sete seleções distintas. Na segunda coluna foram demonstradas as bibliotecas utilizadas para as seleções. Na terceira coluna foi representado o alvo utilizado para a seleção de clones. Na quarta coluna os ciclos de seleção para cada seleção S. Posteriormente foram determinados valores de entrada e a saída de fagos em cada etapa de seleção. Os títulos foram indicados pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) ou Unidades transdutores (TU) para as bibliotecas do tipo Ph.D. e Fd-tet, respectivamente. A taxa efetiva de enriquecimento em cada seleção S foi apresentada. Quanto maior for o coeficiente de enriquecimento ao longo dos ciclos de seleção maior é o enriquecimento. Todas as etapas são representadas por valores de enriquecimento confirmado pela divisão do título da saída pelo título da entrada multiplicado por 100. Por fim, foi determinada a taxa efetiva de enriquecimento que consiste na taxa de enriquecimento do último ciclo pela taxa do primeiro ciclo, perfazendo o resultado representado como o número de vezes em que a seleção enriqueceu.

De forma geral, todas as seleções apresentaram enriquecimento nas etapas iniciais comparadas com as etapas finais de seleção, com exceção da seleção S1 (0,6), demonstrando que a seleção dos clones foi direcionada ao alvo (Tabela 1). Para as seleções S3, S5 e S7 foram obtidas taxas de enriquecimento em todas as etapas de seleção. Nas seleções S1, S2, S4 e S6 ocorreu o empobrecimento do primeiro para o segundo ciclo. Posteriormente, ocorreu enriquecimento do segundo para o terceiro ciclo em todas as etapas. Também, foi observado que o título na saída do terceiro ciclo foi superior a saída após o primeiro ciclo de lavagem em todas as seleções.

Tabela 1 – Determinações das taxas de enriquecimento durante as seleções biológicas.

| Seleção | Biblioteca   | Alvo Biológico                      | Ciclo | Entrada <sup>a</sup> | Saída <sup>a</sup>  | Taxa<br>(Saída/entrada) <sup>b</sup> | Enriquecimento |
|---------|--------------|-------------------------------------|-------|----------------------|---------------------|--------------------------------------|----------------|
| S1      | Ph.D.- 12mer | IgY Policlonais<br>anti Pts adultos | 1º    | 4,0x10 <sup>10</sup> | 3,0x10 <sup>4</sup> | 3,0x10 <sup>-4</sup>                 | <b>0,6</b>     |
|         |              |                                     | 2º    | 5,0x10 <sup>8</sup>  | 3,0x10 <sup>1</sup> | 6,0x10 <sup>-6</sup>                 |                |
|         |              |                                     | 3º    | 2,0x10 <sup>11</sup> | 9,0x10 <sup>4</sup> | 4,0x10 <sup>-5</sup>                 |                |
| S2      | Ph.D.- 12mer | IgY Policlonais<br>anti Pts larvas  | 1º    | 4,0x10 <sup>10</sup> | 2,0x10 <sup>5</sup> | 5,0x10 <sup>-4</sup>                 | <b>5</b>       |
|         |              |                                     | 2º    | 5,0x10 <sup>9</sup>  | 1,0x10 <sup>2</sup> | 2,0x10 <sup>-6</sup>                 |                |
|         |              |                                     | 3º    | 2,0x10 <sup>11</sup> | 5,0x10 <sup>5</sup> | 2,5x10 <sup>-3</sup>                 |                |
| S3      | Ph.D.-C7C    | IgY Policlonais<br>anti Pts larvas  | 1º    | 4,0x10 <sup>10</sup> | 1,2x10 <sup>5</sup> | 3,0x10 <sup>-4</sup>                 | <b>16</b>      |
|         |              |                                     | 2º    | 2,0x10 <sup>11</sup> | 2,8x10 <sup>6</sup> | 1,4x10 <sup>-3</sup>                 |                |
|         |              |                                     | 3º    | 2,0x10 <sup>11</sup> | 9,6x10 <sup>6</sup> | 4,8x10 <sup>-3</sup>                 |                |
| S4      | F88-15mer    | IgY Policlonais<br>anti Pts larvas  | 1º    | 3,0x10 <sup>11</sup> | 1,3x10 <sup>4</sup> | 4,3x10 <sup>-6</sup>                 | <b>346</b>     |
|         |              |                                     | 2º    | 1,0x10 <sup>10</sup> | 9,3x10 <sup>2</sup> | 9,6x10 <sup>-6</sup>                 |                |
|         |              |                                     | 3º    | 1,0x10 <sup>10</sup> | 1,5x10 <sup>5</sup> | 1,5x10 <sup>-3</sup>                 |                |
| S5      | Cys3         | IgY Policlonais<br>anti Pts larvas  | 4º    | 1,0x10 <sup>10</sup> | 3,9x10 <sup>5</sup> | 3,9x10 <sup>-3</sup>                 | <b>250</b>     |
|         |              |                                     | 1º    | 2,0x10 <sup>12</sup> | 2,4x10 <sup>3</sup> | 1,3x10 <sup>-7</sup>                 |                |
|         |              |                                     | 2º    | 1,0x10 <sup>12</sup> | 6,0x10 <sup>4</sup> | 6,0x10 <sup>-6</sup>                 |                |
| S6      | Cys6         | IgY Policlonais<br>anti Pts larvas  | 3º    | 1,0x10 <sup>12</sup> | 3,0x10 <sup>5</sup> | 3,0x10 <sup>-5</sup>                 | <b>1091</b>    |
|         |              |                                     | 1º    | 2,0x10 <sup>12</sup> | 1,1x10 <sup>5</sup> | 5,5x10 <sup>-6</sup>                 |                |
|         |              |                                     | 2º    | 1,0x10 <sup>12</sup> | 2,1x10 <sup>4</sup> | 2,1x10 <sup>-6</sup>                 |                |
| S7      | Fuse-6mer    | IgY Policlonais<br>anti Pts larvas  | 3º    | 1,0x10 <sup>12</sup> | 6,0x10 <sup>7</sup> | 6,0x10 <sup>-3</sup>                 | <b>393</b>     |
|         |              |                                     | 1º    | 2,0x10 <sup>12</sup> | 5,6x10 <sup>3</sup> | 2,8x10 <sup>-7</sup>                 |                |
|         |              |                                     | 2º    | 1,0x10 <sup>12</sup> | 1,5x10 <sup>4</sup> | 1,5x10 <sup>-6</sup>                 |                |
|         |              |                                     | 3º    | 1,0x10 <sup>12</sup> | 1,1x10 <sup>6</sup> | 1,1x10 <sup>-4</sup>                 |                |

<sup>a</sup> - UFC/μL: Unidade formadora de colônia por μL (Ph.D.- 12mer, Ph.D.-C7C), TU/μL: Unidade transdutora por μL(F88-15mer, Cys3, Cys6 e Fuse 6mer).

<sup>b</sup> - Após cada ciclo de seleção foi determinado o título dos fagos selecionados pelos anticorpos policlonais e calculada a taxa de eluição pela divisão do valor de saída de fagos pelo valor da entrada para cada ciclo.

<sup>c</sup> - O enriquecimento foi determinado pela divisão da taxa obtida no terceiro ciclo pela taxa do primeiro ciclo para cada seleção.

### *Análises das seqüências dos peptídeos selecionados*

---

Após o processo de seleção biológica os clones selecionados foram caracterizados por seqüenciamento de DNA da região correspondente ao inserto dos peptídeos recombinantes (Tabela 2). As seqüências peptídicas estão dispostas em ordem numérica referente ao seqüenciamento de DNA da região correspondente ao inserto fusionado ao fago. A representação está de acordo com o tipo da biblioteca utilizada (Seq. ID Nº 1 a Seq. ID Nº 46 biblioteca Ph.D.-12mer, Seq. ID Nº 47 a Seq. ID Nº 74 biblioteca Ph.D.-C7C, Seq. ID Nº 75 a Seq. ID Nº 79 para a biblioteca F88-15mer, Seq. ID Nº 80 a Seq. ID Nº 90 para a biblioteca Cys3, Seq. ID Nº 91 a Seq. ID Nº 93 para a biblioteca Cys6 e Seq. ID Nº 94 a Seq. ID Nº 107 para a biblioteca Fuse-6mer). A esquerda da seqüência está representado o número identificador da seqüência e à direita entre parênteses o número de freqüência do peptídeo quando apareceu mais de uma vez na população selecionada.

Após três ciclos de seleções foram obtidos 107 seqüências peptídicas distintas (Seq. ID Nº 1 a Seq. ID Nº 107) representadas por peptídeos recombinantes expressos em bacteriófagos filamentosos (46 clones da biblioteca Ph.D.-12mer, 28 clones da biblioteca Ph.D.-C7C, 5 clones da biblioteca F88-15mer, 11 clones da biblioteca Cys3, 3 clones da biblioteca Cys6 e 14 clones da biblioteca Fuse-6mer). O maior número de clones foi obtido pela utilização das bibliotecas Ph.D.-12mer e Ph.D.-C7C. A biblioteca Cys3 apresentou a menor variabilidade de seqüências. Os peptídeos Seq. ID Nº 47, Seq. ID Nº 91, Seq. ID Nº 18, Seq. ID Nº 1, Seq. ID Nº 2, Seq. ID Nº 75, Seq. ID Nº 76, Seq. ID Nº 80 foram os mais freqüentes nas seleções.

A caracterização dos peptídeos e motivos protéicos obtidos foi realizada por análises de *in silico* (Tabela 3). Neste estudo foram analisados 107 peptídeos, com extensões de 6 até 16 aminoácidos por peptídeo, totalizando 1109 aminoácidos. Os aminoácidos leucina (L), prolina (P) e serina (S) apresentaram as maiores freqüências, com seus valores de 0,1001; 0,0974 e 0,0956 respectivamente.

Tabela 2 - Sequências de aminoácidos dos peptídeos expressos nos fagos selecionados pelos anticorpos policlonais de galinhas imunizadas com proteínas totais de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

| Ph.D. -12mer            |                  | Ph.D. -12mer            |               | Ph.D. -C7C              |             | F88-15mer               |                    | Fuse-6mer               |           |
|-------------------------|------------------|-------------------------|---------------|-------------------------|-------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|-----------|
| Seq. ID N <sup>os</sup> |                  | Seq. ID N <sup>os</sup> |               | Seq. ID N <sup>os</sup> |             | Seq. ID N <sup>os</sup> |                    | Seq. ID N <sup>os</sup> |           |
| 1                       | FQNIASMPHLYV(11) | 29                      | APYDTPWPSPSL  | 47                      | PLEKSHL(32) | 75                      | WSSTVLRVSPTRTVP(8) | 94                      | PGPRFF(2) |
| 2                       | SVQERYYAFWST(10) | 30                      | CLHCKYTLQQQA  | 48                      | PLSKMHI(5)  | 76                      | SDYTLTAVIPAPRSL(8) | 95                      | QLHTSI(2) |
| 3                       | WGTHTSYPWRLS(9)  | 31                      | GALIYTPKEYTI  | 49                      | SLHSHLS(3)  | 77                      | AYQLGYSPPLPNPH(2)  | 96                      | QVHTSI(2) |
| 4                       | DRWNSMWKESLL(6)  | 32                      | IDPLMFKYWYNM  | 50                      | PTEKKHV(2)  | 78                      | VEAXRQDRPRLASTV    | 97                      | RLLYGS(2) |
| 5                       | QFTPDKHMMLP(4)   | 33                      | GPYDTPMFSLNM  | 51                      | PWSKMHI     | 79                      | SWRPWSDSPQCGNPI    | 98                      | CXCNQL(2) |
| 6                       | NLVADFPRLLS(4)   | 34                      | HAWQSKTPDKTR  | 52                      | DPHVFKS     | Cys3                    |                    |                         |           |
| 7                       | YTLGHFHGQPQL(3)  | 35                      | HTQHSPMVSVEF  | 53                      | EPNPTRL     | Seq. ID N <sup>os</sup> |                    | 100                     | HGLYGS    |
| 8                       | GHFPPTPIKTLA(2)  | 36                      | HVRIPPTMPEAW  | 54                      | FGSSAG      | 80                      | DKSKKCEKNCAPMV(7)  | 101                     | MLHTSM    |
| 9                       | APHNKWPHLNPP     | 37                      | IDSNHVYKDFLT  | 55                      | FHRHPLE     | 81                      | KFQNGCAHPCHKKP(3)  | 102                     | NLHTSF    |
| 10                      | AHSEMGTRATMT     | 38                      | IPYTHAHADHTL  | 56                      | GGNFRA      | 82                      | AAPKMCSTWCQMWQ     | 103                     | PAPRFF    |
| 11                      | AQMIIRLSSPGN     | 39                      | SSKLTFFIDFHRN | 57                      | GLHANLQ     | 83                      | AKLITCSKTCSDKWQ    | 104                     | PLHTSL    |
| 12                      | FSKSSSWESWLP     | 40                      | SHDGASSKIRPA  | 58                      | GLHSGIQ     | 84                      | ALTVRCTAPCPQRN     | 105                     | PMRFF     |
| 13                      | DMSYYYALPTYT     | 41                      | SIPTYTPDKVTY  | 59                      | GSRTPLQ     | 85                      | AWXGCTPNCEETC      | 106                     | QLLYGS    |
| 14                      | LGMSTNPGPRIL     | 42                      | SQKYFNDDLDDHQ | 60                      | KHTSLAS     | 86                      | DSQKPCCKCHCTMTQ    | 107                     | RGPMFF    |
| 15                      | MAITDHPGSAMV     | 43                      | KPVVGMPIVEVW  | 61                      | KLHNNGS     | 87                      | GQKKKCVRDCLPAT     |                         |           |
| 16                      | NLNHWYKSWLLP     | 44                      | SVPLAKRHLISL  | 62                      | LAHPFTP     | 88                      | HKYLYCTGKCNTKA     |                         |           |
| 17                      | YTSLPAPMQRLP     | 45                      | SWSSAERLYTMN  | 63                      | NLHLGLA     | 89                      | LNEKQCTRPCLHLT     |                         |           |
| 18                      | DAWKMRLSQMYD(22) | 46                      | SYGSSVTQHLAT  | 64                      | NSRTWLT     | 90                      | QTKSECTEVCKNLT     |                         |           |
| 19                      | VNYNGKEHLLIP(9)  |                         |               | 65                      | NTFQAFY     | Cys6                    |                    |                         |           |
| 20                      | IDPLMFKYWSNM(7)  |                         |               | 66                      | PISKEHV     | Seq. ID N <sup>os</sup> |                    | EQATCDHTNEWCAKMM(28)    |           |
| 21                      | SPLNNFYKTQLR(3)  |                         |               | 67                      | PLAKQHL     | 91                      |                    |                         |           |
| 22                      | VNWNWHKTNLS(3)   |                         |               | 68                      | PMSKSHL     | 92                      | HNKRCDYIIAECNVMP   |                         |           |
| 23                      | AGLPNHNAMLLT(2)  |                         |               | 69                      | PPEKIHV     | 93                      | MEPMCXPGRKFCNIPS   |                         |           |
| 24                      | NAWLQEPNHRNL(2)  |                         |               | 70                      | PPEKSHL     |                         |                    |                         |           |
| 25                      | TLFTPDKSPAKT(2)  |                         |               | 71                      | SLHSSVQ     |                         |                    |                         |           |
| 26                      | SNNADYKQSLLL(2)  |                         |               | 72                      | SLHTTQR     |                         |                    |                         |           |
| 27                      | GALHQEPSSNLF(2)  |                         |               | 73                      | SLLASTT     |                         |                    |                         |           |
| 28                      | GLFTPDKSPAKT(2)  |                         |               | 74                      | YHAHPLD     |                         |                    |                         |           |

Tabela 3 - Frequência dos aminoácidos constituintes das sequências dos peptídeos selecionados pelas IgYs.

