

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

***EXPRESSÃO EM *Pichia pastoris* E IMUNOPROTEÇÃO DA
PROTEÍNA *BmTI* DE *Rhipicephalus microplus****

***Rhipicephalus microplus: EXPRESSION IN *Pichia pastoris* AND
IMMUNOPROTECTION OF THE *BmTI* PROTEIN***

Mariana Aparecida Soares

Orientador: Dr. Renato Andreotti e Silva

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

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL

2011

Mariana Aparecida Soares

“Expressão e imunoproteção da proteína *BmTI* de *Rhipicephalus microplus* em *Pichia pastoris*”

“*Rhipicephalus microplus*: expression and immunoprotection of the BmTI protein in *Pichia pastoris*”

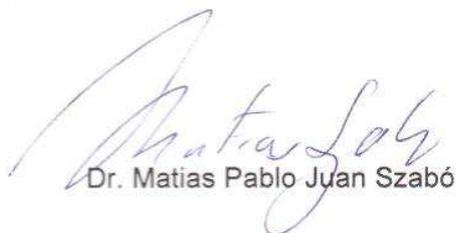
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área concentração: Saúde Animal

APROVADA: 24/11/2011



Dr. Renato Andreotti e Silva
Orientador



Dr. Matias Pablo Juan Szabó



Dra. Ana Luiza Alves Rosa Osório

Dedico aos meus pais Antônio João Soares
e Angela Morinigo Soares, ao meu
filho Gabriel Nesta Soares Corrêa
e à memória de minha irmã Carolina
Genolina Soares

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Renato Andreotti pela oportunidade concedida, paciência e orientação

Ao Msc. Rodrigo Casquero Cunha pelos conselhos, auxílio, e por muitas vezes ser meu “orientador de bancada”

Ao Dr. Marcos Valério Garcia, por seu extraordinário bom humor, pelos conselhos e auxílio no texto

Aos meus pais Antônio João e Angela, por tudo que fizeram por mim, e as minhas irmãs Carolina (*in memoriam*) e Ana Maria por nunca terem “soltado da minha mão”

Ao querido Miguel Ângelo Corrêa, meu ouvinte, conselheiro, por sua doce companhia e por tudo que fez por mim

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia por sua contribuição na minha formação acadêmica

À Embrapa Gado de Corte por toda a infraestrutura necessária para a realização desse trabalho

À CAPES pela bolsa de estudo

Ao CNPq pelo financiamento do projeto

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
REVISÃO DE LITERATURA	8
Histórico	8
Classificação do <i>Rhipicephalus microplus</i>	9
Ciclo Biológico do <i>Rhipicephalus microplus</i>	10
Importância econômica.....	12
Resistência dos bovinos ao carrapato.....	13
Controle e resistência.....	15
Coagulação Sanguínea	17
Enzimas proteolíticas	18
Inibidores de Serinoproteinases	19
Inibidores de tripsina de <i>R. microplus</i> (<i>BmTIs</i>).....	20
<i>Pichia pastoris</i>	25
REFERÊNCIAS.....	29
ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINADO PELA PESQUISA.....	38
Resumo.....	38
Abstract	39
Introdução.....	40
Material e Métodos.....	41
1. Carrapatos	41
2. Manipulação de DNA.....	42
3. Produção de soros policlonais.....	42
4. Análise de recombinantes por <i>Dot blot</i>	43

5. Produção da rBmTIS	44
6. Purificação e quantificação da rBmTIS	44
7. SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> da rBmTIS	45
8. Ensaio vacinal	46
9. Análises do Anti-soro Bovino	47
10. Análises Estatísticas.....	47
Resultados	48
1. Construção do pPICZ α A-BmTIS	48
2. Expressão da proteína rBmTIS.....	48
3. Imunoproteção.....	49
4. Análise do Ensaio Vacinal	49
Discussão	49
Agradecimentos	51
Referências.....	52

INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus é um dos ectoparasitos que acarretam grande impacto econômico, causando enormes perdas para bovinocultura, tanto de maneira direta, pelo efeito da picada causando irritabilidade, perda de sangue e de peso, diminuição na produção de leite, predisposição à miíases, danos no couro e transmissão dos agentes parasitários e infecciosos; como indireta pelo custo do controle químico e os resíduos deixados nos subprodutos e no ambiente, gerando grandes prejuízos ambientais e à pecuária no Brasil (HORN, 1983).

Os rebanhos leiteiros no Brasil são, em sua maioria, estabelecidos em raças europeias ou mestiças. Já os rebanhos de gado de corte, apesar da menor presença de raças europeias, têm sofrido um aumento no uso destas nos cruzamentos industriais ao longo do tempo. Desta forma, considerando que estas raças são mais susceptíveis a infestação por carrapato, é clara a necessidade do estabelecimento de um método de manejo sistemático do carrapato (GOMES, 1995) e, para isso, é imprescindível a busca e proposição de novas ferramentas de controle.

Há uma busca mundial por novas alternativas de controle do carrapato e as vacinas têm sido o foco principal de muitos pesquisadores. No Brasil o uso de vacinas, associado aos produtos químicos e à rotação de pastagens pode abrir possibilidades para o manejo integrado mais efetivo, diminuindo o problema com resíduos no ambiente e o desenvolvimento do fenômeno de resistência.

Nesta perspectiva, o objetivo deste trabalho foi a produção de um antígeno recombinante baseado em um inibidor de tripsina presente em ovos e larvas de carrapato (*BmTI*) a fim de desenvolver uma vacina contra *R. microplus* de baixo custo que possa servir como uma ferramenta adicional no manejo integrado do controle do carrapato do bovino.

REVISÃO DE LITERATURA

Histórico

Postula-se que os carrapatos desenvolveram-se como parasitas obrigatórios de répteis no final do período paleolítico ou início do mesolítico, em climas quentes e úmidos. Supõe-se que quando os répteis ramificaram-se em numerosas formas de vida, preenchendo nichos aquáticos e terrestres, seus carrapatos mais primitivos evoluíram em duas principais famílias, Argasidae e Ixodidae (HOOGSTRAAL, 1978).

Sua enorme expansão geográfica e adaptação a condições climáticas extremas (alimentando-se através de sangue de pinguins na Antártida e de lagartos nos trópicos), e a diversidade de hospedeiros nos quais se alimentam (mamíferos, aves e répteis), indicam que eles são uma família altamente bem sucedida (WANG; NUTTALL, 1999).

Incluem 896 espécies divididas em três famílias: Argasidae ou “carrapatos moles” (193 espécies); Ixodidae ou “carrapatos duros” (702 espécies); e Nuttalliellidae, com somente uma espécie (GUGLIELMONE et al., 2010).

A espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ou “carrapato-do-boi”, originou-se provavelmente na Ásia, quando mamíferos e pássaros substituíram os répteis como vertebrados dominantes, já no período terciário (HOOGSTRAAL; KIM, 1985). Embora *R. microplus* não seja autóctone no continente americano, os cinco séculos que passaram desde sua chegada com os animais dos colonizadores europeus permitiram-lhe desenvolver um elevado grau de adaptação ao ambiente. Atualmente a espécie é uma importante praga em grandes áreas do Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Colômbia. (ESTRADA-PEÑA, A. 1999).

No Brasil sua introdução parece ter-se dado no Estado do Rio Grande do Sul, pela vinda de animais comprados do Chile, no início do século XVIII. Atualmente encontra-se

distribuído em todo país, variando de intensidade de acordo com as condições climáticas e tipos raciais de bovinos explorados (GONZALES, 1995). Destacam-se as regiões Sudeste e Centro-Oeste e toda a costa brasileira, pelas boas condições de umidade e temperatura, e pela exploração pecuária mais intensa. (ESTRADA-PEÑA 1999).

Classificação do *Rhipicephalus microplus*

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

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

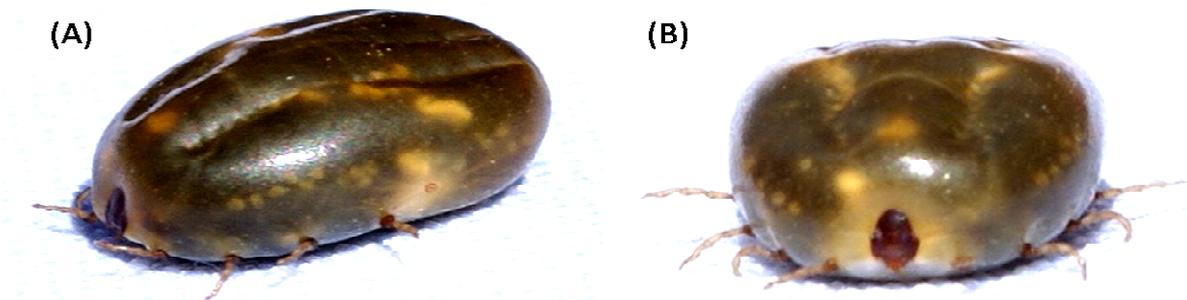


Figura 1 Teleógina de *R. microplus* (A) lateral esquerda; (B) face cranial. Fonte: MATIAS; CUNHA, 2010.

Ciclo Biológico do *Rhipicephalus microplus*

O carrapato-do-boi é um parasita monoxeno e apresenta duas fases complementares: a de vida livre ou não parasitária, que se inicia com o desprendimento da teleógina do hospedeiro e a sua queda ao solo; e a de vida parasitária, que se inicia quando a larva se fixa no hospedeiro. Além da sua importância para os bovinos, outros mamíferos também podem ser parasitados, tais como equinos, caprinos, ovinos, cães e veados (GONZALES, 1975).