| AA       | #1 | #2 | #3 | #4 | #5 | #6 | #7 | #8 | #9 | #10 | #11 | #12 | #13 | #14 | #15 | #16 | T.         | Freq.         |
|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|---------------|
| A        | 10 | 9  | 4  | 4  | 5  | 4  | 5  | 4  | 1  | 4   | 4   | 4   | 2   | 1   | 0   | 0   | 61         | 0.0550        |
| C        | 2  | 0  | 1  | 1  | 3  | 11 | 0  | 1  | 0  | 11  | 1   | 3   | 0   | 1   | 0   | 0   | 35         | 0.0316        |
| D        | 6  | 4  | 1  | 2  | 4  | 4  | 4  | 2  | 4  | 1   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 33         | 0.0298        |
| E        | 2  | 2  | 5  | 2  | 2  | 3  | 3  | 3  | 1  | 3   | 3   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 30         | 0.0271        |
| F        | 4  | 2  | 4  | 1  | 7  | 12 | 0  | 1  | 2  | 1   | 1   | 2   | 0   | 0   | 0   | 0   | 37         | 0.0334        |
| G        | 11 | 8  | 1  | 2  | 10 | 2  | 1  | 5  | 0  | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 42         | 0.0379        |
| H        | 6  | 7  | 16 | 7  | 4  | 11 | 5  | 4  | 4  | 2   | 2   | 1   | 0   | 0   | 1   | 0   | 70         | 0.0631        |
| I        | 4  | 2  | 1  | 5  | 2  | 3  | 3  | 2  | 3  | 1   | 2   | 1   | 0   | 1   | 1   | 0   | 31         | 0.0280        |
| K        | 4  | 3  | 6  | 16 | 5  | 5  | 7  | 7  | 4  | 2   | 3   | 2   | 2   | 1   | 0   | 0   | 67         | 0.0604        |
| <b>L</b> | 3  | 23 | 10 | 9  | 3  | 10 | 7  | 4  | 5  | 8   | 18  | 8   | 2   | 0   | 1   | 0   | <b>111</b> | <b>0.1001</b> |
| M        | 3  | 3  | 2  | 2  | 8  | 3  | 3  | 3  | 1  | 2   | 3   | 5   | 1   | 0   | 2   | 1   | 42         | 0.0379        |
| N        | 7  | 5  | 5  | 8  | 4  | 2  | 1  | 1  | 3  | 3   | 5   | 4   | 4   | 1   | 0   | 0   | 53         | 0.0478        |
| <b>P</b> | 13 | 10 | 10 | 6  | 9  | 4  | 13 | 6  | 12 | 6   | 3   | 10  | 0   | 3   | 2   | 1   | <b>108</b> | <b>0.0974</b> |
| Q        | 5  | 5  | 5  | 2  | 5  | 2  | 4  | 2  | 4  | 3   | 3   | 2   | 0   | 3   | 0   | 0   | 45         | 0.0406        |
| R        | 2  | 1  | 6  | 3  | 3  | 5  | 4  | 5  | 1  | 6   | 1   | 3   | 2   | 0   | 0   | 0   | 42         | 0.0379        |
| <b>S</b> | 16 | 6  | 12 | 11 | 17 | 8  | 8  | 7  | 9  | 2   | 4   | 3   | 1   | 1   | 0   | 1   | <b>106</b> | <b>0.0956</b> |
| T        | 1  | 6  | 5  | 16 | 8  | 6  | 12 | 2  | 3  | 4   | 6   | 9   | 3   | 4   | 0   | 0   | 85         | 0.0766        |
| V        | 3  | 4  | 2  | 3  | 1  | 3  | 4  | 3  | 2  | 2   | 1   | 2   | 0   | 3   | 1   | 0   | 34         | 0.0307        |
| W        | 2  | 4  | 5  | 0  | 3  | 2  | 3  | 0  | 5  | 2   | 1   | 2   | 2   | 0   | 0   | 0   | 31         | 0.0280        |
| X        | 0  | 1  | 0  | 2  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 4          | 0.0036        |
| Y        | 3  | 2  | 6  | 5  | 4  | 6  | 6  | 3  | 1  | 2   | 3   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 42         | 0.0379        |
| total AA |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     | 1109       |               |

X – representa aminoácidos não identificados.

Tabela 4 – Determinação das seqüências consenso.

| Consenso                | Freqüência   | Consenso              | Freqüência   |
|-------------------------|--------------|-----------------------|--------------|
| VNYNGKEHLLIP            | 9/74         | GLF <b>TPDKS</b> PAKT | 2/74         |
| SNNADYKQSLLL            | 2/74         | SIPTY <b>TPDKV</b> TY | 1/74         |
| VNWN <b>SWHKT</b> NLS   | 3/74         | HAWQSK <b>TPDK</b> TR | 1/74         |
| SPL <b>NNFYKTQ</b> LR   | 3/74         | TLF <b>TPDKS</b> PAKT | 2/74         |
| IDS <b>NHVKDF</b> LT    | 1/74         | GALIY <b>TPEKY</b> TI | 1/74         |
| MNSWY <b>KFMLPDI</b> ** | 7/74         | GPYD <b>TPMFSL</b> NM | 1/74         |
| DAWK <b>MRLSQMYD</b>    | 22/74        | APYD <b>TPWPSPSL</b>  | 1/74         |
| (SC1) <b>NxxxKxxL*</b>  | <b>65,0%</b> | (SC2) <b>TPDKS</b>    | <b>12,0%</b> |
| <u>PLEKSHL</u>          | 32/66        | GLHSGIQ               | 1/66         |
| <u>PLSKMHI</u>          | 5/66         | SLHSSVQ               | 1/66         |
| <u>PTEKKHV</u>          | 2/66         | SLHSHLS               | 3/66         |
| <u>PWSKMHI</u>          | 1/66         |                       |              |
| <u>PISKEHV</u>          | 1/66         | (SC4) <b>LHS</b>      | <b>7,5%</b>  |
| <u>PLAQHL</u>           | 1/66         | SLHSHLS               | 3/66         |
| <u>PMSKSHL</u>          | 1/66         | GLHANLQ               | 1/66         |
| <u>PPEKIHV</u>          | 1/66         | NLHLGLA               | 1/66         |
| <u>PPEKSHL</u>          | 1/66         | (SC5) <b>LHxxL</b>    | <b>7,5%</b>  |
| (SC3) <b>PxxKxH</b>     | <b>68,2%</b> |                       |              |
| QL <b>HTSI</b>          | 2/19         | <b>PGPRFF</b>         | 2/19         |
| QV <b>HTSI</b>          | 2/19         | <b>PAPRFF</b>         | 1/19         |
| G <b>HTSLR</b>          | 1/19         | <b>PMRFF</b>          | 1/19         |
| ML <b>HTSM</b>          | 1/19         | <b>RGPMFF</b>         | 1/19         |
| NL <b>HTSF</b>          | 1/19         | (SC7) <b>PxFF</b>     | <b>26%</b>   |
| PL <b>HTSL</b>          | 1/19         | RLLYGS                | 2/19         |
| (SC6) <b>HTS</b>        | <b>42%</b>   | QLLYGS                | 1/19         |
|                         |              | HGLYGS                | 1/19         |
|                         |              | (SC8) <b>LYGS</b>     | <b>21%</b>   |

\* Letras em negrito denotam resíduos conservados.

\*\*seqüência inversa ao peptídeo IDPLMFKYWSNM

Sublinhado = Aminoácidos alifáticos

As seqüências consenso foram alinhadas e caracterizadas na Tabela 4. A representação do alinhamento linear múltiplo entre as seqüências de aminoácidos selecionados foi disposta de acordo com a respectiva seleção biológica. Em cada subgrupo alinhado foram apresentadas as seqüências consenso (SC) em negrito e a freqüência individual de cada peptídeo, assim como a freqüência da seqüência consenso em cada sub-população. Desta forma, as letras em negrito denotam resíduos conservados e os aminoácidos

sublinhados denotam os aminoácidos alifáticos. Assim, oito grupos de peptídeos formaram seqüências consenso por alinhamento múltiplo, sendo os motivos NxxxKxxL (SC1), TPDKS (SC2), PxxKxH (SC3), LHS (SC4), LHxxL (SC5), HTS (SC6), PxFF (SC7), e LYGS (SC8). Os motivos mais freqüentes nas sub-populações selecionadas foram PxxKxH, NxxxKxxL e HTS, sendo 68,2%, 65% e 42%, respectivamente. O motivo TPDKS, contendo as seqüências sobrepostas, TPDKS em 7 peptídeos, apresenta as seqüências consenso TPD, TPxK, TPxxS sendo constituídos em 4 peptídeos para cada. Nestas seqüências, foi mantida constante os aminoácidos TP ao longo de 7 clones distintos. O motivo consenso foi considerado quando ocorreu 3 ou mais vezes em clones distintos.

A similaridade entre as seqüências consenso com as proteínas do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* depositadas no *GENEBANK* foi determinada na Tabela 5. Foi determinado em ordem seqüencial o número identificador da seqüência similar para cada consenso (Nº), a posição do alinhamento do peptídeo com o motivo protéico da proteína original (Pos), o número de acesso (Nº Acesso) e por último o nome da proteína. O alinhamento revelou similaridades dos motivos com várias proteínas antigênicas e ainda, proteínas com funções celulares importantes.

Para o motivo TPDKS, foram consideradas no alinhamento a presença de no mínimo 3 identidades exatas, pois o motivo completo não gerou alinhamento. A seqüência consenso PxxKxH não gerou alinhamentos com proteínas depositadas em bancos de dados. A seqüência consenso NXXXKXXL alinhou com as proteínas: metaloprotease de glândula salivar, receptor associado a protein-G, calreticulina, glutathione S-transferase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. O consenso TPDKS alinhou com pelo menos em 3 aminoácidos com as proteínas: catepsina de ovo, Bm95, precursor de GP80, cistatina intracelular, proteína intestinal Bm86, fosfolipídeos, metaloprotease de glândula salivar, precursor de proteína tipo catepsina, paramiosina, calreticulina, antígeno B membrana, P450 CYP319A, Proteinase

aspartática ligante de heme, proteína tipo transcriptase reversa e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Para os motivos obtidos nas seqüências peptídicas das bibliotecas Fd – tet (Tabela 5), a seqüência LHS alinhou apenas com uma proteína de secreção e uma P450 CYP319A. O consenso LHXXL apresentou os seguintes alinhamentos: acetilcolinesterase, precursor de GP80, proteína intestinal Bm86, paramiosina, P450 CYP319A1, esterase e enzima conversora de angiotensinogênio. O consenso HTS alinhou com a proteína precursora de GP80 e antígeno protetor 4D8. O consenso PXFF alinhou com citocromo oxidase subunidade 1, NADH desidrogenase subunidade 2 e citocromo P450. Por último, o consenso LYGS alinhou com acetilcolinesterase, catepsina de ovo, precursor de GP80, isoforma de glucose 6-fosfato desidrogenase, actina, metaloprotease de glândula salivar, ferritina, antígeno B membrana, acetilcolinesterase, esterase, proteinase aspartática ligante de heme, citocromo P450, proteína relacionada à carboxilesterase, citocromo P450 4W1 e enzima conversora de angiotensina.

Tabela 5- Similaridade entre as seqüências consenso com as proteínas do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* depositadas no GENE BANK.

| Nº                                 | Pos  | Nº Acesso      | Proteína                              |
|------------------------------------|------|----------------|---------------------------------------|
| Seqüência consenso (SC1): nxxxkxxl |      |                |                                       |
| 1                                  | 493  | gb AAZ39658.1  | Metaloprotease de glând. salivar      |
| 2                                  | 419  | emb CAA09335.1 | Receptor associado a proteína G       |
| 3                                  | 411  | gb AAN03709.1  | Calreticulina                         |
| 4                                  | 223  | gb AAD15991.1  | Glutathione S-transferase             |
| 5                                  | 338  | gb AAR22391.2  | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase |
| Seqüência consenso (SC2): tpdks    |      |                |                                       |
| 1                                  | 352  | gb AAX76981.1  | Catepsina de ovo                      |
| 2                                  | 569  | gb AAD38381.2  | Bm95                                  |
| 3                                  | 1289 | gb AAA92143.1  | Precursor de GP80                     |
| 4                                  | 98   | gb ABG36931.1  | Cistatina intracelular                |
| 5                                  | 264  | gb AAW72968.1  | Proteína intestinal Bm86              |
| 6                                  | 169  | gb ABA62394.1  | Fosfolipídeos                         |
| 7                                  | 506  | gb AAZ39661.1  | Metaloprotease de glând. salivar      |
| 8                                  | 332  | gb AAF61565.1  | Precurs. proteína tipo catepsina      |

|                                  |      |                |                                             |
|----------------------------------|------|----------------|---------------------------------------------|
| 9                                | 873  | gb AAO20875.1  | Paramiosina                                 |
| 10                               | 411  | gb AAN03709.1  | Calreticulina                               |
| 11                               | 978  | gb AAN15115.1  | Antígeno B membrana                         |
| 12                               | 531  | gb AAF91384.1  | P450 CYP319A1                               |
| 13                               | 354  | gb AAG00993.1  | Proteinase asp. ligante de heme             |
| 14                               | 510  | gb AAV85444.1  | Proteína tipo transc. reversa               |
| 15                               | 338  | gb AAR22391.2  | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase       |
| Seqüência consenso (SC3): PxxKxH |      |                | Não gerou alinhamentos                      |
| Seqüência consenso (SC4): LHS    |      |                |                                             |
| 1                                | 353  | gb ABA55034.1  | Proteína de secreção                        |
| 2                                | 531  | gb AAF91384.1  | P450 CYP319A1                               |
| Seqüência consenso (SC5): LHXXL  |      |                |                                             |
| 1                                | 595  | emb CAA11702.1 | Acetilcolinesterase                         |
| 2                                | 1289 | gb AAA92143.1  | Precursor de GP80                           |
| 3                                | 264  | gb AAW72945.1  | Proteína intestinal Bm86                    |
| 4                                | 873  | gb AAO20875.1  | Paramiosina                                 |
| 5                                | 531  | gb AAF91384.1  | P450 CYP319A1                               |
| 6                                | 543  | gb AAF00496.1  | Esterase                                    |
| 7                                | 660  | gb AAB04998.1  | Enz. conv. de angiotensinogênio             |
| Seqüência consenso (SC6): HTS    |      |                |                                             |
| 1                                | 1289 | gb AAA92143.1  | Precursor de GP80                           |
| 2                                | 147  | gb ABA62330.1  | Antígeno protetor 4D8                       |
| Seqüência consenso (SC7): PXFF   |      |                |                                             |
| 1                                | 156  | gb AAD28383.1  | Citocromo oxidase subunidade 1              |
| 2                                | 71   | gb AAD28382.1  | NADH desid. subunidade 2                    |
| 3                                | 518  | gb AAD54000.1  | Citocromo P450                              |
| Seqüência consenso (SC8): LYGS   |      |                |                                             |
| 1                                | 595  | emb CAA11702.1 | Acetilcolinesterase                         |
| 2                                | 352  | gb AAX76981.1  | Catepsina de ovo                            |
| 3                                | 1289 | gb AAA92143.1  | Precursor de GP80                           |
| 4                                | 465  | gb ABN05381.1  | Isoforma de glucose 6-fosfato desidrogenase |
| 5                                | 376  | gb AAP79880.1  | Actina                                      |
| 6                                | 559  | gb AAZ39660.1  | Metaloprotease de glând. salivar            |
| 7                                | 172  | gb AAP72263.1  | Ferritina                                   |
| 8                                | 978  | gb AAN15115.1  | Antígeno B membrana                         |
| 9                                | 563  | gb AAC18857.1  | Acetilcolinesterase                         |
| 10                               | 544  | gb AAF00497.1  | Esterase                                    |
| 11                               | 354  | gb AAG00993.1  | Proteinase aspart. ligante heme             |
| 12                               | 518  | gb AAD54000.1  | Citocromo P450                              |
| 13                               | 119  | gb AAD28573.1  | Proteína rel. a carboxilesterase            |
| 14                               | 549  | gb AAD40966.1  | Citocromo P450 4W1                          |
| 15                               | 660  | gb AAB04998.1  | Enz. conversora de angiotensina             |
| # Sequências escaneadas = 198    |      |                | # aa presentes nestas sequências = 62584    |

A similaridade entre uma população de peptídeos e um grupo de seqüências de proteínas depositadas no *GENEBANK* do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi determinada por análises de alinhamento múltiplo pela utilização do programa *FastaScan* (<http://relic.bio.anl.gov/fastaskan.aspx>). O resultado gerou uma lista de proteínas classificadas em ordem decrescente de similaridade com os peptídeos. Os *scores* foram gerados pelo cálculo da similaridade de cada seqüência peptídica ao longo da seqüência protéica. Na Tabela 6, as 206 proteínas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* descritas no *GENEBANK* foram classificadas de acordo com a similaridade com a população total (107) de peptídeos. Na tabela 6 foram indicadas apenas as dez proteínas com os maiores índices de similaridade. Na Tabela 7 foi realizado a mesma análise, sendo feita a divisão das sub-populações de peptídeos selecionados, de acordo com as sete estratégias de seleção adotadas, e classificadas em ordem decrescente de similaridade sendo, neste caso, representado apenas a proteína com maior índice de similaridade para cada estratégia de seleção.

Tabela 6 – Busca de similaridade entre o total de peptídeos selecionados (107) em todas as estratégias de seleção (S1 – S7) contra o total de proteínas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resgatadas do *GENEBANK*.

| Classif. | Score  | Nº Acesso      | Proteína similar                 |
|----------|--------|----------------|----------------------------------|
| 1        | 107.92 | gb AAA92143.1  | GP80                             |
| 2        | 69.31  | gb ABA55034.1  | Proteína de secreção             |
| 3        | 50.50  | gb AAN06819.1  | Proteína tipo <i>notch</i>       |
| 4        | 47.52  | gb AAD23600.2  | Canal de sódio                   |
| 5        | 44.55  | gb AAF72891.1  | Receptor peptídico leucokini     |
| 6        | 44.55  | gb AAZ39661.1  | Metaloprotease de glând. salivar |
| 7        | 44.55  | gb AAX76981.1  | Catepsina de ovo                 |
| 8        | 43.56  | emb CAA09335.1 | Receptor associado a proteína G  |
| 9        | 41.58  | gb ABA41641.1  | BM86                             |
| 10       | 41.58  | gb ABN73103.1  | glicose 6-phosphate desid. C     |

Tabela 7 – Busca de similaridade entre uma população de peptídeos obtidas em cada uma das sete seleções (S1-S7) e as seqüências de proteínas do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* depositadas no *GENEBANK*.

| Seleção   | Score  | Nº Acesso     | Proteína similar                |
|-----------|--------|---------------|---------------------------------|
| <b>S1</b> | 233.33 | sp P83609     | BmTI-A                          |
| <b>S2</b> | 178.57 | gb ABG36931.1 | Cistatina intracelular          |
| <b>S3</b> | 259.26 | gb AAQ89933.1 | Receptor de serotonina          |
| <b>S4</b> | 650.00 | gb AAD23600.2 | Canal de sódio                  |
| <b>S5</b> | 470.00 | sp P81162     | Protease inibidora de carrapata |
| <b>S6</b> | 666.67 | gb AAZ41842.1 | BM86                            |
| <b>S7</b> | 657.14 | gb AAA92143.1 | Precursor de GP80               |

Posteriormente foi investigada a presença de similaridade entre os peptídeos e as proteínas depositadas no *GENEBANK*, restritas ao carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, pela utilização de uma busca simples realizada pelo BLAST. Na Tabela 8 os alinhamentos foram classificados em ordem decrescente de freqüências de identidades presentes nos peptídeos recombinantes (colunas 1 e 3). Foram alinhadas 66 proteínas distintas referentes ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Foram destacadas na tabela 8, as três proteínas que apresentaram o maior número de motivos protéicos, sendo as metaloproteases de glândula salivar, as proteínas *Notch Like* e a precursora de GP80. A freqüência foi representada pelo número de peptídeos contendo 4 ou mais identidades. Foi possível constatar que determinados motivos dos aminoácidos aparecem mais de uma vez em uma mesma proteína, sendo representados na quarta coluna denominada *match*.

Na Tabela 9, na primeira coluna foi apresentada a relação do número de peptídeos similares as EST, sendo encontrados 8 peptídeos distintos com alinhamentos positivos que foram similares com 8 distintas proteínas preditas a partir de ESTs. Na segunda coluna foi apresentado o número de acesso da seqüência depositada no *GENEBANK*. Na terceira coluna a identificação do clone contendo a seqüência de RNA mensageiro e por fim, os aminoácidos que apresentaram identidade entre as duas seqüências comparadas.

Tabela 8 - Alinhamentos em ordem decrescente de freqüências de peptídeos mimetopos similares às proteínas depositadas no *GENEBANK*.

| Nº | Proteínas                              | Frequencia | Similaridade |
|----|----------------------------------------|------------|--------------|
| 1  | Metaloproteases de glândulas salivares | 28         | 35           |
| 2  | Proteína <i>Notch-like</i>             | 27         | 43           |
| 3  | Precursora de GP80                     | 27         | 36           |
| 4  | Esterase                               | 17         | 19           |
| 5  | Antígeno B de membrana                 | 14         | 16           |
| 6  | Calreticulina                          | 14         | 14           |
| 7  | Canal de sódio                         | 12         | 13           |
| 8  | Proteína tipo transcriptase reversa    | 11         | 12           |
|    | P450 CYP319A1                          | 11         | 12           |
| 9  | Paramiosina                            | 11         | 11           |
| 10 | Acetilcolinesterase                    | 10         | 12           |

Tabela 9 – Representação de similaridades entre os peptídeos recombinantes e as proteínas preditas de ESTs de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* depositadas no *GENEBANK*.

| Seqüência     | Nº Acesso     | Seq. (mRNA)   | Identidade de AA |
|---------------|---------------|---------------|------------------|
| Seq. ID Nº 4  | gb CV447142.1 | clone BEAFD73 | WNS WK+ L+       |
| Seq. ID Nº 22 | gb CV442976.1 | clone BEAEP08 | WNSW+ +NL        |
| Seq. ID Nº 24 | gb CV443271.1 | clone BEAEQ76 | +W+Q +HRNL       |
| Seq. ID Nº 42 | gb CK192020.1 | clone BEAD714 | ++K+FND++DH      |
| Seq. ID Nº 75 | gb CV455770.1 | clone BEAGS85 | S VLRVSP R P     |
| Seq. ID Nº 79 | gb CV445416.1 | clone BEAF345 | RP + SP CG P     |
| Seq. ID Nº 81 | gb CK185650.1 | clone BEAC593 | Q G HPCH P       |
| Seq. ID Nº 93 | gb CK183322.1 | clone BEABS50 | ME C P R+ NIP+   |

## Estudo da imunoreatividade dos clones de fagos recombinantes selecionados

---

Diversos estudos foram realizados para a validação da seleção dos clones através da análise das interações específicas entre os peptídeos selecionados e as IgYs de galinhas anti-proteínas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

A Figura 9 refere-se ao teste ELISA no qual foi verificado a imunoreatividade de 370 clones de fagos em sobrenadante de meio de cultura, obtidos na seleção S1. A imunoreatividade dos fagos foi determinada contra os anticorpos IgY purificadas de soro de galinhas anti-proteínas de teleóginas (alvo biológico). Foi possível escolher 48 clones de fagos imunoreativos para o seqüenciamento de DNA da região correspondente ao inserto (biblioteca Ph.D.-12mer). O índice ELISA (IE) para os ensaios 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 da DO do fago M13 selvagem (controles negativos). Os fagos foram incubados paralelamente com IgYs purificadas de soro negativo pré-imune dos mesmos animais testados. Os IEs maiores que 1 foram considerados positivos e os IEs menores que 1 foram considerados negativos.

Na Figura 10 foi representado o perfil de imunoreatividade de 48 clones, obtidos após a estratégia de seleção S3 (biblioteca Ph.D.-C7C). Os resultados avaliados por valores de índices-ELISA foram significativos, embora com perfis diferenciados entre os fagos testados e os controles (fago M13 selvagem e IgY purificadas de soro negativo pré-imune). Os clones estão discriminados de acordo com uma numeração provisória e não representam a numeração final descrita na lista.

Para a confirmação da especificidade dos peptídeos após a discriminação das seqüências pelo seqüenciamento do DNA correspondente ao inserto nos clones, foram realizados testes para a detecção de imunoreatividade contra soros de galinhas previamente imunizadas com proteínas totais de larvas e adultos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Os estudos das interações foram determinados primeiramente através do teste

*Phage* – ELISA (Figura 11) Os resultados demonstram que os peptídeos foram específicos para o alvo utilizado na seleção. A maioria dos clones apresentou reatividade, embora com perfis diferenciados entre os fagos, sendo os valores superiores ao índice ELISA (IE). Pela metodologia foi possível confirmar a especificidade da seleção em função da maioria dos clones apresentarem positividade (índice ELISA maior que 1) e também, a identificação de alguns clones com maior índice de reatividade quando comparados com os demais, tais como Seq. ID Nº 12, Seq. ID Nº 1, Seq. ID Nº 7, Seq. ID Nº 32, Seq. ID Nº 31, Seq. ID Nº 25, Seq. ID Nº 56 e Seq. ID Nº 48.

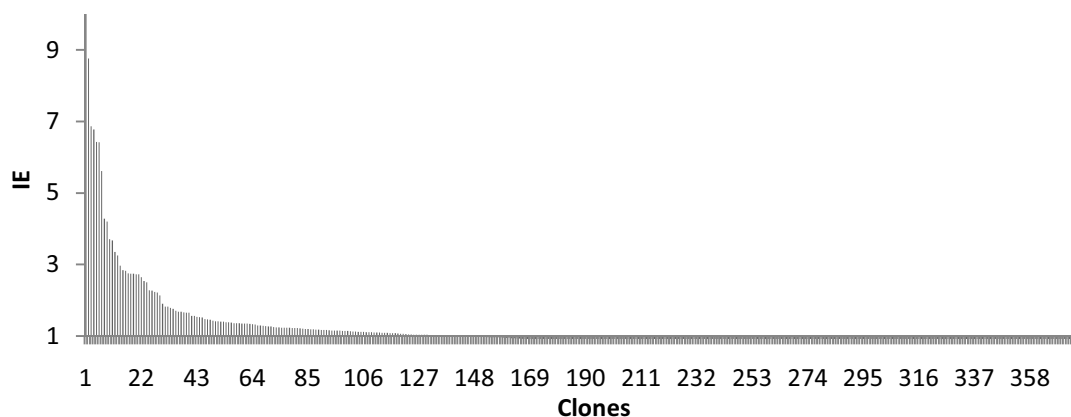


Figura 9 - Teste *Phage*-ELISA para a verificação da imunorreatividade de 360 clones de fagos, obtidos na seleção S1.

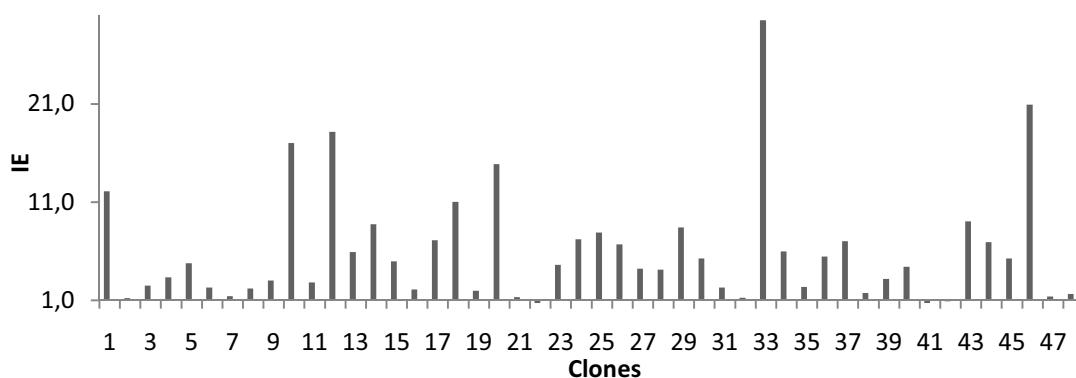


Figura 10 – *Phage*-ELISA de 48 clones de fagos, obtidos após a estratégia de seleção S3 (biblioteca Ph.D.-C7C).

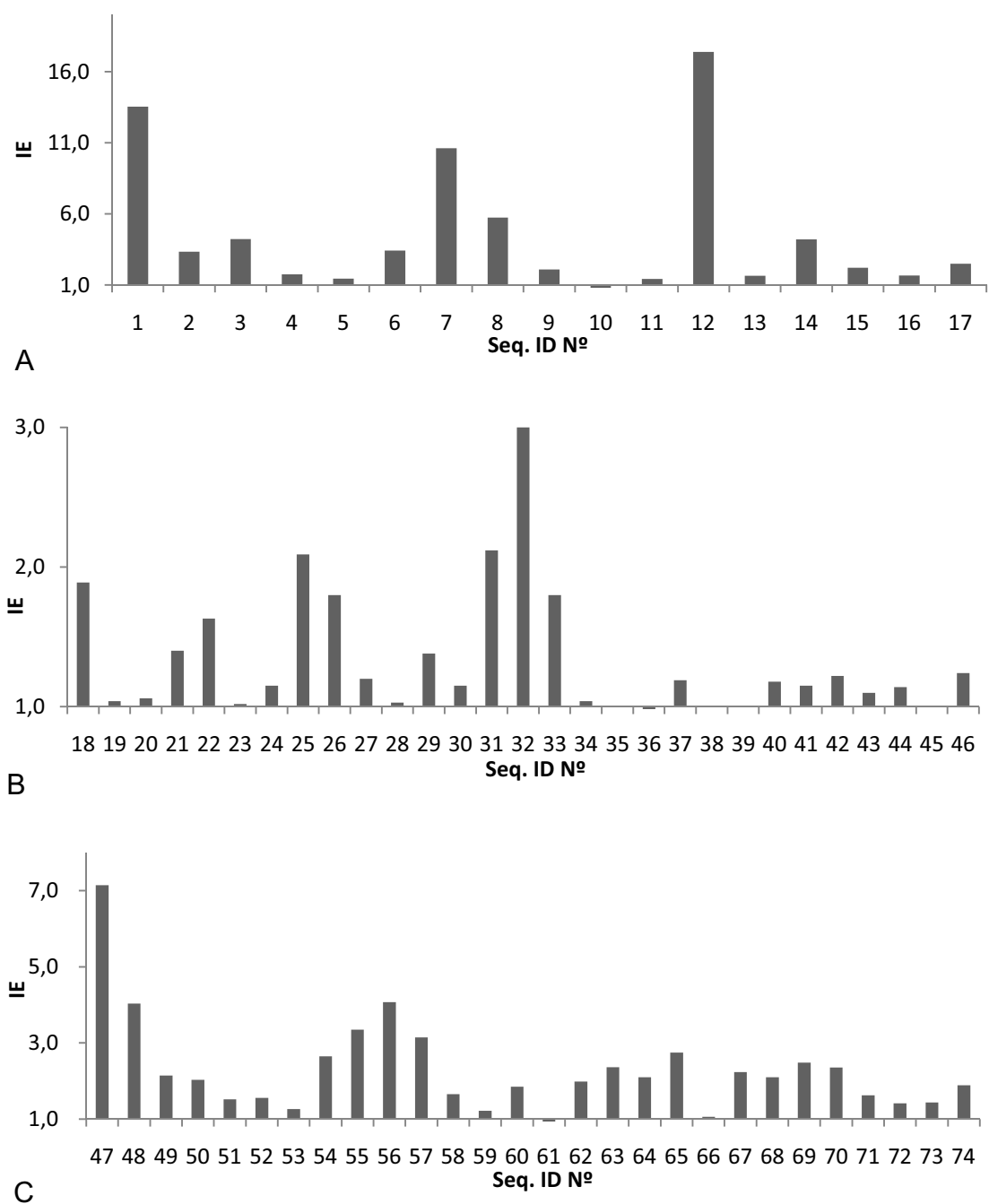


Figura 11 – A, B e C representam o *Phage* -ELISA dos clones selecionados na seleção S1, seleção S2 e a seleção S3. O grau de reatividade foi determinado por Índice-ELIS. Todos os clones foram caracterizados previamente por seqüenciamento de DNA para determinação das seqüências.