Após terminarem de se alimentar no hospedeiro as teleóginas caem ao solo dando início à postura. Possuem geotropismo positivo e buscam abrigo no solo e na vegetação para iniciar a postura dois ou três dias após a queda (ROCHA, 1998). Em épocas de frio o período de pré-postura pode se estender por muitos dias. A oviposição dura em torno de quinze dias e pode chegar a 3000 ovos por indivíduo, em temperatura de 27°C e umidade relativa do ar superior a 70% (GONZALES, 1995). Seis dias após a eclosão a larva está pronta para subir nas extremidades apicais da vegetação por geotropismo negativo, localizando o hospedeiro pelo odor, pelas vibrações, pelo sombreamento, pelo estímulo visual e pelo gradiente de concentração de CO₂ (SONENSHINE, 1993). Em baixas temperaturas as larvas podem sobreviver por vários meses, mas a capacidade infectante restringe-se aos próximos 90 dias (GONZALES, 1995).

A fase parasitária se inicia com a fixação das larvas no hospedeiro, desenvolvendo-se até a fecundação e ingurgitamento total das fêmeas. Nesta fase o carrapato é pouco afetado pelas condições climáticas ambientais (RIEK, 1965), e as condições oferecidas pelo próprio hospedeiro passam a ocupar um papel preponderante no seu desenvolvimento. O *R. microplus* prefere as regiões do úbere, bolsa escrotal, entrepernas e a barbela, embora possa também parasitar o pavilhão auricular (CORDOVÉS, 1997). Essas regiões preferenciais de fixação são determinadas em função da espessura, vascularização e temperatura da pele, bem como pela dificuldade de acesso às lambidas do hospedeiro (WAGLAND, 1978). Não obstante, as larvas sofrem com as lambeduras provocadas pela irritação gerada por conta das picadas no animal, e com a resposta inflamatória ao redor do local de fixação, com infiltração de células

inflamatórias, diminuindo a eficiência de sua alimentação (FURLONG, 2005). Em função disso e da resistência genética do bovino, grande parte das larvas pode ser eliminada, contribuindo significativamente para a diminuição de carrapatos no ambiente (FURLONG, 2005).

As larvas alimentam-se preferencialmente de plasma. Apenas nos momentos que precedem o rápido ingurgitamento das ninfas e das fêmeas é que o sangue torna-se o principal constituinte alimentar (BENNETT, 1974). Aproximadamente após 7 dias as larvas sofrem a primeira ecdise, transformando-se em ninfas. Uma segunda ecdise ocorre após 8 dias dando origem a adultos com dimorfismo sexual. Na fase adulta ocorre a cópula e as fêmeas passam a se alimentar de sangue até seu ingurgitamento total e queda ao solo. Os machos permanecem no hospedeiro à procura de novas fêmeas, sobrevivendo até duas vezes mais do que elas (ROBERTS, 1968). Os carrapatos machos adultos recebem a denominação de “neandro” logo após a ecdise e de “gonandro” quando atingem seu tamanho máximo. Já as fêmeas adultas, são denominadas “neóginas” logo após a ecdise, “partenóginas” quando se encontram parcialmente ingurgitadas e “teleóginas” quando estão ingurgitadas e prontas para se desprender do hospedeiro (figura 2) (GONZALES, 1995).

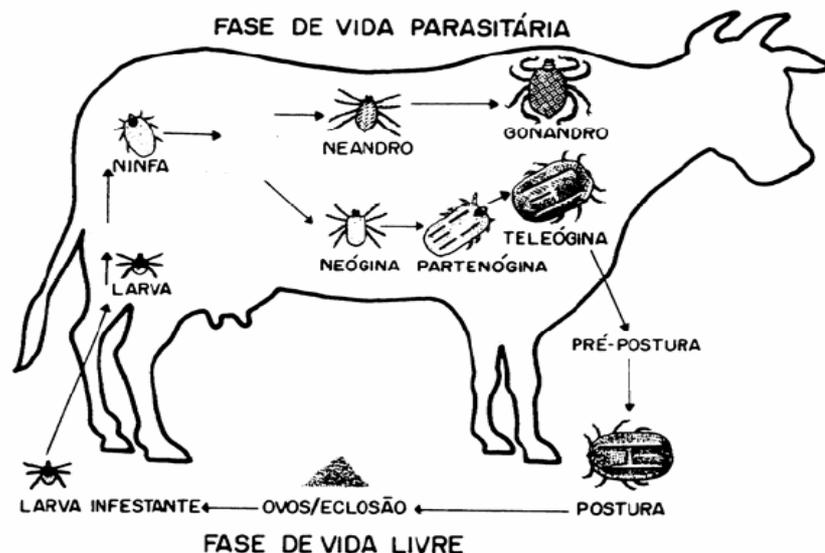


Figura 2 Ilustração do ciclo de vida do *R. microplus*. Fonte: Adaptado de GONZALES, 1995.

Importância econômica

Os carrapatos do gênero *Boophilus* estão entre as principais pragas de importância veterinária em regiões tropicais e subtropicais do mundo. As perdas pelas infestações com o “carrapato-do-boi”, devem-se principalmente pela redução de peso e da produção de leite, e através da transmissão de patógenos que causam a babesiose (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e anaplasmose (*Anaplasma marginale*) (PETER, et al., 2005).

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, com mais de 180 milhões de cabeças de gado (MACHADO et al., 2010), superado apenas pela Índia, que não utiliza o gado para fins comerciais por questões religiosas. O “carrapato-do-boi” é responsável por prejuízos anuais estimados em dois bilhões de dólares (GRISI et al., 2002) sendo um flagelo aos rebanhos bovinos brasileiros. A comercialização de antiparasitários aumentou 33% no Brasil de 2004 a 2009, movimentando mais de R\$ 960 milhões por ano o que representa 34% dos produtos veterinários (SINDAN, 2011).

A dependência metabólica do carrapato com relação aos bovinos ocasiona vários prejuízos ao hospedeiro. A fixação das larvas, ninfas e adultos na pele do animal gera um processo de desorganização da derme que se inicia por meio de um edema, infiltração celular e difusão de um ponto de necrose (PEREIRA, 1982). A presença de substâncias na saliva, com ação anticoagulante, anti-inflamatória, imunossupressora e inibidora do sistema de complemento interfere na hemostasia e inflamação do hospedeiro, podendo causar prurido, edema e ulceração no local da picada (LIMO et al., 1991; RIBEIRO et al., 1985; RIBEIRO, 1989).

A lesão causada na pele dos animais pode favorecer o aparecimento de infecções secundárias como as miíases cutâneas. Essas lesões também acarretam prejuízos no mercado do couro (GONZALES; SERRA-FREIRE, 1992). Os danos causados ao couro reduzem o valor desse produto no mercado, impossibilitando que o Brasil desenvolva todo o seu potencial como produtor de couros de alta qualidade.

A ação debilitante do carrapato sobre o hospedeiro é diretamente proporcional ao grau de infestação. De modo geral, quanto mais grave a infestação do rebanho, maior a interferência em sua capacidade produtiva, sendo que um alto grau de espoliação pode levar os animais ao óbito. Calcula-se que cada fêmea ingurgitada é responsável pela redução de aproximadamente 1,37g de peso dos bovinos (JONSSON, 2006).

Estudos demonstram que a queda na produção de leite pode chegar a mais de 40% em infestações mais graves. Levando-se em conta que as raças mais produtivas, como as europeias, são mais suscetíveis ao carrapato, pode-se perceber o grau de interferência negativa deste parasito no potencial genético e produtivo dos rebanhos leiteiros no Brasil (NUÑES et al., 1982).

Além destes danos diretos existem outros indiretos, resultantes dos custos da mão de obra necessária para o controle, assim como as demais despesas com construção e manutenção de banheiros, compra de equipamentos, aquisição de carrapaticidas, entre outros gastos (GOMES, 2000).

A aplicação de acaricidas, que é a principal forma de controle, possui eficácia limitada na redução da infestação de carrapatos e é muitas vezes acompanhada de sérios inconvenientes, incluindo a seleção de carrapatos resistentes, poluição ambiental e contaminação de produtos lácteos e carne com resíduos químicos (GRAF et al., 2004). Além disso, o desenvolvimento de novos acaricidas é um processo longo e caro, o que reforça a necessidade de abordagens alternativas para controlar as infestações de carrapatos.

Resistência dos bovinos ao carrapato

A resistência do gado aos carrapatos é medida pela percentagem de maturação de 20.000 larvas de uma infestação artificial na primavera ou início do verão. Os animais altamente resistentes produzem menos de 2 % de carrapatos adultos, enquanto os animais com baixa resistência podem produzir entre 15 a 20 % (SUTHERST et al., 1979). A alta

resistência pode ser indicada pela redução do peso final do carrapato ingurgitado, aumento do período de alimentação, decréscimo do número de ovos na postura, redução da viabilidade dos ovos e dificuldade de realizar a muda e ingurgitamento (WIKEL, 1996).

A resistência dos bovinos ocorre de duas formas: inata e adquirida. A primeira não depende do contato prévio do bovino com o *R. microplus*, mas de fatores inatos como o comprimento dos pêlos, espessura e dureza da pele e hábitos do animal. Já a resistência adquirida começa a se evidenciar depois que o animal foi exposto a infestação por carrapato (RIEK, 1962).

O gado *Bos indicus* é sabidamente mais resistente ao *R. microplus* que o gado *Bos taurus* (MACHADO, et al., 2010), embora existam diferentes níveis de resistência tanto entre como dentro de raças (SEIFERT, 1971).

O fato de o gado zebu conviver com o carrapato desde os primórdios em seu processo evolutivo, enquanto o gado europeu estabeleceu contato com esse parasita apenas no momento de sua introdução nos trópicos, é um dos fatores que explicam a superioridade de zebuínos quanto à resistência ao carrapato (ANDRADE, 2001).

Um estudo comparativo do desempenho de novilhas quanto à resistência ao “carrapato-do-boi” com mestiços Holandês com Guzerá em diversas proporções, mostrou que a maior proporção da raça Holandesa estava associada ao maior número de carrapatos (LEMOS, et al., 1985).