Além do teste do *Phage* ELISA a confirmação da imunoreatividade dos fagos foi também determinada por ensaios de *Dot-Blot*. Neste teste as partículas virais foram adsorvidas em membrana de nitrocelulose recortadas em tiras e incubadas com anticorpos policlonais de galinhas específicos para proteínas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Os clones mais reativos foram descritos na Figura 12. No teste de *Dot-Blot*, o controle negativo (CN) foi representado pelo fago sem inserto M13KE selvagem e está localizado na linha 7 e o controle positivo (CP) foi representado na linha 8, sendo feita a adsorção de proteínas totais de carrapato na membrana. Foi verificado por análises qualitativas que a maioria dos clones apresentou sinal superior ao controle negativo, especialmente para as seleções S2 e S3. Estes dados confirmam o alto grau de positividade dos clones determinado por ELISA. Dentre os clones com maior reatividade estão: Seq. ID Nº 9, Seq. ID Nº 11, Seq. ID Nº 17, Seq. ID Nº 22, Seq. ID Nº 25, Seq. ID Nº 26, Seq. ID Nº 27, Seq. ID Nº 28, Seq. ID Nº 40, Seq. ID Nº 41, Seq. ID Nº 47, Seq. ID Nº 50, Seq. ID Nº 67, Seq. ID Nº 69, Seq. ID Nº 70 e Seq. ID Nº 90.

Em ensaios de competição as proteínas de carrapato em diferentes concentrações, inibiram a ligação das IgYs de galinhas a determinados clones de fagos escolhidos aleatoriamente e adsorvidos em membranas de nitrocelulose por ensaios de *Dot-Blot* (Figura 13). Os dados demonstram que quantidades crescentes de proteínas solúveis de carrapato adicionadas ao soro interferem no reconhecimento das IgYs aos fagos na membrana demonstrando significativa competição pelos mesmos epítomos (figura 12 A do clone Seq. ID Nº 50). Os resultados da inibição da imunoreatividade dos fagos obtidos em duas estratégias de seleção (S2 e S3) são apresentados na figura 12 B e 12 C. O controle negativo (CN), representando o controle do vetor sem inserto, foi representado pelo fago selvagem M13KE e o controle positivo (CP) foi demonstrado pela adsorção de proteínas totais de larvas de carrapato na membrana. Estes dados indicam que os peptídeos expressos nos clones de fagos podem ser reconhecidos especificamente pelas IgYs de galinhas e estes peptídeos apresentam capacidade de mimetizarem os epítomos presentes nas

proteínas totais de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Desta forma, foi possível demonstrar a inibição da reatividade por ensaios de competição para os seguintes clones: Seq. ID Nº 12, Seq. ID Nº 15, Seq. ID Nº 18, Seq. ID Nº 22, Seq. ID Nº 26, Seq. ID Nº 32, Seq. ID Nº 47, Seq. ID Nº 48, Seq. ID Nº 50, Seq. ID Nº 51, Seq. ID Nº 69 e Seq. ID Nº 70.

Em um experimento de *Western Blot* os fagos selecionados foram separados por SDS – PAGE e transferidos para membrana de nitrocellulose a fim de investigar se as IgYs purificadas poderiam reconhecer os peptídeos fusionados nas proteínas PIII e PVIII dos clones de fagos (Figura 14, Figura 15, Figura 16 e Figura 17). Na Figura 14, os resultados do *Western Blot* foram demonstrados para os clones de fagos após a seleção S1. A seta indica a posição da proteína III contendo o peptídeo fusionado. São representadas bandas com intensidades variáveis de sinal indicando o reconhecimento dos peptídeos selecionados pelos anticorpos anti-proteínas de carrapato. Na Figura 15 e Figura 16 foi demonstrado os resultados do *Western Blot* para os clones de fagos após a seleção S2 e S3, respectivamente.

Na Figura 17 foi demonstrado os resultados do *Western Blot* para alguns clones de fagos escolhidos aleatoriamente, os quais foram obtidos após a seleção S4, S5, S6 e S7. Nestas análises a proteína PIII e a PVIII nas respectivas bibliotecas, foram reconhecidas especificamente, na maioria dos clones, embora com menores graus de intensidade pelos anticorpos de galinhas anti-proteínas de carrapato.

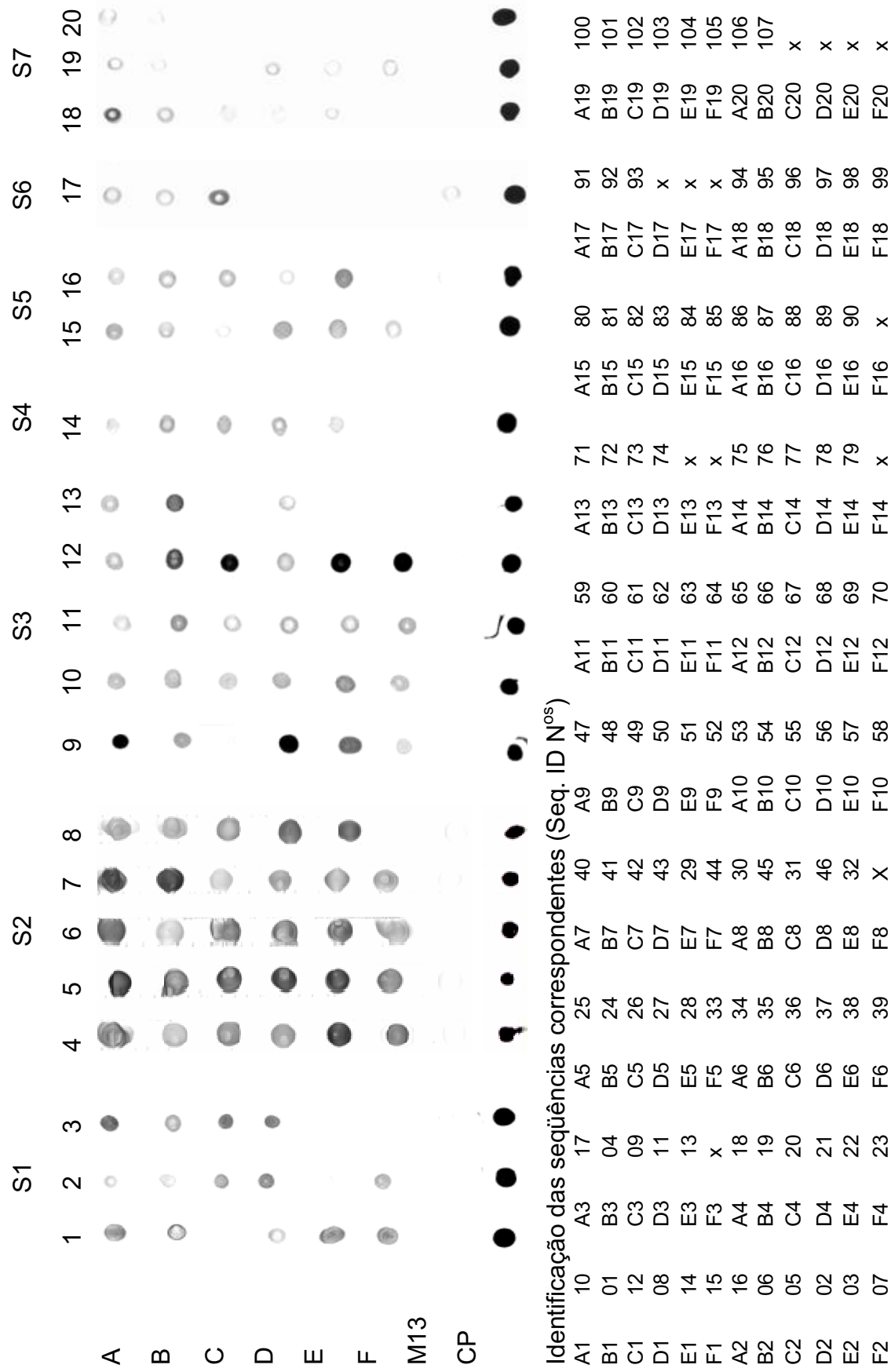


Figura 12 - Determinação da Imunoreatividade dos fagos por ensaios de *Dot Blot*. Na parte superior os *dots* estão subdivididos de acordo com a seleção (S). A localização de cada clone esta representado pelo cruzamento entre cada letra na coluna (A-F) e o número na linha superior (1-20). O controle negativo (M13) e o controle positivo (CP), representados nas duas últimas linhas de *dots*. A numeração dos clones e a localização encontra-se na parte inferior da figura.

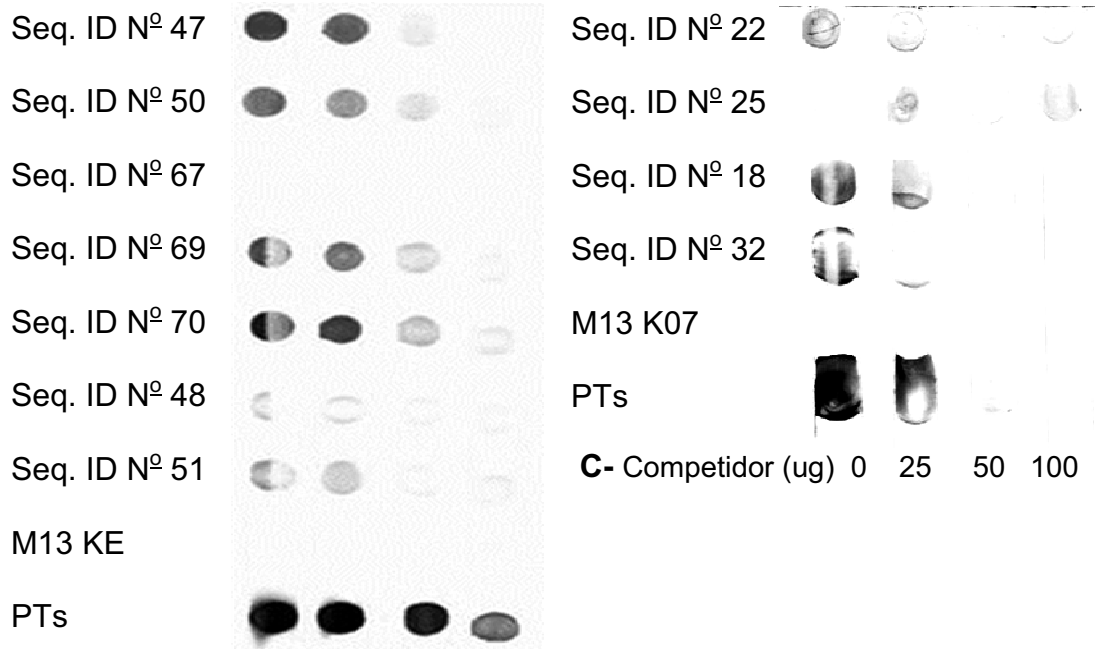
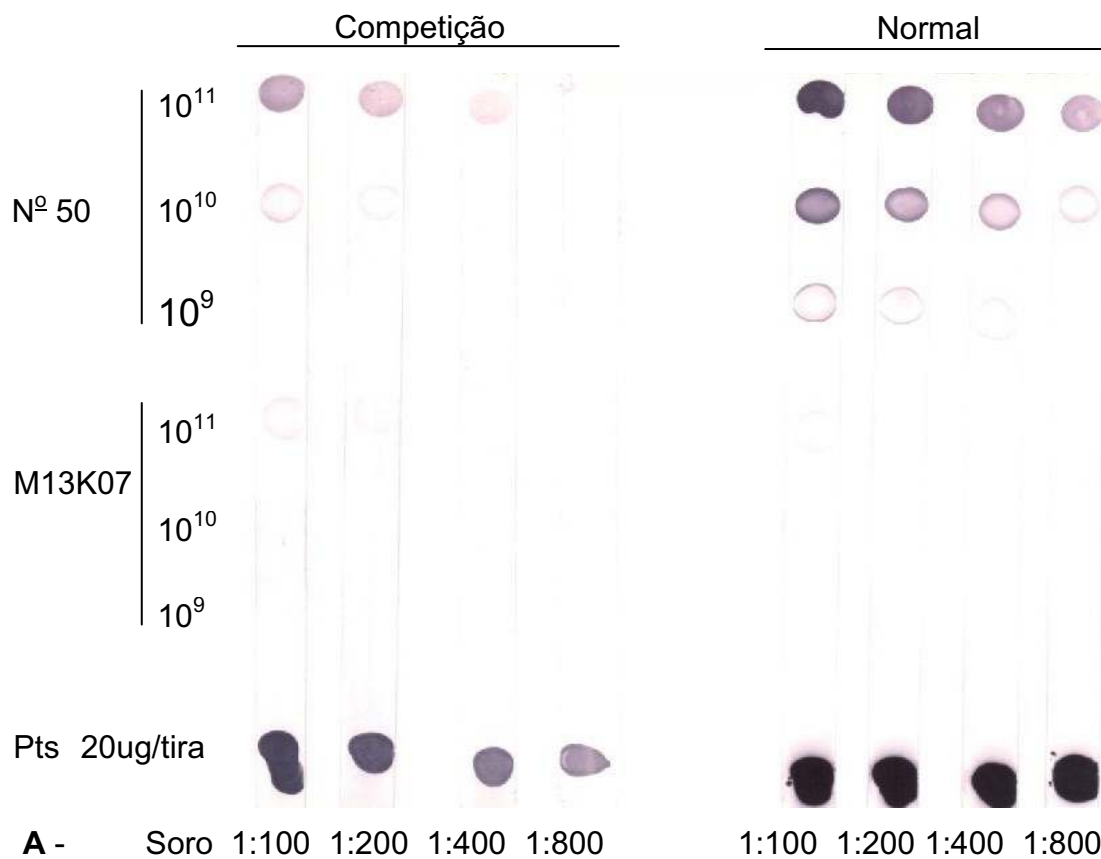


**Figura 13** - Ensaios de competição por Dot-Blots. Na figura 13 A, esquema de otimização considerando os seguintes parâmetros: concentração do fagos adsorvidos na membrana (clone 50 e fago selvagem M13KE), diluição do soro (IgY anti carrapato) e presença e ausência de competidor (proteínas totais de larvas). Na figura 13 B e 13 C, são apresentados os clones da seleção S2 e S3, respectivamente.

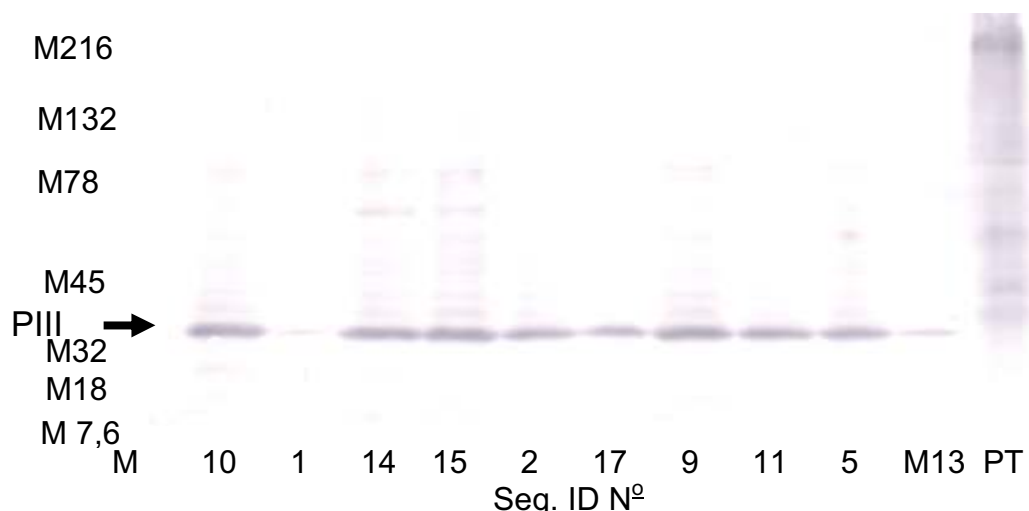


Figura 14 - *Western Blot* dos clones de fagos imunorreativos obtidos na seleção S1. Na coluna 1 está representado o marcador de peso molecular, na coluna 12 esta representado as proteínas totais do parasito como controles positivos, o fago selvagem esta representado na coluna 11 como controle negativo, a seta indica a região da presença da proteína PIII reativa aos anticorpos utilizados como alvo biologico (IgY anti - teleóginas de carrapato).

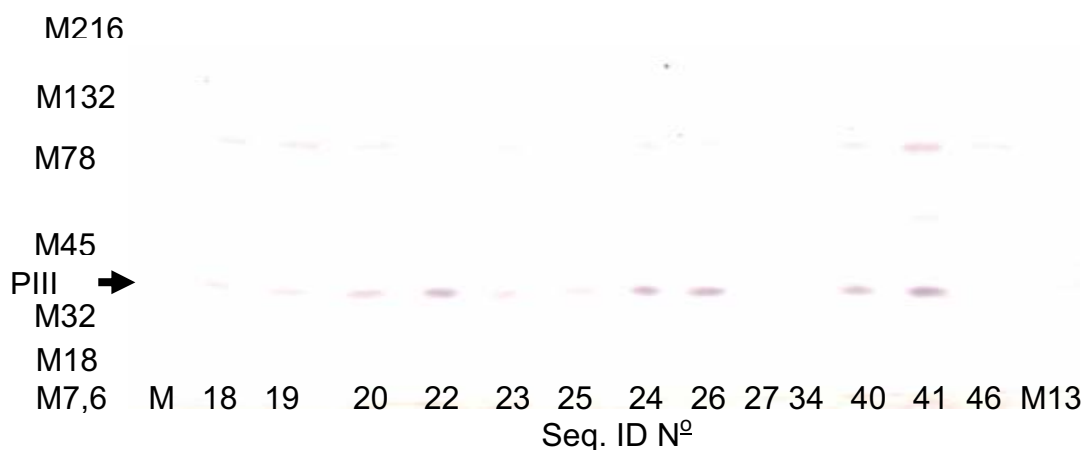


Figura 15 - *Western Blot* dos clones de fagos imunoreativos obtidos na seleção S2. Na coluna 1 está representado o marcador de peso molecular, na última coluna está representado o fago selvagem como controle negativo, a seta indica a região da presença da proteína PIII dos clones reativos aos anticorpos utilizados como alvo biológico na seleção dos fagos da biblioteca (IgY anti larvas de carrapato).

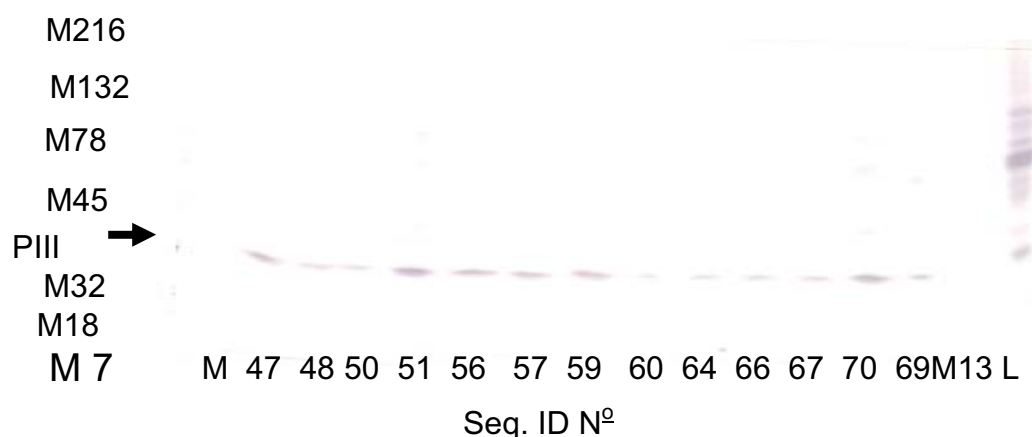


Figura 16 - *Western Blot* dos fagos imunoreativos obtidos na seleção S3. Na coluna 1 esta representado o marcador de peso molecular, na última coluna está representado as proteínas totais do parasito como controles positivos, o fago selvagem está representado na penúltima linha como controle negativo do vetor, a seta indica a região da presença da proteína PIII reativa aos anticorpos utilizados como alvo biológico (IgY anti-larvas de carrapato).

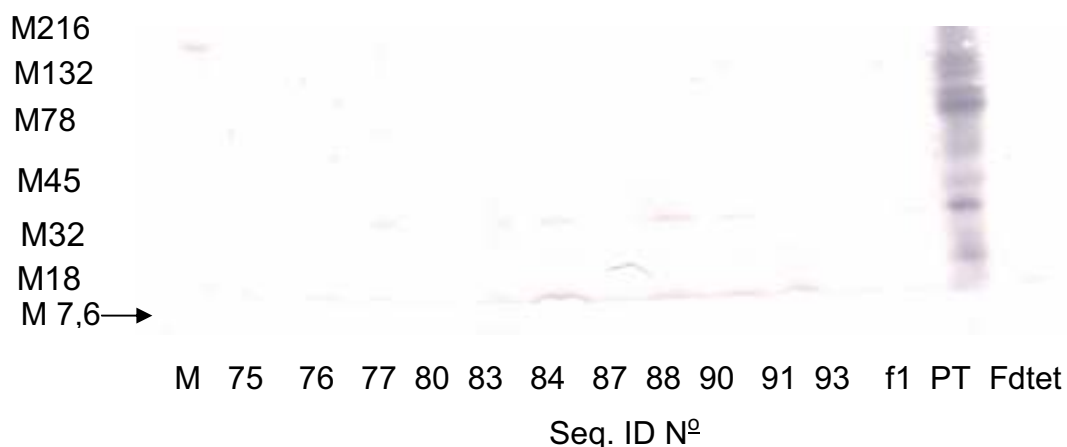


Figura 17 - *Western Blot* dos fagos obtidos nas seleções S4, S5, S6 e S7. Na coluna 1 está representado o marcador de peso molecular, na coluna 14 estão as proteínas totais do parasito como controles positivos, o fago selvagem está representado na linhas 13 e 15 como controle negativo, a seta indica a região da presença da proteína PVIII reativa aos anticorpos utilizados como alvo biológico (IgY anti-larvas de carrapato).

Níveis de anticorpos no soro de camundongos imunizados com clones de fagos imunoreativos contra as proteínas totais de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

---

Pelos testes de ELISA foi confirmada a resposta imune em camundongos, imunizados com os clones de fagos, na presença e também na ausência de adjuvantes, com a produção de IgG capaz de desenvolver reatividade cruzada contra as proteínas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Na Figura 18 foi apresentado o resultado de um teste, no qual foram apresentados os níveis de anticorpos no soro de camundongos BALB/c imunizados com clones de fagos, contra as proteínas totais de larvas de carrapato, calculados pelo teste de ELISA, 90 dias após a primeira imunização. Os clones de fagos apresentaram maior resposta imune em camundongos quando inoculados na ausência de adjuvantes de *Freund*. Nos tratamentos sem adjuvantes (Seq. ID N°18, Seq. ID N° 26 e Seq. ID N° 41) os fagos apresentaram uma resposta superior em relação ao clone equivalente na presença de adjuvante (F18A, F26A e F41A) e também ao peptídeo sintético equivalente inoculado com adjuvante. A mesma constatação foi verificada entre o controle do vetor (M13KE) sem adjuvante e na presença de adjuvante. Os peptídeos sintetizados quimicamente e inoculados na presença de adjuvante apresentaram a menor resposta entre os três tratamentos. O clone 26 apresentou a maior variação na comparação entre a presença e ausência de adjuvantes. Apenas o grupo de animais imunizados com TBS e adjuvante apresentaram uma DO superior quando comparado ao grupo de animais que receberam TBS sem adjuvante.

Na Figura 19 os níveis de anticorpos no soro de camundongos imunizados com clones de fagos, contra as proteínas totais de larvas de carrapato, avaliados pelo teste de ELISA, 90 dias após a primeira imunização. O teste confirmou a mimeticidade existente entre os epítomos naturais e os peptídeos recombinantes isolados em fagos. O índice ELISA para os ensaios 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 da DO do soro do animal imunizado com o fago M13 selvagem (controle negativo do fago sem inserto). Os IEs maiores que 1 foram considerados positivos e os IEs menores do que 1 foram considerados negativos. Os resultados demonstram que os peptídeos foram específicos para o alvo utilizado na seleção.

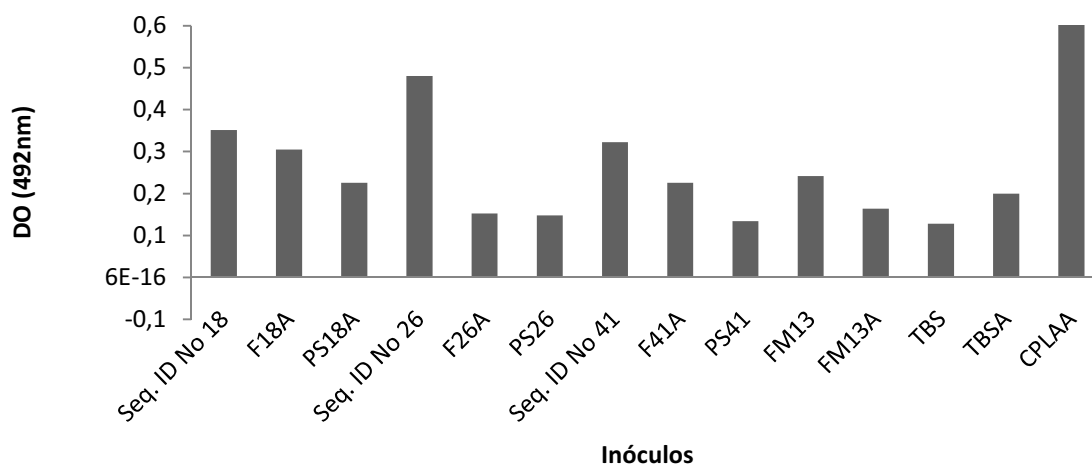


Figura 18 - Níveis de anticorpos no soro de camundongos imunizados com clones de fagos e peptídeos sintéticos contra as proteínas totais de larvas de carrapato, estimados pelo teste de ELISA, 90 dias após a primeira imunização. ELISA comparativo entre fagos contendo os peptídeos de fusão (Seq. ID Nº 18, Seq. ID Nº 26 e Seq. ID Nº 13) administrados sem adjuvantes, com adjuvantes (F18 A, F26 A e F41 A) e apenas o peptídeo sintético (PS18A, PS26 e PS41) diluídos em tampão TBS. A letra A representa adjuvante, a letra F fago e as letras PS peptídeo sintético. O tampão TBS e o fago M13KE, foram testados na presença ou não de adjuvantes a fim de serem utilizados como controles negativos. As proteínas totais de larvas (CPLAA), diluídas em tampão TBS e adjuvantes, foram utilizadas com controles positivos.

Na Figura 19 entre os 37 clones testados, 28 apresentaram resultados positivos, com índice ELISA igual ou superior a 1, embora com perfis diferenciados entre os soros, sendo os valores positivos superiores a 1 pelo índice ELISA (IE). O soro correspondente aos grupos imunizados com os fagos Seq. ID Nº 32, Seq. ID Nº 26, Seq. ID Nº 75, Seq. ID Nº 25 e Seq. ID Nº 15 apresentaram os maiores índices de reatividade entre os grupos testados.

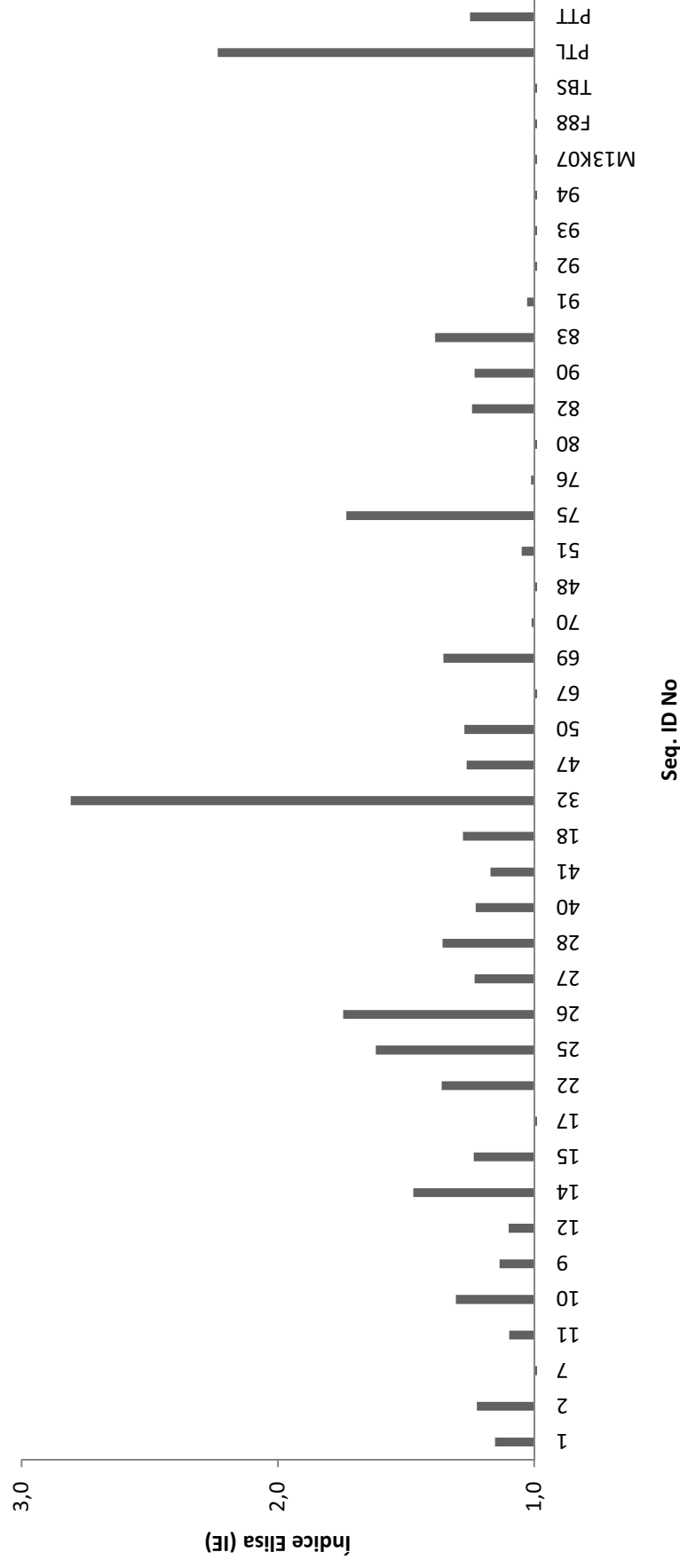


Figura 19 – Índice ELISA no soro de camundongos imunizados com clones de fagos contra os antígenos de larvas e teleóginas de carrapato, estimado pelo teste de ELISA, 90 dias após a primeira imunização. Foram utilizados como controles positivos soros de animais imunizados com proteínas totais de carrapato e como controles negativos, o soro de animais imunizados com fago selvagem (M13KE e Fd-tet) e TBS como controle negativo do tampão.

Para verificar o efeito de imunogenicidade e especificidade na resposta imune desenvolvida pelos peptídeos sintetizados quimicamente, foi realizado um experimento de *Dot - Blot* (Figura 20). O soro testado (Seq. ID Nº 18) do grupo de animais imunizados nos dias 0, 30 e 60 com o peptídeo sintético correspondente a seqüência Seq. ID Nº 18 foi incubado com o próprio peptídeo adsorvido na membrana, o clone de fago Seq. ID Nº 18 e o fago M13 selvagem. Foi constatado que o grupo de animais imunizados com o peptídeo sintético foi capaz de gerar uma resposta por anticorpos (IgG) de grau intermediário contra o próprio peptídeo adsorvido na membrana e também reagiu intensamente contra o peptídeo recombinante expresso na partícula viral. O fago M13 selvagem foi utilizado como controle negativo do vetor. O soro do dia zero (D0) foi utilizado como controle pré-imune.