Esta resistência manifesta-se por diminuição no número e no tamanho dos carrapatos e pode ser transmitida pelo soro (ROBERTS; KERR, 1976) e por células de gânglios linfáticos (WIKEL, 1996). A demonstração de que drogas imunossupressoras anulam esta resistência reafirmou a natureza imune desta resposta (BERGMAN et al., 2000).

Importantes avanços foram obtidos na seleção de genes marcadores para resistência aos carrapatos pela identificação de 6 QTLs (lócus de caracteres quantitativos que apresentam um padrão de transmissão mendeliano com efeito sobre o caractere desejado), sendo um deles relacionado ao complexo de histocompatibilidade maior em uma geração F2 de Girolandos, de modo que investigações mais aprofundadas destes QTLs auxiliarão a isolar genes envolvidos em mecanismos de resistência em carrapatos no gado (MACHADO, et al., 2010).

O principal obstáculo, porém, para estes avanços é a enorme dificuldade em selecionar animais resistentes sem que haja perda de características de produção, fazendo com que esta abordagem para o controle do *R. microplus* não seja possível a curto ou médio prazo (FURLONG, 2005).

É sabido que a resistência é adquirida durante as sucessivas infestações pelo parasito, embora os mecanismos de sua resistência não sejam totalmente conhecidos. Fortes evidências sugerem que a resistência adquirida é imunologicamente mediada e está associada a um complexo conjunto de reações de hipersensibilidade a antígenos salivares do carrapato na pele de animais resistentes (ALLEN, 1994).

Controle e resistência

O controle deste parasita tem sido feito principalmente por carrapaticidas (DE LA FUENTE et al., 2000). Esses produtos são utilizados de maneira indiscriminada e sem acompanhamento técnico, promovendo a seleção de carrapatos resistentes (DE CASTRO; NEWSON, 1993). Além disso, a má utilização de carrapaticidas predispõe a riscos de contaminação ambiental causando aumento significativo dos custos de produção (KAY; KEMP, 1994).

A resistência tem sido relatada no Brasil para organofosforados (MENDES, et al., 2011), piretróides sintéticos, amitraz (ANDREOTTI, et al., 2011), fipronil (CASTRO-JANER, et al., 2010) e ivermectina (KLAFKE et al., 2011).

Formas alternativas de controle têm se baseado na seleção de bovinos resistentes (ANGUS, 1996), controle imunológico (HOPE et al., 2010, CUNHA et al., 2011) e, em menor escala, no controle biológico, por meio do uso de organismos entomopatogênicos como o fungo *Metarhizium anisopliae*, que tem sido estudado como ferramenta de controle de diferentes espécies de carrapato (GARCIA et al., 2011).

Pastagens nativas com vegetação arbustiva proporcionam abrigo para as teleóginas em

postura, enquanto que algumas pastagens, por serem tóxicas, repelentes ou por imobilizarem as larvas através de secreções ou estruturas da planta, podem limitar bastante o número de carrapatos. Em especial, o plantio de gramíneas do gênero *Stylosanthes* (CASTREJÓN et al., 2003) e do capim-gordura (*Melinis minutiflora*) (FERNANDEZ-RUVALCABA et al., 2004) podem contribuir consideravelmente para o controle do carrapato.

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

A ausência de uma política oficial de controle leva os produtores a adotarem práticas individuais que promovem medidas diferenciadas de controle e contribuem substancialmente para o desenvolvimento de resistência de carrapatos aos poucos grupos ou famílias de produtos carrapaticidas existentes (NOLAN, 1994; MARTINS et al., 1995).

No campo são cada vez mais comuns situações em que não há mais base química capaz de controlar as populações de carrapatos. Uma vez instalada a resistência a um grupo químico ou família de carrapaticidas numa população, pouco se pode fazer para contorná-la (FURLONG, et al., 2007).

As vacinas surgem neste contexto como uma ferramenta alternativa podendo ser usadas em associação com produtos químicos, diminuindo o número de aplicações dos acaricidas e o custo de produção. Em meio a grande procura por formas alternativas, o controle por meio de vacinas com a indução da resposta imune em bovinos têm mostrado resultados promissores (ANDREOTTI et al., 2002). Suas principais vantagens sobre os acaricidas advém do fato de não serem agentes químicos, terem um custo menor, e oferecerem um desenvolvimento de resistência mais lento do que para os produtos químicos (WILLADSEN, 1997).

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

Além do antígeno Bm86, que compõe as vacinas já existentes, outras proteínas também conferem algum grau de imunoproteção ou induzem a produção de anticorpos que interferem no sucesso reprodutivo do carrapato, como por exemplo: um precursor de aspartatoproteinase acumulado no ovo (BYC, de *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin) que foi capaz de conferir proteção imunológica contra o carrapato (LOGULLO et al., 1998); outra aspartatoproteinase denominada THAP (Tick Heme-Binding aspartic Proteinase) (SORGINE, et al., 2000); e a BmTI – inibidor de tripsina, proveniente de larvas de carrapato (ANDREOTTI, et al., 2002).

Coagulação Sanguínea

A cascata de coagulação é considerada uma ativação sequencial de zimogênios, ou seja, cada fator é substrato para a enzima anterior e ativador da proenzima subsequente. A maioria das etapas da coagulação está ligada à proteólise limitada e quase todos os fatores são serinoproteinases, com exceção do fator XIIIa, que é uma transpeptidase.

A coagulação é a formação de um tampão hemostático fibrino-celular estável suficiente para parar o sangramento. O processo de coagulação sanguínea envolve uma complexa interação bioquímica e celular e pode ser dividido em quatro estágios. O primeiro estágio é a formação do fator X ativado (fator Xa) por contato (intrínseco) ou via fator de lesão tecidual (extrínseca). O segundo estágio é a formação de trombina por protrombina por Xa, o terceiro é a formação de fibrina a partir do fibrinogênio pela trombina mediada por proteólise. O quarto e último estágio é a estabilização do coágulo de fibrina pelo fator XIIIa por ligações cruzadas (figura 3) (SCHAUB, 2011).

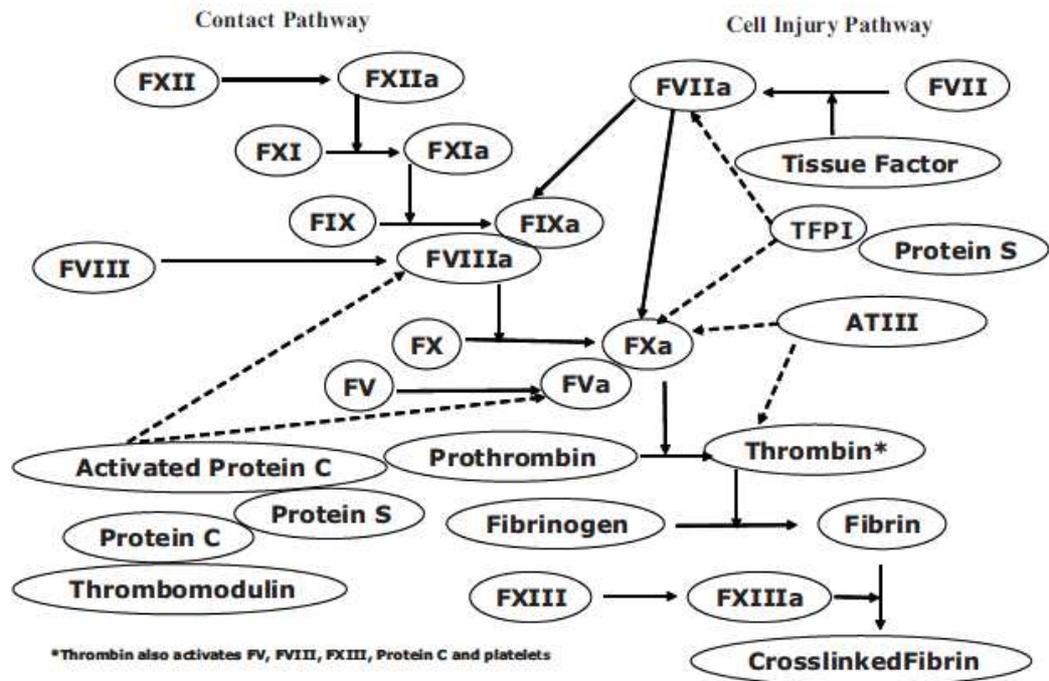


Figura 3 Coagulação sanguínea e formação de fibrina. Fonte: SCHAUB, 2011.

Enzimas proteolíticas

Proteínases são enzimas que clivam proteínas pela catálise da hidrólise da ligação peptídica. Com base em seus mecanismos catalíticos, elas podem ser classificadas em cinco classes principais: cisteinoproteínases (possuem um resíduo de cisteína ativo), aspartatoproteínases (um resíduo de aspartato), treoninaproteínases (um resíduo de treonina), serinoproteínases (um resíduo de serina), e metaloproteínases (proteínases com um íon de metal) (YOUSEF et al., 2003).

De acordo com o banco de dados mais abrangente e mais amplamente utilizado de proteínases e seus respectivos inibidores (MEROPS; <http://www.merops.co.uk>), as enzimas de cada tipo catalítico são classificadas evolutivamente em clãs e cada clã se subdivide em famílias com base na homologia de sequência e ordem da tríade catalítica (RAWLINGS, et al., 2010).

As proteinases estão amplamente encontradas em todos os organismos vivos e desempenham papel crucial em várias funções biológicas e processos fisiológicos. Além de atuarem comumente na digestão, as proteinases estão envolvidas também na metamorfose (EGUCHI, 1993), cicatrização de feridas (THEOPOLD, et al., 2004), imunidade inata (KANOST, 1999; JIRAVANICHPAISAL, et al., 2006) e na patogênese de certos organismos (TRAVIS, et al., 1995; SUPURAN, et al., 2002), entre outros.