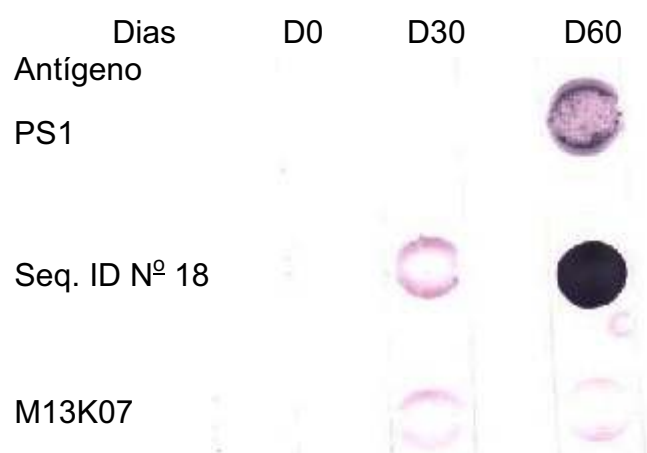


Figura 20 – Reatividade dos anticorpos no soro do grupo de camundongos imunizados com o peptídeo sintético correspondente a sequência Seq. ID Nº 18 contra o peptídeo (PS1), fago recombinante contendo o peptídeo de fusão Seq. ID Nº 18 e o fago selvagem M13KE adsorvido em membrana de nitrocelulose, determinados pelo teste de *Dot Blot*, nos dias 0, 30 e 60 após a primeira imunização.

Na Figura 21 foi demonstrada a reatividade cruzada dos anticorpos no soro de camundongos gerados pela imunização com peptídeos fusionados ao fago (presença de adjuvantes completo e incompleto de *Freund*), fago selvagem,

*pool* de fagos e PBS, o qual foi verificado a reatividade deste soro contra as proteínas totais de larvas de carrapato. O experimento foi realizado pelo teste de ELISA 19 dias após a primeira imunização. Os soros dos animais imunizados com o peptídeo Seq. ID N<sup>o</sup> 18, foi superior ao clone Seq. ID N<sup>o</sup> 41, ao fago M13 selvagem e ao PBS e também apresentou maior reatividade contra proteínas totais de larvas de carrapato.

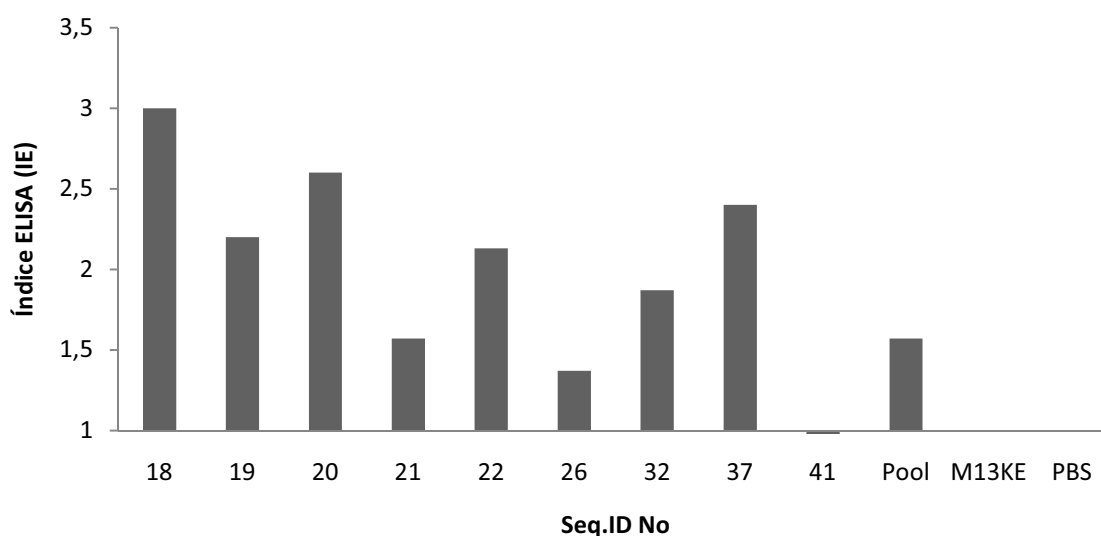


Figura 21 - Níveis de anticorpos no soro de camundongos imunizados com clones de fagos contra as proteínas totais de larvas de carrapato, calculados pelo teste de ELISA, 19 dias após a primeira imunização.

#### Desafio dos bovinos imunizados com clones de fagos

Doze dias após a primeira inoculação os bovinos foram desafiados, porém não houve a presença de carrapatos entre 4,5 e 8,0 mm aos 24 dias após a primeira infestação (Tabela 10). Entretanto, não foi verificado efeito protetor neste período em relação ao número de parasitos desprendidos do hospedeiro. Pelo teste de peso de massa de ovos e eclosão foi verificada alterações no aspecto morfológico das teleóginas no grupo de tratamento (A) quando comparado ao grupo controle (B) (Figura 22). As teleóginas apresentaram uma coloração enegrecida sugerindo lesões hemorrágicas.

Tabela 10 - Número de carrapatos presentes no corpo dos animais (controle e imunizados com o conjunto de clones Seq. ID N<sup>o</sup> 18, 19, 20, 21, 22, 26, 32, 37 e 41), entre 4,5 e 8,0 mm de diâmetro, infestados artificialmente 12 dias após a primeira inoculação, com larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (cepa de campo), totalizando duas infestações de 5000 larvas cada, com intervalo de 1 dia.

| Nº Animal | Leituras |       |       |
|-----------|----------|-------|-------|
|           | 20/06    | 21/06 | 22/06 |
| C 09      | 3        | 14    | 47    |
| C 42      | 0        | 4     | 12    |
| T 37      | 1        | 15    | 47    |
| T 20      | 0        | 1     | 6     |

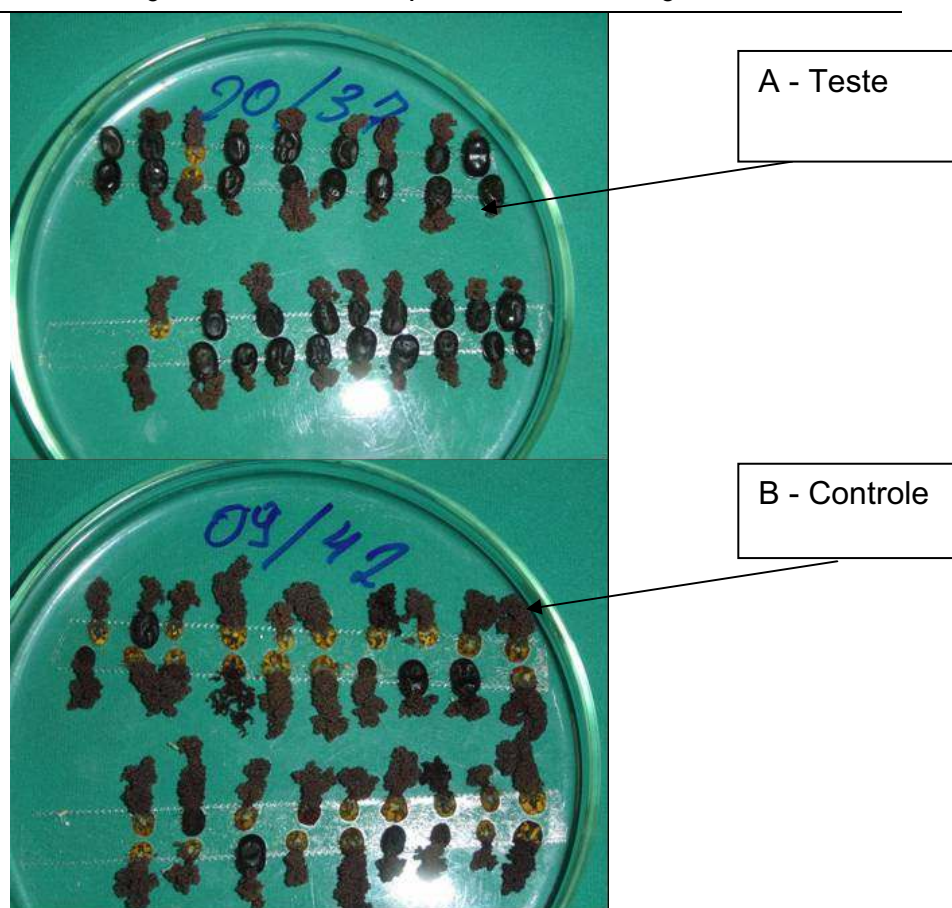


Figura 22 - Teste de oviposição em fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* após se desenvolverem em animais inoculados com fagos recombinantes. A) grupo tratamento representado pelos carrapatos coletados nos animais 20 e 37 e B) grupo controle representado pelos carrapatos coletados nos animais de número 9 e 42.

Inicialmente foram realizadas contagens de carrapatos em bovinos infestados naturalmente com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, no qual 16 bovinos, sendo 8 da raça nelore e 8 da raça holandesa, foram infestados naturalmente com larvas de carrapatos (Figura 23). Os animais foram classificados de acordo com o tipo de cruzamento e número de carrapatos. A média dos animais definidos fenotipicamente como holandeses foi de 39,7 carrapatos e para o cruzamento de nelore a média foi de 11,5. Desta forma, foram escolhidos animais representantes das características Holandesa com alta contagem de carrapatos (animal 09), animal holandês com baixa contagem de carrapatos (animal 12), animal nelore com alta contagem (animal 170) e animal nelore com baixa contagem (animal 163), na tentativa de buscar uma relação entre os animais com maior susceptibilidade e outros com maior resistência em situações de infestação natural.

Os resultados do teste de imunotriagem demonstraram perfis diferenciados no reconhecimento dos clones de fagos pelas IgGs do soro para os quatro tratamentos (Figura 24). O clone Seq. ID N<sup>o</sup> 2 foi reconhecido exclusivamente pelo soro do animal nelore (163) com baixa contagem de carrapatos. Os clones Seq. ID N<sup>o</sup> 48, Seq. ID N<sup>o</sup> 51 e Seq. ID N<sup>o</sup> 93 foram reconhecidos predominantemente pelo soro dos animais holandeses. Os clones Seq. ID N<sup>o</sup> 32, Seq. ID N<sup>o</sup> 47, Seq. ID N<sup>o</sup> 50, Seq. ID N<sup>o</sup> 67, Seq. ID N<sup>o</sup> 83, Seq. ID N<sup>o</sup> 92, Seq. ID N<sup>o</sup> 94, foram reconhecidos pelo soro dos quatro animais. Os clones Seq. ID N<sup>o</sup> 12, Seq. ID N<sup>o</sup> 15, Seq. ID N<sup>o</sup> 76, Seq. ID N<sup>o</sup> 75, Seq. ID N<sup>o</sup> 80 reagiram com maior intensidade tanto para os soros holandês e nelore com alta contagem de carrapatos, quanto nelore com baixa contagem de carrapatos. Os clones Seq. ID N<sup>o</sup> 32, Seq. ID N<sup>o</sup> 47, Seq. ID N<sup>o</sup> 67, Seq. ID N<sup>o</sup> 75, Seq. ID N<sup>o</sup> 76, Seq. ID N<sup>o</sup> 80, Seq. ID N<sup>o</sup> 82, Seq. ID N<sup>o</sup> 83 e Seq. ID N<sup>o</sup> 92 reagiram com maior intensidade com o soro dos animais holandeses apresentando alta contagem de carrapatos. Os clones Seq. ID N<sup>o</sup> 12 e Seq. ID N<sup>o</sup> 15 reagiram mais intensamente com o soro dos nelores com alta contagem de carrapatos.

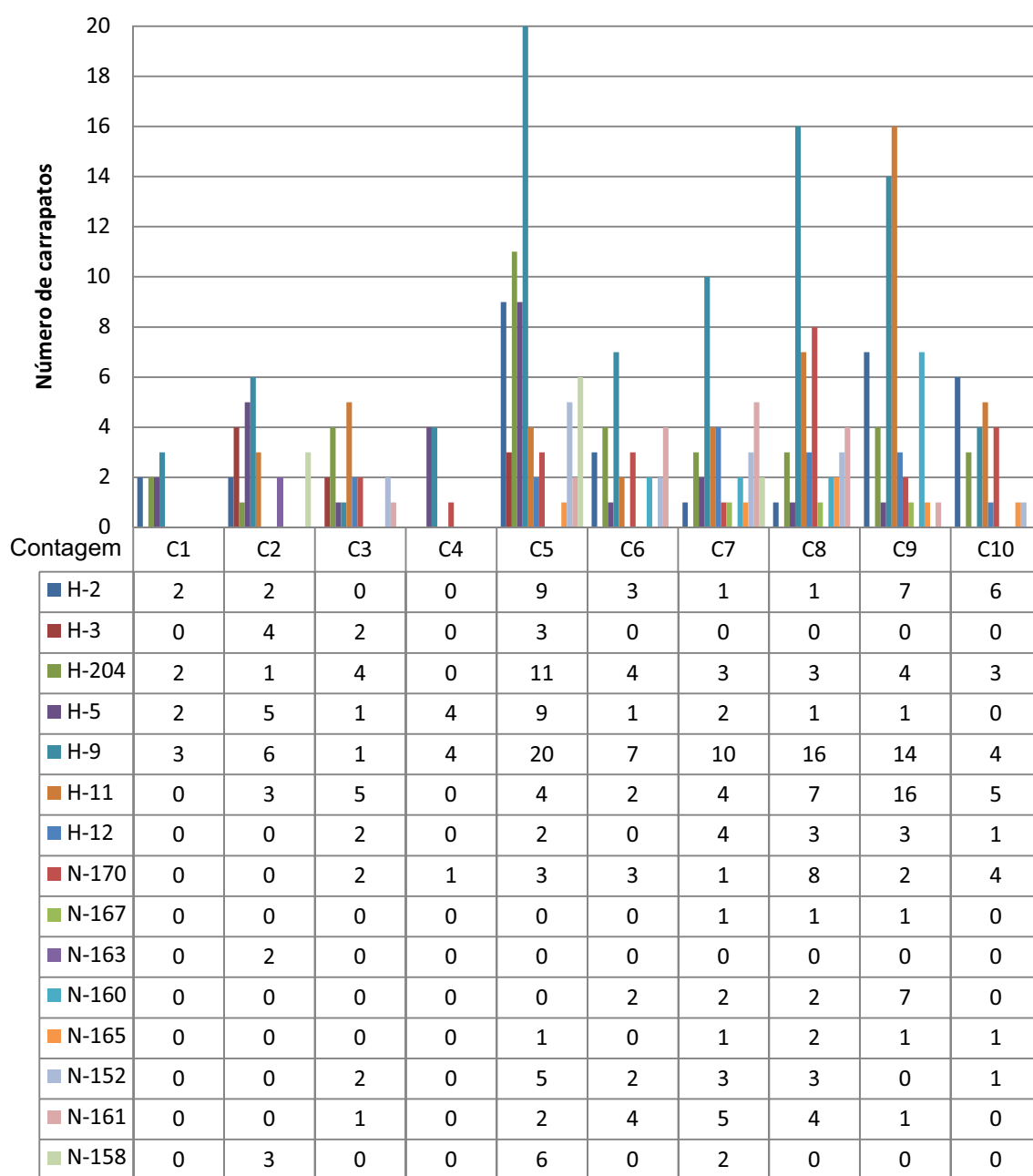


Figura 23 - Contagem de carrapatos em bovinos infestados naturalmente com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Legenda: Animal descartado -, N – nelore, H – Holandês, Média Holandês = 39,7 carrapatos/animal, Média Nelore = 11,5 carrapatos/animal, Animais escolhidos: 09, 012, 163 e 170.

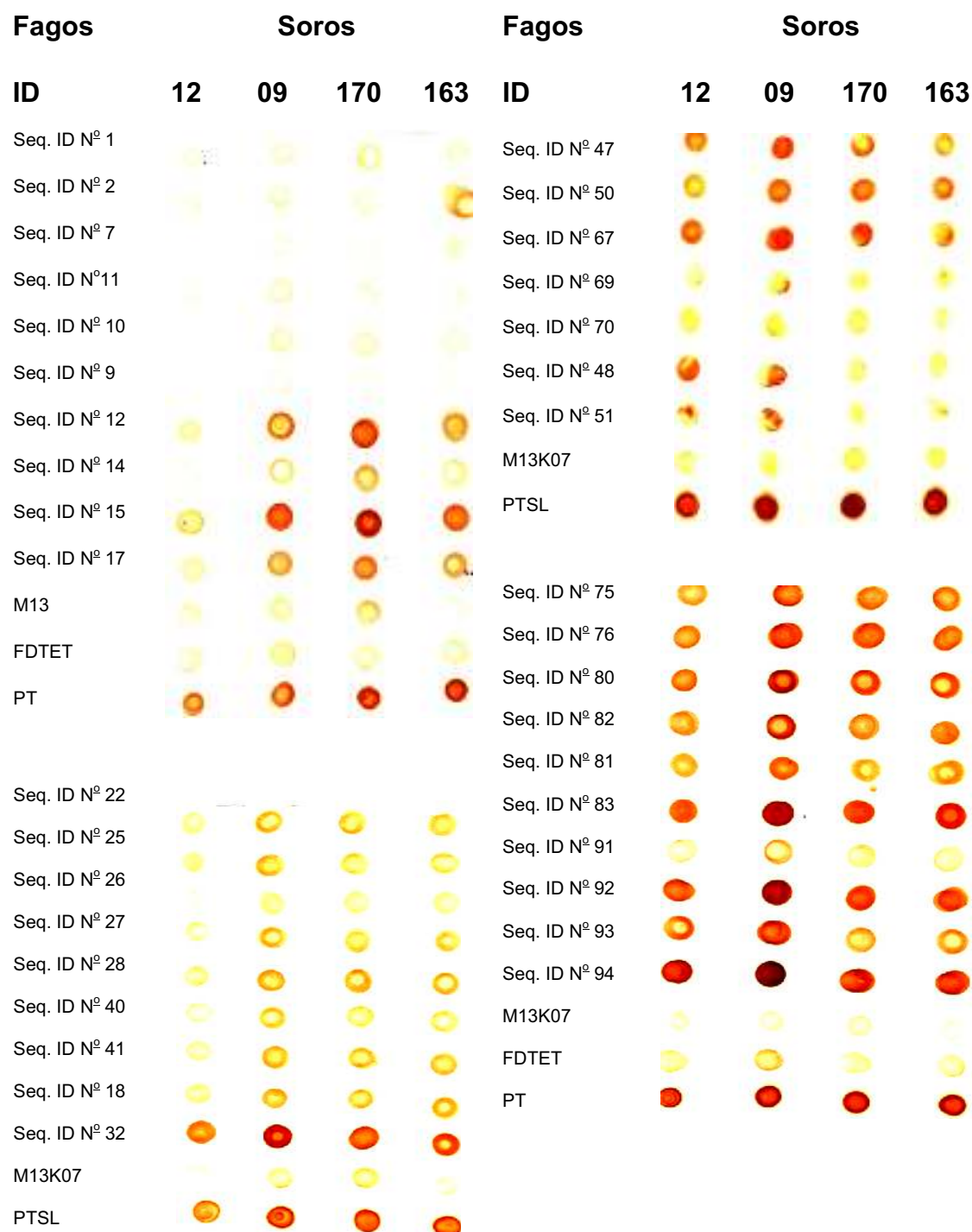


Figura 24 - *Dot-Blot* realizado no teste de imunotriagem para detecção de imunoreatividade dos clones contra os anticorpos de animais infestados naturalmente com o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Animais com baixa contagem de carrapatos: holandês (12) e nelore (163), animais com alta contagem holandês (09) e nelore (170).

## Teste de hipersensibilidade cutânea em bovinos infestados naturalmente com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

---

Na Figura 25 (gráficos A e B) foi apresentado o aumento de espessura, em porcentagem, ao longo da cinética em horas após-estímulo com antígeno total de larvas inoculadas na região cervical e pavilhão auricular. Para o gráfico 25 A, nos animais 9 e 12 o aumento máximo foi de 120%. No animal 9 ocorreu aumento máximo 1 hora após o estímulo e no animal 12 ocorreu 2 horas após o estímulo. Nos animais 163 e 170 o aumento de espessura máximo foi de 60% nas primeiras 2 horas após estímulo. Em todos os quatro animais inoculados na região cervical não ocorreu resposta tardia, com exceção de um aumento no animal 12 de 25% às 48 e 96 horas após o estímulo. No gráfico 25 B, o aumento de espessura máximo foi de 37% 1 hora após o estímulo para o animal número 9. Os animais número 12 e 170 apresentaram leitura de aumento de espessura de 26% sendo o primeiro com 1 hora e o segundo com 2 horas após o estímulo. Os animais 12 e 170 apresentaram leitura tardia máxima de 26% e 18% às 72 e 48 horas após o estímulo, respectivamente.

Pelo teste de hipersensibilidade cutânea com fagos foi verificado inicialmente um padrão de dose resposta dependente das concentrações das partículas virais inoculadas (Figura 26). Nas três diluições testadas a maior relação ocorreu entre o clone contendo o peptídeo recombinante 32 e o fago selvagem, quando o inóculo foi administrado na maior concentração ( $1 \times 10^{13}$  partículas virais). Foi observado neste animal (animal 09) que a dose intermediária e a dose inferior foram semelhantes entre o controle negativo e o tratamento para este clone.

Os clones de fagos foram testados no experimento representados nas figuras 24 e 25. Na Figura 27 o aumento de espessura ocorreu com maior intensidade no animal 9 (gráfico 27 A), representado pelo clone 32 com 300% de aumento na segunda hora após a inoculação do antígeno. Destaca-se também a leitura dos clones 18, 47 e o fago selvagem M13. O clone 18 foi o mais reativo no animal 170 (gráfico 27 D) com 129% de aumento. Nos animais 12 (gráfico 27 B) e 163 (gráfico 27 C) os antígenos mais reativos foram os extratos proteicos de larvas nas primeiras duas horas após o inóculo. Nesta análise não foi verificado resposta de hipersensibilidade tardia.

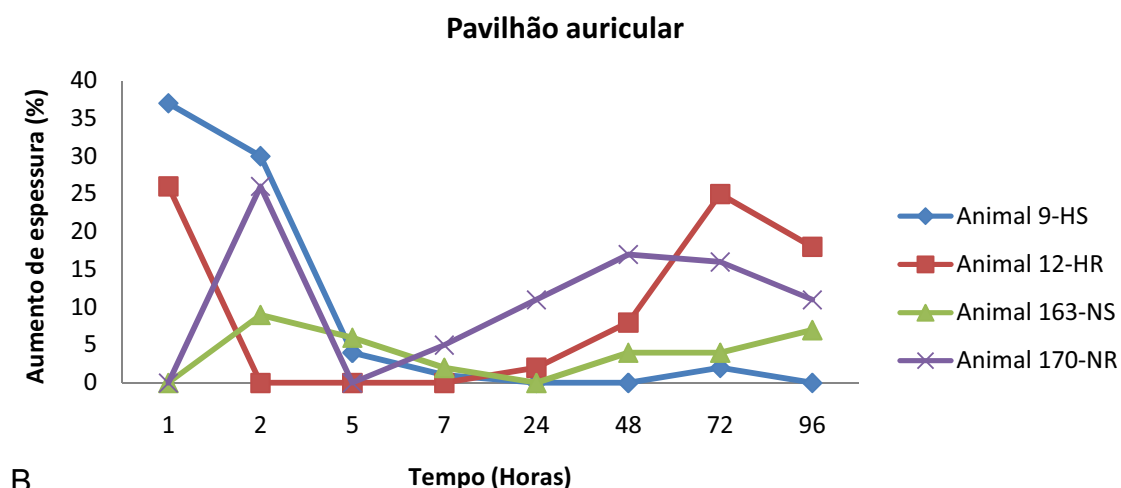
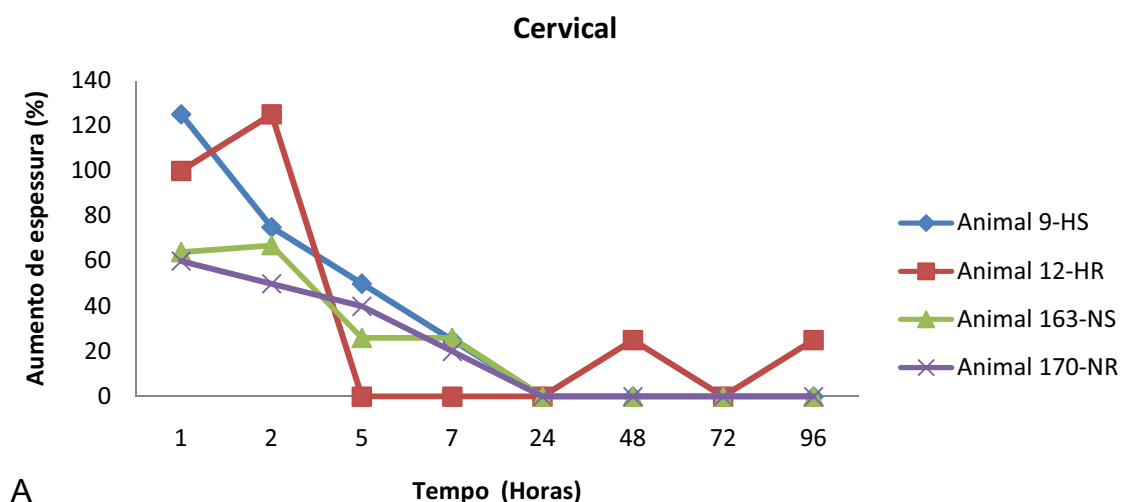


Figura 25 – Teste de hipersensibilidade cutânea com antígenos totais de larvas em bovinos infestados naturalmente com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. No gráfico A as inoculações foram realizados na região cervical e no gráfico B na região do pavilhão auricular. A esquerda foi representado o aumento da espessura em porcentagem. O tempo (em horas) pós-inoculação do antígeno foi representado no eixo do gráfico. À direita foram representados os animais com as respectivas identificações: HS- Holandês com alta contagem de carrapatos, HR – Holandês com baixa contagem de carrapatos, NR – Nelore com baixa contagem de carrapato e NS - Nelore com alta contagem de carrapatos.

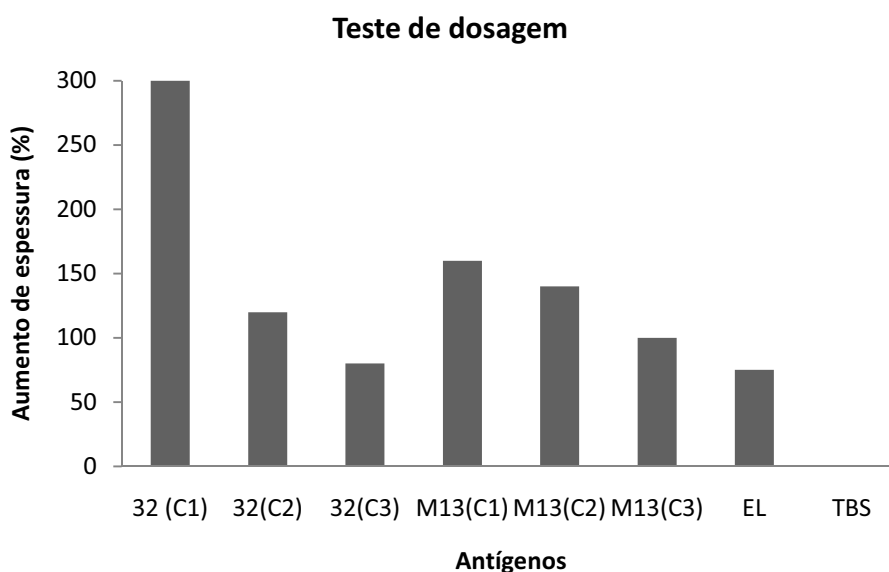


Figura 26 – Teste de hipersensibilidade cutânea com fagos recombinantes no bovino 09 infestado naturalmente com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. À esquerda foi representado em percentagem o aumento da espessura no tecido cutâneo 2 horas após o estímulo. As letras C1, C2 e C3 representam o fago contendo o peptídeo sintético nas concentrações de  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{12}$  e  $1 \times 10^{11}$  partículas virais, respectivamente. As linhas M13(C1), M13(C2) e M13(C3) representa o fago selvagem M13KE nas concentrações de  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{12}$  e  $1 \times 10^{11}$  partículas virais, respectivamente. A linha EL representa o extrato de larvas e por último o inóculo contendo apenas o TBS, como controle negativo.

Na Figura 28 o aumento de espessura ocorreu com maior intensidade no animal 09 (gráfico A), representado pelo clone 47 com 91 % de aumento com 1 hora após a inoculação do antígeno. Destaca-se também a leitura dos clones 32, 18, 02 e M13. Nos demais experimentos não foi evidenciado uma resposta imediata pronunciada.

Na Tabela 11 foi apresentada uma compilação dos principais métodos utilizados para a caracterização dos clones obtidos nos estudos de antigenicidade e imunogenicidade.

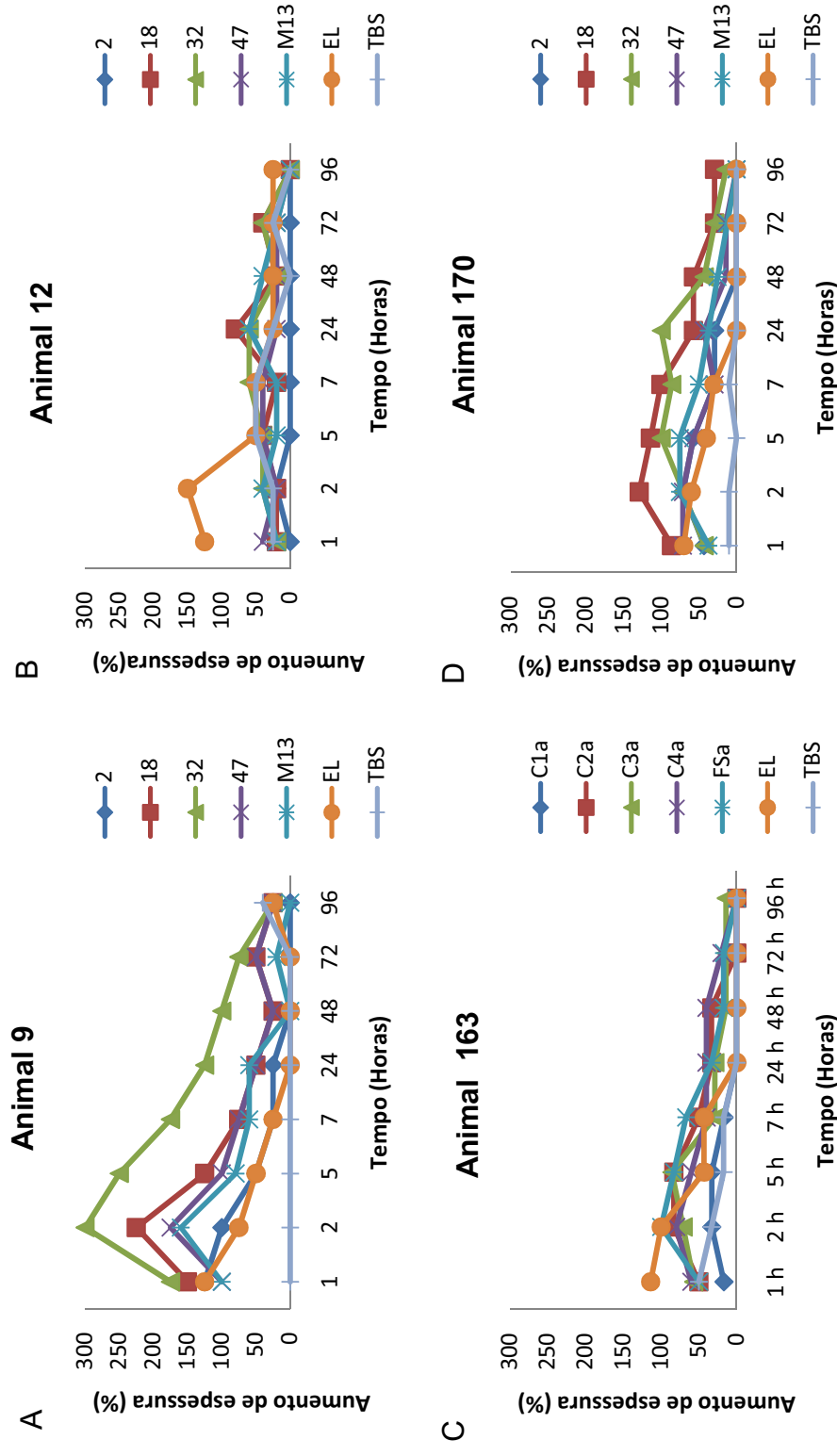


Figura 27 - Teste de hipersensibilidade cutânea com fagos na região cervical de bovinos infestados naturalmente com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Na parte superior dos gráficos (A-D) foram apresentados o número do animal. A esquerda foi representado o aumento da espessura em percentagem. Na parte inferior dos gráficos, o tempo (em horas) pós-inoculação com o antígeno. À direita foram representados os antígenos (EL- extrato de larvas, M13 – fago selvagem na concentração  $1 \times 10^{13}$  pv e os clones 02, 18, 32 e 47 na concentração de  $1 \times 10^{13}$  pv. HS- holandês com alta contagem de carrapatos, HR – holandês com baixa contagem de carrapatos, NR – nelore com baixa contagem de carrapatos e NS - nelore com alta contagem de carrapatos).