As serinoproteinases têm preferência para catalisar a hidrólise de ligações peptídicas adjacentes a uma classe particular de aminoácidos. No grupo das enzimas semelhantes à tripsina, as proteases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas envolvendo os aminoácidos básicos arginina (Arg) e lisina (Lis), uma vez que elas têm um resíduo de aspartato ou glutamato no sítio de ligação do substrato, que pode formar uma forte ligação eletrostática com aqueles resíduos (YOUSEF et al., 2003). Estão envolvidas em muitas funções fisiológicas como digestão, coagulação do sangue e fibrinólise, fertilização e ativação do complemento em respostas imunológicas e, estão também associadas a muitas doenças, como câncer, artrite e enfisema (YOUSEF et al., 2003).

Inibidores de Serinoproteinases

Os inibidores de proteinases permitem a regulação da taxa de proteólise na presença da enzima ativa (CHERQUI et al., 2001). Podem ser classificados de acordo com as proteinases que inibem, podendo então ser inibidores das serinoproteinases, cisteinoproteinases, treoninaproteinases aspartatoproteinases e metaloproteinases.

Entre os inibidores de serinoproteinases, são bem conhecidos a família Kazal, Kunitz, Bowman-Birk, α -2-macroglobulina, serpina e pacifastina. Inibidores de serinoproteinases de mamíferos têm sido identificados em diversas fontes, incluindo plantas como a soja, órgãos como o pâncreas de humanos e hemolinfa de diversos artrópodes (CHERQUI et al., 2001).

A família de polipeptídeos tipo Kunitz é grande e amplamente distribuída, mas é aparentemente ausente em procariotos. O membro mais bem estudado desta família é o

inibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI; aprotinina), que foi cristalizado pela primeira vez em 1936. A maioria dos inibidores de serinoproteinases são membros da família Kunitz (KUNITZ; NORTHRUP, 1936; ROBERTS, et al., 1995), apresentam baixo peso molecular (cerca 60 aminoácidos) e caracterizam-se basicamente pela colocação de seis resíduos de cisteína conservados que formam três ligações dissulfeto que contribuem para a natureza compacta e estável do polipeptídeo dobrado (LASKOWSKI; KATO, 1980).

Os inibidores de Kunitz-BPTI são amplamente distribuídos entre os artrópodes, e têm sido descritos principalmente em insetos como bichos da seda, lepidópteros, moscas e besouros. Estes inibidores podem participar nos processos de defesa contra entomopatógenos, controlando a cascata de profenoloxidase ou inibindo proteases de bactérias e fungos entomopatogênicos (SASAKI; TANAKA, 2008).

Entre os inibidores tipo Kunitz, foram bem estudadas as seguintes moléculas: o peptídeo anticoagulante do carrapato (TAP) de *Ornithodoros moubata*; inibidor do fator Xa da coagulação sanguínea (WAXMAN et al., 1990); ornitorina e savignina, inibidores de trombina purificados de *O. moubata*. e *O. savignyi*; (VAN de LOCHT et al., 1996, MANS et al., 2002), Ixolaris e Penthalaris, inibidores do fator Xa e do fator tecidual/FVIIa (FRANCISCHETTI et al., 2002, FRANCISCHETTI et al., 2004); KPI de *Dermacentor variabilis* com atividade inibitória para tripsina e riqueticida (CERAUL, et. al, 2008).

Inibidores de tripsina de *R. microplus* (BmTIs)

Durante a evolução, os mamíferos desenvolveram um complexo sistema hemostático para prevenir a perda de sangue, e mecanismos anti-hemostáticos evoluíram em animais hematófagos para combatê-la. Como artrópodes sugadores de sangue, os carrapatos desenvolveram um conjunto diversificado de agentes anti-hemostáticos para a alimentação de sucesso, incluindo o inibidores de FX, FXa, inibidores de trombina, inibidores da via do fator tecidual, inibidor de calicreína-cinina e inibidores de adesão e agregação plaquetárias (GAO et al., 2011).

A hemostasia é um mecanismo de defesa fundamental presente em todos os vertebrados que envolve dois processos complementares: a formação do coágulo sanguíneo, ou trombo, para impedir a perda de sangue mediante uma injúria vascular, e o processo de dissolução do trombo, ou fibrinólise, após o reparo das células endoteliais. Ambos são processos complexos que envolvem múltiplas interações interdependentes entre plaquetas, células endoteliais, leucócitos e proteínas plasmáticas (GENTRY, 2004).

Mais de um terço de todas as enzimas proteolíticas conhecidas são serinoproteinases, dentre elas a tripsina sofreu a mais predominante expansão genética produzindo enzimas responsáveis para a digestão, coagulação sanguínea, fibrinólise, desenvolvimento, fertilização, apoptose, e imunidade. O sucesso desta expansão resultou na alta eficiência do sítio catalítico e nas interações regulatórias (DI CERA, 2009).

Os carrapatos são fontes em inibidores de tripsina, principalmente pertencentes à família BPTI-Kunitz (SASAKI; TANAKA, 2008). Os inibidores influenciam na coagulação sanguínea alterando o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcialmente ativado em bovinos. A concentração desses inibidores diminui rapidamente no início da fase de vida parasitária, sugerindo que o inibidor seria secretado no interior do hospedeiro após a fixação da larva (WILLADSEN; RIDING, 1980). Esses inibidores interferem no processo de defesa do hospedeiro contra o carrapato facilitando a alimentação deste no período inicial da fase de vida parasitária (WILLADSEN; McKENNA, 1983).

Durante o longo período de alimentação dos ixodídeos, o sistema imune do hospedeiro tenta expulsar o parasito. Para completar alimentação com sucesso, os carrapatos secretam uma matriz de proteínas bioativas da saliva que modulam o equilíbrio homeostático do hospedeiro (figura 4) (MULENGA et al., 2001).

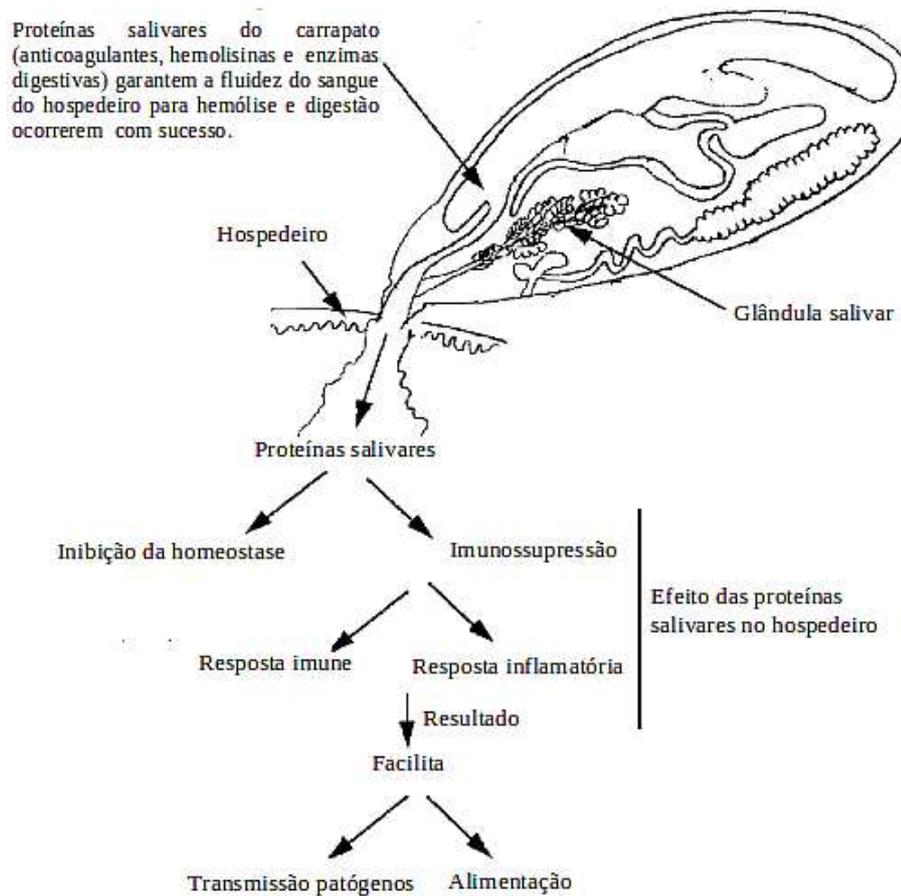


Figura 4 : Representação esquemática da suposta funções das proteínas salivares e intestinais do carrapato na alimentação e transmissão de patógenos. Fonte: MULENGA, et al., 2001

Essas e outras evidências têm sugerido que esses inibidores são importantes no processo de fixação e no sucesso de alimentação das larvas (WILLADSEN; McKENNA, 1983). As larvas que não se alimentam e se situam próximo à pele do bovino morrem

rapidamente, perdendo em média 6 mg de peso vivo em 12 horas porque o ambiente próximo à pele do bovino desseca a larva. As primeiras 24 horas da fase parasitária são as mais críticas para a sobrevivência larval (KEMP et al., 1971).

Os dois primeiros inibidores de tripsina presentes em larvas de *R. microplus* foram descritos em 1980 (WILLADSEN; RIDING 1980). Estes foram descritos como *double-headed* e são capazes de inibir duas moléculas de enzimas ao mesmo tempo para tripsina e quimotripsina (ANDREOTTI, et al., 2000).

A partir de larvas de *R. microplus* foram isolados e purificados dois inibidores de tripsina denominados *BmTI-A* com 18 KDa e *BmTI-B* com 10 KDa, por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose-tripsina, associada a cromatografia de troca de iônica (ANDREOTTI, et al., 1999). O inibidor de tripsina *BmTI-A*, foi caracterizado como inibidor de serinoproteinase membro da família BPTI-Kunitz (TANAKA et al., 1999).