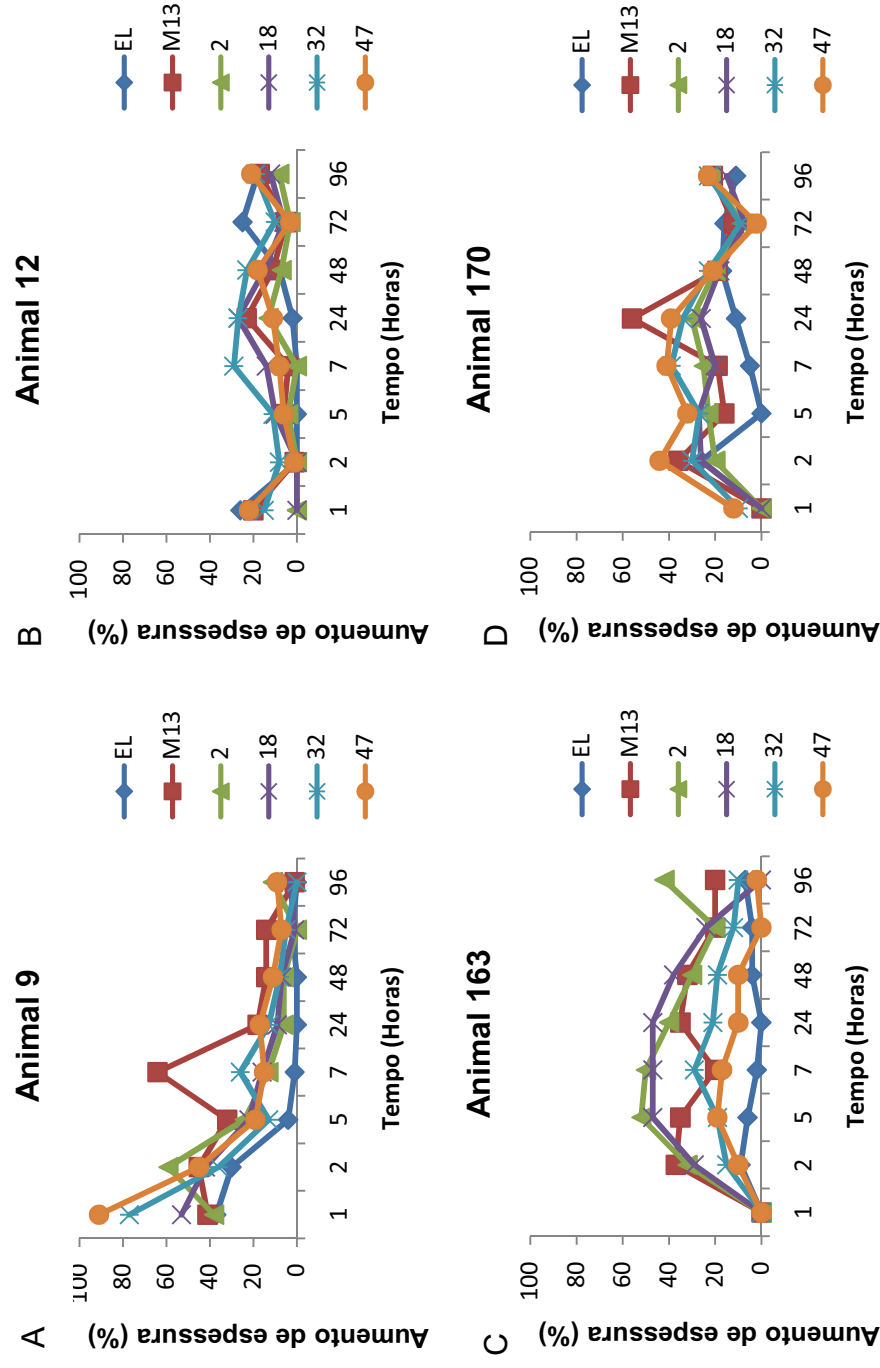


Figura 28 - Teste hipersensibilidade cutânea com fagos no pavilhão auditivo de bovinos infestados naturalmente com *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Na parte superior dos gráficos (A-D) foi apresentado o número de cada animal e o padrão racial. A esquerda dos gráficos, foi representado o aumento da espessura em percentagem. O tempo (em horas) pós-inoculação dos fagos foi representado na parte inferior do gráfico. À direita foram representados os antígenos (EL- extrato de larvas, M13 – fago selvagem na concentração  $1 \times 10^{12}$  partículas virais e os clones 02, 18, 32 e 47 na concentração de  $1 \times 10^{12}$  partículas virais. 9 - Holandês com alta contagem de carrapatos, 12 – Holandês com baixa contagem de carrapatos, 170 – Nelore com baixa contagem de carrapato e 163 - Nelore com alta contagem de carrapatos.

Tabela 11 – Compilação dos resultados obtidos nas diversas etapas de seleção de mimetopos específicos de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*.

| Seq. ID Nº    | Peptídeos     | Placa    | FO    | Freq % | PE-(IE) | D  | DC | WB | IMU | Hr | IMT |    |    |
|---------------|---------------|----------|-------|--------|---------|----|----|----|-----|----|-----|----|----|
|               |               |          |       |        |         |    |    |    |     |    | Hs  | Ns | Nr |
| Seq. ID Nº 1  | FQNIASMPHLVY  | 12TP1A1  | 11/59 | 18,6   | 13,5    | PF |    | +  | 1,2 | N  | N   | N  | N  |
| Seq. ID Nº 2  | SVQERYAFWST   | 12TP4F4  | 10/59 | 16,9   | 3,3     | PF |    | +  | 1,2 | N  | N   | N  | PF |
| Seq. ID Nº 3  | WGHTTSYPWRLS  | 12TP1F7  | 09/59 | 15,3   | 4,2     | FF |    |    |     |    |     |    |    |
| Seq. ID Nº 4  | DRWNSMWKESLL  | 12TP4G4  | 06/59 | 10,2   | 1,8     | FF |    |    |     |    |     |    |    |
| Seq. ID Nº 5  | QFTPDKHMMLP   | 12TP4A7  | 04/59 | 6,8    | 1,4     | PF |    | +  |     |    |     |    |    |
| Seq. ID Nº 6  | NLVADFFRPILLS | 12TP1C12 | 04/59 | 6,8    | 3,4     | FF |    | +  |     |    |     |    |    |
| Seq. ID Nº 7  | YTLGHFHGQPQL  | 12TP1A5  | 03/59 | 5,1    | 10,6    | FF |    |    | 1,0 | N  | N   | N  | N  |
| Seq. ID Nº 8  | GHFPPTPIKTLA  | 12TP1G3  | 02/59 | 5,1    | 5,7     | FF |    | +  |     |    |     |    |    |
| Seq. ID Nº 9  | APHNKWPHLNPP  | 12TP1C2  | 01/59 | 1,7    | 2,1     | P  |    | +  |     | N  | N   | N  | N  |
| Seq. ID Nº 10 | AHSEMGTRATMT  | 12TP3A7  | 01/59 | 1,7    | 0,7     | PF |    | +  | 1,3 | N  | N   | N  | N  |
| Seq. ID Nº 11 | AQMIIRLSSPGN  | 12TPF11  | 01/59 | 1,7    | 1,4     | P  |    | +  | 1,1 | N  | N   | N  | N  |
| Seq. ID Nº 12 | FSKSSSWESWLP  | 12TP1D7  | 01/59 | 1,7    | 17,4    | FF | +  | +  | 1,1 | FF | PF  | P  | PF |
| Seq. ID Nº 13 | DMSYYALPTYT   | 12TP1E8  | 01/59 | 1,7    | 1,6     | FF |    |    |     | N  | N   | N  | N  |
| Seq. ID Nº 14 | LGMSTNPGPRIL  | 12TP2H5  | 01/59 | 1,7    | 4,2     | PF |    | +  | 1,1 | N  | FP  | P  | N  |
| Seq. ID Nº 15 | MAITDHPGSAMV  | 12TP4E7  | 01/59 | 1,7    | 2,2     | PF | +  | +  | 1,5 | FP | P   | P  | P  |
| Seq. ID Nº 16 | NLNHWYKSWLLP  | 12TP1B4  | 01/59 | 1,7    | 1,7     | FF |    | +  |     |    |     |    |    |
| Seq. ID Nº 17 | YTSLPAPMQRLP  | 12TP4E8  | 01/59 | 1,7    | 2,5     | P  |    | +  | 1,2 | FP | P   | P  | P  |
| Seq. ID Nº 18 | DAWKRLSQMYD   | 12L2E4   | 22/74 | 29,7   | 1,9     | PF | +  | +  | 1,3 | N  | FF  | FF | FF |
| Seq. ID Nº 19 | VNYNGKEHLLIP  | 12L2D8   | 09/74 | 12,2   | 1,0     | FF |    | +  |     |    |     |    |    |
| Seq. ID Nº 20 | IDPLMFKYWSNM  | 12L2F4   | 07/74 | 9,5    | 1,1     | PF |    | +  |     |    |     |    |    |
| Seq. ID Nº 21 | SPLNNFYKTQLR  | 12L2D2   | 03/74 | 4,1    | 1,4     | FF |    |    |     |    |     |    |    |
| Seq. ID Nº 22 | VNWSWHKTNLS   | 12L2E6   | 03/74 | 4,1    | 1,6     | P  | +  | +  | 1,4 | N  | FF  | FF | FF |
| Seq. ID Nº 23 | AGLPNHNAMLLT  | 12L2D6   | 02/74 | 2,7    | 1,0     | PF |    | +  |     |    |     |    |    |
| Seq. ID Nº 24 | NAWLQEPNHRNL  | 12L2H1   | 02/74 | 2,7    | 1,2     | PF |    | +  |     |    |     |    |    |
| Seq. ID Nº 25 | TLFTPDKSPAKT  | 12LB12   | 02/74 | 2,7    | 2,1     | P  |    | +  | 1,6 | N  | FF  | FF | FF |
| Seq. ID Nº 26 | SNNADYKQSLIL  | 12L2D7   | 02/74 | 2,7    | 1,8     | P  | +  | +  | 1,7 | N  | N   | N  | N  |
| Seq. ID Nº 27 | GALHQEPSSNLF  | 12LA3    | 02/74 | 2,7    | 1,2     | P  |    |    | 1,2 | N  | FF  | FF | FF |
| Seq. ID Nº 28 | GLFTPDKSPAKT  | 12L2G10  | 02/74 | 2,7    | 1,0     | P  |    |    | 1,4 | N  | FF  | FF | FF |
| Seq. ID Nº 29 | APYDTPWPSPSL  | 12LD6    | 01/74 | 1,4    | 1,4     | PF |    |    |     |    |     |    |    |





|                |        |         |       |     |    |
|----------------|--------|---------|-------|-----|----|
| Seq. ID Nº 100 | HGLYGS | FUSE-D3 | 01/19 | 5,3 | FF |
| Seq. ID Nº 101 | MLHTSM | FUSE-A4 | 01/19 | 5,3 | FF |
| Seq. ID Nº 102 | NLHTSF | FUSE-C4 | 01/19 | 5,3 | FF |
| Seq. ID Nº 103 | PAPRFF | FUSE-B4 | 01/19 | 5,3 | FF |
| Seq. ID Nº 104 | PLHTSL | FUSE-E4 | 01/19 | 5,3 | FF |
| Seq. ID Nº 105 | PMRFFF | FUSE-D1 | 01/19 | 5,3 | FF |
| Seq. ID Nº 106 | QLLYGS | FUSE-A1 | 01/19 | 5,3 | FF |
| Seq. ID Nº 107 | RGPMFF | FUSE-C2 | 01/19 | 5,3 | FF |

Legenda:

|                                      |                           |
|--------------------------------------|---------------------------|
| Fo = Frequência Observada            | Hr = Holandês resistente  |
| Freq% = Porcentagem de frequência    | Hs = Holandês sensível    |
| PE(IE) – Padrão ELISA e Índice ELISA | Ns = Nelore Sensível      |
| D = Resultados de <i>Dot Blot</i>    | Nr = Nelore resistente    |
| DC = <i>Dot Blot</i> competição      | P = Positivo,             |
| WB = <i>Western Blot</i>             | N = Negativo,             |
| IMU = Imunização em camundongos      | PF = Positivo Fraco,      |
|                                      | FF = Positivo muito Fraco |

## Construção das proteínas recombinantes e síntese dos genes artificiais

---

As seqüências dos 10 mimetopos distintos ligados em *tandem* com os espaçadores formaram um gene com 477pb denominado de gene A (Figura 29). O peptídeo Seq. ID N<sup>o</sup> 47 repetido 10 vezes formou um gene com 435 pb denominado de gene B (Figura 30). Os genes A e B codificam resíduos de 159 e 145 aminoácidos, respectivamente. Foi verificado o percentual de nucleotídeos e o conteúdo guanina e citosina (GC) nos genes sintetizados (Figura 31). Os genes sintéticos apresentaram graus variados de conteúdo sendo que prevaleceu para G (34,15%, T (31,71%), A (17,68%) e C (16,46%) para o gene A e G (34,44%), T(33,56%), C (19,78%) e A (12,22%). Foi verificado que a variação ao longo de cada seqüência ocorreu com maior intensidade para o gene A.

Os genes sintetizados através da síntese química de oligonucleotídeos foram clonados em vetor de clonagem pUC-18 e as seqüências dos genes foram confirmadas pelo seqüenciamento de DNA dos insertos como sendo 100% correspondentes da seqüência do desenho original (dados não apresentados).

A expressão foi realizada pela sub-clonagem dos genes artificiais A e B no vetor de expressão pET32a (*novagen*) (Figura 32). A digestão do vetor ligado com as enzimas *Kpn1* e *Not1* geraram fragmentos de aproximadamente 500pb para os dois vetores transformados com os genes sintéticos A e B, além de um fragmento de aproximadamente 6000 pb, representando o vetor (pET32a).

As proteínas expressadas, denominadas PRA e PRB, foram produzidas por *E. coli* origami B (DE3) pLysS, transformadas e induzidas por IPTG (1mM). Foi verificado o perfil protéico do extrato celular por SDS-PAGE 16% em diferentes intervalos de tempo pré e pós-indução por IPTG (Figura 33). Estas proteínas fusionadas às demais proteínas de fusão do vetor pET-32a (Tireodoxina, S-Tag, His-tag e trombina) apresentam peso estimado de 34kDa para a PRA e 31,5 kDa para a PRB. As proteínas recombinantes foram ausentes em meios de cultura com células de *E. coli* transformadas e não induzidas por IPTG. Posteriormente a adição de IPTG, foi verificado um aumento gradual da intensidade da expressão nos intervalos de 1 h, 2 h, 3 h e 5 horas após a indução.