A *BmTI-A* não interfere nos seguintes tempos de coagulação: tempo protrombina (PT) e tempo de trombina (TT), mas ativa o tempo parcial de ativação da tromboplastina (APTT) que foi prolongado por três vezes. Os resultados confirmam que o inibidor pode ser importante na inibição da coagulação sanguínea por calicreína plasmática uma vez que não inibe o fator Xa. (ANDREOTTI, et al., 1999). A inibição de calicreína plasmática humana (HuPK) ocorre no primeiro domínio da *BmTI-A*, enquanto a inibição de elastase de neutrófilos (HNE) depende do segundo domínio (TANAKA et al., 1999). A HuPK é uma das serinoproteinasas que participa da coagulação sanguínea dos vertebrados e dos processos de inflamação, sugerindo ter um importante papel na relação parasito-hospedeiro (SASAKI et al., 2004).

A partir de ovos e larvas de *R. microplus* foram isolados um total de 12 formas de inibidores de tripsina (*BmTI-A-F* e *BmTI-6*) por cromatografia de afinidade em coluna de sepharose-tripsina, associada a cromatografia de troca de iônica. A *BmTI-D* foi mais eficiente na inibição da HuPK (Ki 12 nM) do que a *BmTI-A* (Ki 120 nM), descrito anteriormente (SASAKI et al., 2004).

O alinhamento das sequências de nucleotídeos da *BmTI-6* (GUERRERO, et al., 2005) com a sequência *BmTIS* otimizada para códons usuais de *Pichia pastoris*, mostrou identidade

de 78%, enquanto o alinhamento das sequências de aminoácidos da BmTI-A (TANAKA et al., 1999), do fragmento BmTI sintético (ANDREOTTI et al., 2007), da BmTI-6 (GUERRERO, et al., 2005) com a sequências de aminoácidos da BmTIS mostrou 99% de identidade da BmTIS em relação à BmTI-6 (Figura 4).

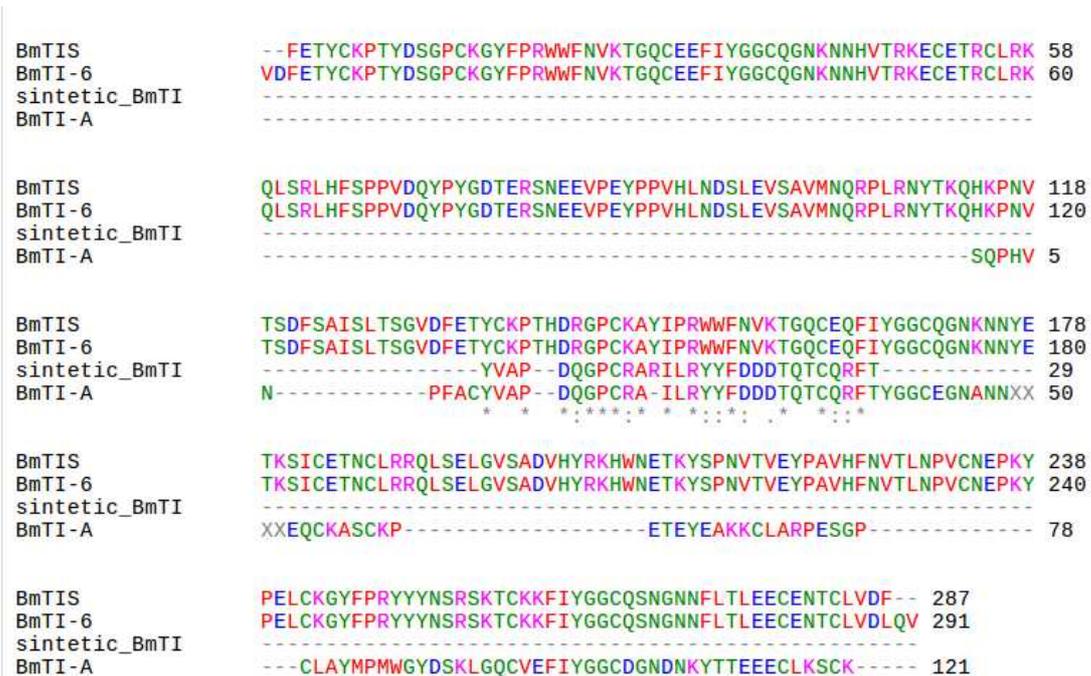


Figura 4 Alinhamento das sequências de aminoácidos das BmTIs. Fonte: ClustalW.

Um ensaio vacinal com BmTIs extraídas de larvas de carrapatos por métodos cromatográficos apresentou 72,8% de eficácia protetora contra carrapatos e afetou os parâmetros reprodutivos reduzindo 69,7% o número de teleóginas e 71,3% do peso de ovos (ANDREOTTI et al., 2002). Um peptídeo sintético desenhado a partir da sequência parcial de aminoácidos da BmTI-A mostrou 18,4% de eficácia na imunoproteção de animais cruzados (ANDREOTTI, 2007). No entanto, apenas uma quantidade muito pequena de BmTIs pode ser

purificada de larvas e ovos por métodos cromatográficos, sendo portanto, essencial a produção de BmTI recombinante para ser usada como antígeno vacinal.

Pichia pastoris

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem sido muito utilizada para expressão de proteínas heterólogas devido às suas grandes vantagens em relação aos outros sistemas de expressão. As técnicas requeridas para sua manipulação são semelhantes às descritas para *Saccharomyces cerevisiae*, um dos sistemas mais bem caracterizados geneticamente (CREGG; CEREGUINO, 2000). As suas características mais vantajosas são: ter status GRAS (*Generally Regarded As Safe*), ser de fácil manipulação genética, expressar proteínas heterólogas em altos níveis, ser um sistema eucariótico capaz de promover O- e N-glicosilação, além de ser capaz de processar as sequências sinais (HOHENBLUM et al., 2004). Além disso, comparado com outros sistemas baseados em eucariotos superiores, como as culturas de células de mamíferos, este sistema é considerado de uso rápido, fácil e mais econômico (GELLISSEN, 2000).

As leveduras metilotróficas têm a habilidade de utilizar metanol como única fonte de carbono, sendo que o primeiro passo no metabolismo do metanol é sua oxidação a formaldeído, catalisado pela enzima álcool oxidase (AOX), que utiliza o oxigênio molecular e gera peróxido de hidrogênio. As reações iniciais ocorrem em microcorpúsculos especializados, os peroxissomos, seguidas por uma etapa metabólica subsequente no citoplasma. A AOX catalisa a primeira etapa na rota do metanol, a oxidação deste em formaldeído e peróxido de hidrogênio. AOX é armazenada dentro de peroxissomos pela catalase, que degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. O formaldeído sai do peroxissomo sendo oxidado para formar dióxido de carbono por duas desidrogenases citoplasmáticas, reações que são a fonte de energia das células que crescem em metanol. O formaldeído restante é assimilado para formar constituintes celulares por um caminho cíclico

que se inicia com a condensação do formaldeído com xilulose-5-monofosfato, uma reação catalisada por uma terceira enzima peroxissomal a diidroxiacetona sintase (DHAS). Os produtos dessa reação, gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona saem do peroxissomo e entram em um caminho citoplasmático que regenera a xilulose-5-monofosfato, em três etapas. Duas das enzimas da rota do metanol, AOX e DHAS, estão presentes em altos níveis no crescimento celular em metanol, mas não são detectáveis em células crescendo em outras fontes de carbono (glicose, glicerol, etanol) (figura 5) (CREGG; CEREGUINO, 2000).

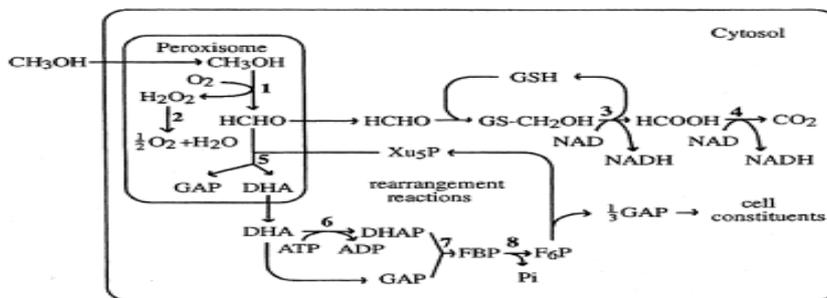


Figura 5 Rota do metanol em *P. pastoris*. 1, álcool oxidase; 2, catalase ; 3, formaldeído desidrogenase; 4, formiato desidrogenase, 5, diidroxiacetona sintase; 6, diidroxiacetona quinase; 7, frutose 1,6-bisfosfato aldolase; 8, frutose 1,6-bisfosfatase Fonte: CREGG & CEREGUINO, 2000

P. pastoris possui dois genes que codificam para a AOX – *AOX1* e *AOX2* –, sendo o primeiro responsável por 85% da atividade de álcool-oxidase na célula. A AOX tem baixa afinidade por O_2 e as leveduras metilotróficas compensam esta deficiência sintetizando grandes quantidades desta enzima (CREGG; CEREGUINO, 2000; JAHIC, 2003; GELLISSEN, 2000).

O promotor do gene *AOX1* é fortemente reprimido quando as células crescem em outras fontes de carbono. Contudo, a ausência de uma fonte de carbono repressora no meio, como a glicose, não resulta em uma transcrição substancial do *AOX1*. A presença de metanol como única fonte de carbono é essencial para a indução de altos níveis de expressão (TSCHOPP et al., 1987), podendo aumentar a concentração de AOX até esta constituir mais de 30% do total de proteínas solúveis (COUDEK; BARATTI, 1980; ROGGENKAMP et al., 1984).

O método de transformação mais utilizado em *P. pastoris* é por meio de integração cromossomal. Este método oferece vantagens como: estabilidade do cassete e expressão, geração de transformantes com múltiplas cópias, controle do sítio de integração e a capacidade de construir variados modos de integração (SREEKRISHNA et al., 1997). Vetores linearizados podem promover a recombinação homóloga entre as sequências compartilhadas pelo vetor e pelo genoma e, desta maneira, a integração pode ocorrer via inserção por um simples evento de *crossover* ou por substituição gênica, por meio de duplo *crossover*. A integração por inserção ocorre mais frequentemente e pode resultar em múltiplas integrações *in tandem* do cassete de expressão a uma taxa de 1 a 10%, podendo aumentar a quantidade de proteína expressa. Por outro lado, apesar das transformações por substituição gênica geralmente resultarem em transformantes de cópia única, estas são geneticamente mais estáveis.

P. pastoris tem preferência por crescimento respiratório, com a utilização de O₂, o que lhe permite o crescimento até altas densidades celulares (500 OD₆₀₀) e, conseqüentemente, a obtenção de níveis superiores das proteínas expressas (CREGG; CEREGUINO, 2000). Além disso, esta levedura glicosila as proteínas de forma bem próxima aos metazoários (BRETTHAUER; CASTELLINO, 1999).

A expressão da proteína recombinante em *P. pastoris* pode ser intracelular ou extracelular. A vantagem desta última é que esta levedura secreta baixas quantidades de proteínas endógenas e seu meio de crescimento não contém proteínas adicionais, o que facilita as etapas seguintes de purificação (TSCHOPP et al., 1987; BARR et al., 1992; CREGG; CEREGUINO, 2000).

A secreção requer a presença de uma sequência sinal que direcionará a proteína para esta via. O sinal de secreção do fator- α de *S. cerevisiae* é o de maior sucesso e o mais utilizado nos vetores de expressão para *P. pastoris* (CREGG; CEREGUINO, 2000). Durante a via de secreção, o peptídeo sinal do fator- α é clivado por uma peptidase-sinal presente na membrana do retículo endoplasmático. Após a proteína ganhar o lúmen do retículo endoplasmático, a protease Kex2p da levedura reconhece o sítio de clivagem Lys-Arg e libera a porção pró do fator- α . A presença de sequência Glu-Ala próxima ao sítio de clivagem da

Kex2p, pode aumentar a atividade desta enzima, e ser posteriormente removida da proteína madura pela ação de uma diaminopeptidase, produto do gene STE13 (DALY; HEARN, 2005).

Em relação ao gene *AOX1*, dois tipos de cepas de *P. pastoris* podem ser obtidas, variando com relação à sua capacidade de utilizar o metanol. As cepas com mutações nos genes da AOX são por vezes melhores produtores de proteínas exógenas do que as do tipo selvagem (TSCHOPP et al., 1987; CHIRUVOLU et al., 1997). Além disso, estas cepas não exigem grandes quantidades de metanol e são rotineiramente utilizadas para fermentação em grande escala. A linhagem X33 pode gerar clones com fenótipo do tipo Mut^S, que refere-se à baixa utilização de metanol, causado pela perda de atividade da álcool-oxidase codificada pelo gene *AOX1*, e clones com fenótipo Mut⁺, que refere-se a alta utilização de metanol, justamente por manter os dois genes que codificam para AOX. A estirpe com um fenótipo Mut^S tem o locus *aox1* mutante, mas é do tipo selvagem para *AOX2*. Isto resulta em um fenótipo de crescimento lento na presença de metanol. Ambos recombinantes, Mut⁺ e Mut^S, são úteis, pois, um fenótipo pode favorecer a melhor expressão da proteína recombinante do que o outro. Como não há maneira de se prever qual fenótipo vai expressar melhor a proteína, o recomendado é analisar os diferentes tipos de recombinantes.

REFERÊNCIAS

- AGBEDE, R.I.; KEMP, D.H. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: histopathology of ticks feeding on vaccinated cattle. **International Journal for Parasitology**. v.14, n.1, p.35-4, 1986.
- ALLEN, J.R. Host resistance to ectoparasites. *Ver. Sci. Tech. Off. Epiz.*, v.13, p. 1287-13, 1994.
- ANDRADE, A.B.F. Análise genética da infestação de fêmeas da raça Caracu por carrapato (*Boophilus microplus*) e mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*). 2001. 104f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.
- ANDREOTTI, R., GOMES, A. TORQUATO, R.J.S, SAMPAIO, C.A.M., TANANKA, A.S., Partial purification of serineprotease inhibitor from boophilus microplus larvae. **Revista Brasileira de Parastiologia Veterinária** 8,2, 93-98, 1999.
- ANDREOTTI, R., GOMES, A., SAMPAIO, C.A.M., TANAKA, A.S. Immunoprotection induced in calves by a serine proteinase inhibitor from *Boophilus microplus* unfed larvae. **Revista Brasileira de Parastiologia Veterinária**, 9,2, 85-89, 2000
- ANDREOTTI, GOMES, A., MALAVAZI-PIZA, K.C., SASAKI, S.D., SAMPAIO, C.A M., TANAKA, A.S. BmTI antigen induce as bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **Internantional Immunopharmacology**, v. 2, p. 557-563, 2002.
- ANDREOTTI, R. Synthetic bmti n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. *Exp. Parasitol.* 116: 66– 70. 2007.
- ANDREOTTI, R., GUERRERO, F.D, SOARES, M.A., BARROS, J.C. , MILLER , R.J., LÉON, A.P. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil . **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 2, p. 127-133, 2011.
- ANUALPEC 2009. São Paulo: AgraFNP, 2009. 360 p.
- ANGUS, B.M., The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. **International Journal for Parasitology**. 26, 1341–1355, 1996.
- BARR, K. A.; HOPKINS, S. A.; SREEKRISHNA, K. Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. **Pharmaceutical Engineering**, v. 12, 48–51, 1992.
- BENNET, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). II. Influences of temperature, humidity and light. **Acarologia**, Paris, v. 16, p. 250-257, 1974.

- BERGMAN, D.K., PALMER, M. J., CAIMANO, M. J., RADOLF, J. D., WIKEL, S. K. et al. Isolation and molecular cloning of a secreted immunopressant protein from *Dermacentor andersoni* salivary gland. **Journal for Parasitology**, v. 86, n. 3, p. 516-525, 2000.
- BRETTTHAUER, R. K.; CASTELLINO, F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.30, n. 3, p.193-200, Dec, 1999.
- CASTREJÓN, F. M., CRUZ-VÁZQUEZ C., FERNÁNDEZ-RUVALCABA, M. , MOLINA-TORRES, J., CRUZ, J. S., PARRA, M.R. Repellence of *Boophilus microplus* larvae in *Stylosanthes humilis* and *Stylosanthes hamata* plants, *Parasitol. Latinoam.* 58 (2003) 118–121.
- CASTRO-JANER, E., MARTINS, J.R., MENDES, M.C., NAMINDOME, A., KLAFKE, G.M., SCHUMAKER, T.T.S. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. **Veterinary Parasitology** 173, 300–306, 2010.
- CERAUL, S.M. ,DREHER-LESNICK, S. M. ,MULENGA, A.,RAHMAN,M. S., AZAD, A.F. Functional Characterization and Novel Rickettsiostatic Effects of a Kunitz-Type Serine Protease Inhibitor from the Tick *Dermacentor variabilis*. **Infection and Immunity**, p. 5429–5435 Vol. 76, No. 11, 2008.
- CHERQUI, A., CRUZ, N., SIMÕES, N. Purification and characterization of two serine protease inhibitors from the hemolymph of *Mythimna unipuncta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 31, 761–769, 2001.
- CHIRUVOLU, V., CREGG, J. M. e MEAGHER, M. M. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fed-batch fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 277-283, 1997.
- CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: controle ou erradicação**. 2. ed. Guaíba: Agropecuária, p. 177, 1997.
- COUDEC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, p. 2279-2289, 1980.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23-52, Sep, 2000.
- CUNHA, R.C., ANDREOTTI, R., LEITE, F.P.L. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: expression and characterization of Bm86-CG in *Pichia pastoris*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, n. 2, p. 103-110, 2011.
- DALY, R.; HEARN, M.T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, n. 2, p. 119-38, 2005.
- DE CASTRO, J.J., NEWSON, R.M. Host resistance in cattle tick control. **Parasitology**. 9: 13-17, 1993.

- DE LA FUENTE, J; GARCÍA-GARCÍA, J. C.; GONZÁLEZ, D. M.; IZQUIERDO, G. OCHAGAVIA, M. E. Molecular analysis of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) tick strains. **Veterinary Parasitology** 92: 209-222, 2000.
- DI CERA, E. Serine Proteases, Critical Review, **IUBMB Life**, 61(5): 510–515, 2009
- EGUCHI M. Protein protease inhibitors natural in insects and comparison with mammalian inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, 105:449–56, 1993.
- ESTRADA-PEÑA, A. . Geostatistics and remote sensing using NOAA-AVHRR satellite imagery as predictive tools in tick distribution and habitat suitability estimations for *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology** 81,73-82,1999.
- FERNANDEZ-RUVALCABA, M., PRECIADO-DE-LA TORRE, F., CRUZ-VAZQUEZ, C., GARCIA-VAZQUEZ, Z. Anti-tick effects of *Melinis minutiflora* and *Andropogon gayanus* grasses on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae, *Experimental and Applied Acarology* ,v.32, n. 4, 293-299, 2004.
- FRANCISCHETTI, I.M., VALENZUELA, J.G., ANDERSEN, J.F., MATHER, T.N., RIBEIRO, J.M., Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. **Blood** 99, 3602–3612, 2002.
- FRANCISCHETTI, I.M., MATHER, T.N., RIBEIRO, J.M., Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. **Thrombosis and Haemostasis**. 91, 886–898, 2004.
- FURLONG, J. **Carrapato: problemas e soluções**. Juiz de Fora-MG. EMBRAPA Gado de leite, 65p., 2005.
- FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, p. 26-32, 2007.
- GAO, X., SHI, L., ZHOU, Y., CAO, J., ZHANG, H., ZHOU, J. Characterization of the anticoagulant protein Rhipilin-1 from the *Rhipicephalus haemaphysaloides* tick, **Journal of Insect Physiology** 57, 339–343, 2011.
- GARCIA, M.V., MONTEIRO, A.C., SZABÓ, M.P.J., MOCHI, D.A., SIMI,L.D., CARVALHO,W.M., TSURUTA, S.A., BARBOSA, J.C. Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil **Veterinary Parasitology** v. 181,p. 267-273, 2011.

- GENTRY, P. A. Comparative aspects of blood coagulation. **Veterinary Journal**, v. 168, n. 3, p. 238-51, 2004.
- GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 6, p.741-50, Dec, 2000.
- GOMES, A. Carrapato-de-boi: prejuízos e controle. Embrapa: Gado de Corte, 2000. Disponível em: < <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD42.html>> Acesso em: 18 jul. 2011.
- GONZALES, J. C. O controle do carrapato dos bovinos. Porto Alegre: Sulina, 1975. 103p.
- GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995. 235 p.
- GONZALES J.C., SERRA-FREIRE N.M. O couro dos bovinos no Rio Grande do Sul: riqueza há muito maltratada. **A Hora Veterinária** 12(69):14-6, 1992.
- GRAF J.F., GOGOLEWSKI R., LEACH-BING N, .SABATINI G.A., MOLENTO M.B., BORDIN E.L., ARANTES G.J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology** 129:S427–S442, 2004.
- GRISI, L. MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 125, p. 8-10, 2002.
- GUERRERO, F.D., MILLER, R.J., ROUSSEAU, M.E., SUNKARA, S., QUACKENBUSH, J., LEE, Y., NENE, V. BmiGI: a database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 585–595. 2005.
- GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R.G.; APANASKEVICH,D.A.; PETNEY, T.N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.G. SHAO, R.;BARKER, S.C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names, *Zootaxa* 2528: 1–28, 2010.
- HOOGSTRAAL, H. 1978. Biology of ticks. In: Tick-borne diseases and their vectors, edited by Wilde, J. K. H. Proc. Internal Conf. (Edinburgh, September-October 1976) pp. 3-14.
- HOOGSTRAAL, H; KIM, K. C. Tick and mammal co-evolution, with emphasis on *Haemaphysalis*. In: KIN, K. C. **Coevolution of parasitic artropods and mammals**. New York: Wiley & Sons, 1985, 569p.
- HOHENBLUM, H. GASSER B., MAURER M., BORTH N., MATTANOVICH, D. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 85, n. 4, p.367-75, 2004.

- HOPE, M., JIANG,X.,GOUGH, J., CADOGAN, L., JOSH, P., JONSSON, N., WILLADSEN, P. Experimental vaccination of sheep and cattle against tick infestation using recombinant 5`-nucleotidase. **Parasite Immunology**. v. 32, p. 135–142, 2010.
- JIRAVANICHPAISAL P., LEE B.L., SÖADERHÄLL K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**. 211:213–36, 2006.
- JONSSON, N.N., The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology** 137: 1-10, 2006.
- JAHIC, M. **Process techniques for production of recombinant proteins with *Pichia pastoris***. Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology. Ph.D. thesis, Stockholm, 2003.
- KANOST M.R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, 23:291–301, 1999.
- KAY, B.H., KEMP, D.H. Vaccines against arthropods. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 50. 87-96, 1994.
- KEMP D.H., KOUDSTAAL D., KERR J.D. Labelling larvae of the cattle-tick *Boophilus microplus*, with 32p to follow their movements on the host. **Parasitology**;63:323–30, 1971.
- KLAFKE, G.M., CASTRO-JANER, E., MENDES, M.C, NAMINDOME, A., SCHUMAKER, T.T.S., Applicability of *in vitro* bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) **Veterinary Parasitology** 160, 70–73, 2011.
- KUNITZ M., NORTHRUP J. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, trypsin inhibitor, and an inhibitor trypsin compound. **The Journal of General Physiology**; 19:991–1007, 1936.
- LASKOWSKI Jr. M, KATO I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry** ;49:593–626, 1980.
- LEMOS, A.M., TEODORO, R.L.; OLIVEIRA, G.P. Comparative performance of six Holstein-Friesian x Guzera grades in Brazil. 3. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. Comparative performance of six Holstein-Friesian x Guzera grades in Brasil. **Animal Production**, v.41, p.187-191, 1985.
- LIMO, M. K.; VOIGT, W. P.; TUMBO-OERI, A.G.; NJOGU, R. M.; OLE-MOIYOI, O.K. Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Experimental Parasitology**; v.72, n. 4, p. 418-29, 1991.

LOGULLO, C., DA SILVA VAZ, I., SORGINE, M.H.F., PAIVA-SILVA, G.O., FARIA, F.S., ZINGALI, R.B., DE LIMA, M.F.R., ABREU, L., FIALHO OLIVEIRA, E., 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*. **Parasitology**, v. 116, n. 6, p. 525-532, 1998.

MACHADO, M.A., AZEVEDO, A. L. S., TEODORO, R.L., PIRES, M. A., PEIXOTO, M. G. C.D., CÉLIO DE FREITAS, PRATA, M.C.A., FURLONG, J., DA SILVA, M.V.G.B., GUIMARÃES, S.E.F., REGITANO, L.C.A., COUTINHO, L.L., GASPARIN, G., VERNEQUE, R.S. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* × *Bos indicus*) **BMC Genomics**, 11:280 2010,

MANS, B.J., LOUW, A.I., NEITZ, A.W., Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. **The Journal of Biological Chemistry** 277, 21371–21378, 2002.

MARTINS, J. R. S. et al., A situation report on resistance to acaricides by the cattle tick *Boophilus microplus* in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, 3., 1995, Acapulco. **Anais...** SAGAR, CANIFARMA, FAO, IICA, INIFAP, p. 1-8, 1995.

MENDES M.C., LIMA C.K., NOGUEIRA A.H., YOSHIHARA E., CHIEBAO D.P., GABRIEL F.H., UENO T.E., NAMINDOME A., KLAFKE G.M. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n.3-4, p.383-388, 2011.

MULENGA, A., SUGINO, M., NAKAJIMA, M., SUGIMOTO, C., ONUMA, M. Tick-Encoded Serine Proteinase Inhibitors (Serpins); Potential Target Antigens for Tick Vaccine Development. **REVIEW Immunology, Journal of Veterinary Medical Science** 63(10): 1063–1069, 2001.

NOLAN, J. Acaricide resistance in the cattle tick, *Boophilus microplus*. Report of **Workshop** Leader - FAO/UN Consultant. Porto Alegre, RS, Brazil, p. 21-25, November, 1994. 23 p.

NUÑES, J. L.; MUÑOZ COBENAS, M. E.; MOLTEDO, H. L. ***Boophilus microplus*, la garrapata comun del ganado vacuno**. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1982. 19 p.

PEREIRA, M. C. *Boophilus microplus*: revisão taxonômica e morfológica. Rio de Janeiro: Químico Divisão Veterinária, 167 p., 1982.

PETER RJ, VAN DEN BOSSCHE P, PENZHORN BL & SHARP B. Tick, fly, and mosquito control – Lessons from the past, solutions for the future. **Veterinary Parasitology**; 132: 205–215, 2005.

RAND, K. N., MOORE, T., SRISKANTHA, A., SPRING, K., TELLAM, R., WILLADSEN, P., COBON, G.S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick

- Boophilus microplus*. Proceedings of the National. **Academy of Science U. S. A.**, v. 86, n. 24, p. 9657-9661, 1989.
- RAWLINGS, N.D. , BARRETT, A.J.,BATEMAN A. MEROPS: the peptidase database Nucleic Acids Research, Vol. 38, (Database issue): D227–D233, 2010.
- RIBEIRO, J. M.; MAKOUL, G. T.; LEVINE, D. R.; ROBINSON, D. R.; SPIELMAN, A. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick. *Ixodes Dammini*. **Journal of Experimental Medicine**, v.161, p. 332 -334, 1985.
- RIBEIRO, J. M. Role of saliva in tick/host interactions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 7, p. 15–20, 1989.
- RIEK, R.F. Factors influencing the susceptibility of cattle to tick infestation. **Australian Veterinary Journal**, v. 13, p. 532-550, 1962.
- RIEK, R. F. The cattle tick and fever. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 41, p. 211-215, 1965.
- ROBERTS, J.A. Acquisition by the host of resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 54, p. 657-662, 1968.
- ROBERTS, J. A.; KERR, J. D. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. **Journal of Parasitology**, v.62, n.3, p.485-488, 1976.
- ROBERTS R.M., MATHIALAGAN N., DUFFY J.Y., SMITH G.W. Regulation and regulatory role of proteinase inhibitors. **Critical reviews in Eukaryotic Gene Expressions**. 5:385-436, 1995.
- ROCHA, C.M.B.M. Aspectos relevantes da biologia do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Lavras: UFLA, 1997. **Boletim técnico: série Extensão da Universidade Federal de Lavras**, ano VII, 1998.
- ROGGENKAMP, R., JANOWICZ, Z. , STANIKOWSKI B., HOLLENBERG C.P., Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 194, n. 3, p. 489–493, 1984.
- SASAKI,S. D., AZZOLINI ,S. S., HIRATA I.Y., ANDREOTTI, R., TANAKA, A. S. *Boophilus microplus* tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors. **Biochimie** 86 643–649, 2004.
- SASAKI, S. D., TANAKA ,A. S. *rBmTI-6*, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick *Boophilus microplus*, its cloning, expression and biochemical characterization. **Veterinary Parasitology** 155, 133–141, 2008.
- SCHAUB, R. G. Recent advances in the development of coagulation factors and procoagulants for the treatment of hemophilia. **Biochemical Pharmacology** 82, 91–98, 2011.

SEIFERT, G.W.; Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of the cattle tick (*Boophilus microplus*), **Australian Journal of Agricultural Research** v. 22, p. 159–168, 1971.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Saúde Animal, 2010. Mercado veterinário por classe terapêutica e espécie animal, 2009. Disponível em: < <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html> >. Acesso em: 15 jul. 2011.

SONENSHIME, D. E. **Biologia of ticks**. New York: Oxford University Press, 1993. 316 p.

SORGINE, M.H., LOGULLO, C., ZINGALLI, 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*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28.659-28.665, 2000.

SREEKRISHNA, K., BRANKAMP, R.G., KROPP K. E., BLANKENSHIP D. T., TSAY J., SMITH ,P. L., WIERSCHKE, J. D., SUBRAMANIAM, A., BIRKENBERGER, L.A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 190, n. 1, p.55-62, Apr, 1997.

SUPURAN C.T., SCOZZAFAVA A., CLARE B.W. Bacterial protease inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, 22:329–72, 2002.

SUTHERST R.W., SUTHERLAND I.D., MAYWALD G.F., **International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE) proceedings**, ISVEE 2: Veterinary Epidemiology and Economics, Proceedings of the 2nd International Symposium, Canberra, Australia, Economic studies of control measures in single livestock units - other diseases session, pp 408-415, May 1979.

TANAKA A. S., ANDREOTTI R., GOMES, A. , TORQUATO, R.J.S., SAMPAIO M.U., SAMPAIO, C.A.M. A double headed serine proteinase inhibitor — human plasma kallikrein and elastase inhibitor — from *Boophilus microplus* larvae. **Immunopharmacology**, 45, 171–177, 1999.

THEOPOLD U., SCHMIDT O, SÖADERHÄLL K., DUSHAY M.S. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. **Trends in Immunology**. 25:289–94, 2004.
TRAVIS J, POTEMPA J, MAEDA H. Are bacterial proteinases pathogenic factors? **Trends in Microbiology**, 3:405–7 , 1995.

TSCHOPP, J., SVERLOW , F. G., KOSSON, R., CRAIG, W., GRIN, L. High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, v. 5, p. 1305-1308, 1987.

VAN DE LOCHT, A., STUBBS, M., BODE, W., FRIEDRICH, T., BOLLSCHWEILER, C., HOFFKEN, W., HUBER, R., The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? **The EMBO Journal**, 15, 6011–6017, 1996.

WAGLAND, B.M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animal. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 29, p. 401-409, 1978.

WANG, H. ; NUTTALL, P., Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite, **CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences**. 56 ,286–295, 1999.

WAXMAN, L., SMITH, D.E., ARCURI, K.E., VLASUK, G.P., Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. **Science** 248, 593–596, 1990.

WIKEL, S. K. Host immunity to ticks. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 1-22, 1996.

WILLADSEN, P.; RIDING, A. On the biological role of a proteolytic-enzyme inhibitor from the ectoparasitic tick *Boophilus microplus*. **Biochemical Journal**, 189:295-303, 1980.

WILLADSEN, P.; MCKENNA, R.V. Biding of antigens to tissues: the example of *Boophilus microplus* and bovine skin. **International Journal of Parasitology** 13:593-598, 1983.

WILLADSEN, P.; MCKENNA, R. V.; RIDING, G. A. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. **International Journal of Parasitology**, v. 18, n. 2, p. 183-189, 1988.

WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, p. 209-222, 1997.

WIKEL, S.K. Host immunity to ticks. **Annual Review of Entomology** 41, 1–22, 1996.

YOUSEF, G.M.; KOPOLOVIC, A.D.; ELLIOT, M.B.; DIAMANDIS, E. P. Genomic overview of serine proteases. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 114 v. 305, p. 28-36, 2003.

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINADO PELA PESQUISA

***Rhipicephalus microplus*: EXPRESSÃO E IMUNOPROTEÇÃO DA PROTEÍNA *BmTIS* EM *Pichia pastoris*.**

Resumo

Os carrapaticidas são a principal forma de controle do carrapato-do-boi, e acarreta sérios problemas devido à seleção de indivíduos resistentes aos princípios ativos. As vacinas podem reduzir o uso de pesticidas, sendo uma alternativa viável para o manejo do carrapato, e o principal antígeno é a proteína *Bm86* que apresenta eficácia variável contra cepas de carrapatos em diferentes regiões do mundo. O inibidor de tripsina *BmTI* é um forte candidato a antígeno vacinal. Este trabalho teve por objetivo produzir a *BmTI* recombinante em *Pichia pastoris* e testar a eficácia de imunoproteção em bovinos. A sequência *BmTIS* foi clonada no vetor pPICZαA, e o plasmídeo foi transformado na cepa X33 de *Pichia pastoris*. O clone X33*BmTIS*17 foi sequenciado e selecionado para ser induzido e apresentou uma banda majoritária de aproximadamente 46 kDa em SDS-PAGE. A *rBmTIS* expressa em *P. pastoris* teve um rendimento de 550 mg L⁻¹ de meio e foi reconhecida em *Western blot* por soros policlonais de camundongos, anti-extrato de larvas, anti-peptídeo sintético, anti-*rBmTIS* e por anticorpo monoclonal Histag. O perfil de anticorpos foi traçado por ELISA e a respectiva resposta de Montanide ISA como adjuvante apresentou resposta imune, considerando os níveis de IgG com um perfil semelhante aos outros ensaios. O grupo imunizado apresentou eficácia de 31,8% no teste de estábulo. Os parâmetros reprodutivos não foram afetados no desenvolvimento de carrapatos no grupo vacinado.

Palavras-Chave: Ixodes, carrapato, bovinos, *BmTI*

Rhipicephalus microplus: **EXPRESSION AND IMMUNOPROTECTION OF THE BmTI
PROTEIN IN *Pichia pastoris***

Abstract

The acaricides are the main form of control of tick cattle, and causes serious problems due to selection of individuals resistant to active ingredients. The vaccines can reduce pesticide use, and a viable alternative for the management of tick, and is the major antigen Bm86 protein that has variable efficacy against strains of ticks in different regions of the world. The trypsin inhibitor BmTI is a strong candidate for a vaccine antigen. This study aimed to produce recombinant BmTI in *Pichia pastoris* and test the effectiveness of immunoprotection in cattle. The BmTI sequence was cloned in vector pPICZ α A, and plasmid was transformed into X33 strains of *P. pastoris*. The clone X33BmTIS17 was sequenced and selected to be induced. SDS-PAGE showed a major band with the approximate size of 46 kDa. The expressed rBmTIS protein in *P. pastoris* had a yield of 550 mg L⁻¹ of medium was recognized in Western-blot by anti-larvae extract mice sera, anti-Synthetic peptide polyclonal sera, anti-BmTIS and by Histag monoclonal antibody. The antibody response was measured by ELISA and its response using Montanide ISA as adjuvant presented immune response considering IgG levels with a profile similar as the other assays. In the stall test the immunized bovine group showed efficacy of 31,8%. The reproductive parameters were not affected in the ticks developed in the immunized group. SDS-PAGE showed a major band with the approximate size of 46 kDa. The expressed rBmTIS protein in *P. pastoris* had a yield of 550 mg L⁻¹ of medium was recognized in Western-blot by anti-larvae extract mice sera, anti-Synthetic peptide polyclonal sera, anti-BmTIS and by Histag monoclonal antibody. The antibody response was measured by ELISA and its response using Montanide ISA as adjuvant presented immune response considering IgG levels with a profile similar as the other assays. In the stall test the immunized bovine group showed efficacy of 31,8%. The reproductive parameters were not affected in the ticks developed in the immunized group.

Keywords: *Ixodes*, ticks, bovines, BmTI, *Pichia pastoris*.

Introdução

O carrapato-do-boi, Rhipicephalus microplus, é vetor da babesiose e anaplasmoses bovina, que são doenças importantes em áreas tropicais e subtropicais (BRAKE et al., 2010).

O principal método de controle de carrapatos é o uso de acaricidas, que apresenta eficácia limitada na redução da infestação de carrapatos e é muitas vezes acompanhada por inconvenientes graves, incluindo a seleção de carrapatos resistentes, contaminação ambiental e dos subprodutos de carne e leite (CANALES et al., 2008).

O uso de vacinas no controle do carrapato associado a produtos químicos e rotação de pastagens poderia abrir possibilidades no manejo integrado do controle do carrapato, reduzindo problemas causados pela resistência e contaminação ambiental (ANDREOTTI, 2006).

Um dos principais antígenos vacinais utilizados em vacinas contra o *R. microplus* é a proteína *Bm86* que vem apresentando resultados satisfatórios no controle do carrapato (DE LA FUENTE, et al., 1999, DE LA FUENTE, et al., 1998, PATARROYO, et al., 2002, WILLADSEN; KEMP, 1988, WILLADSEN; MCKENNA, 1991, WILLADSEN, et al., 1989) e no controle de *Babesia bovis* (BASTOS et al., 2010).

A *Bm86* é uma glicoproteína localizada predominantemente na membrana de células intestinais do carrapato (GOUGH; KEMP, 1993), e é também expressa em larvas, ninfas, machos adultos, intestinos e ovários de fêmeas adultas de *R. microplus* (BASTOS et al., 2010) e quando utilizada como antígeno vacinal, os anticorpos contra esta proteína ligam-se à superfície das células epiteliais do intestino do carrapato, provocando lise celular e diminuindo a eficiência reprodutiva das teleóginas (WILLADSEN, 1997).

No Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, um estudo prévio com as duas formulações vacinais baseadas no antígeno *Bm86* obtiveram eficácia de proteção de bovinos contra o carrapato de 46,4% para TickGard^{PLUS} (Intervet Australia Pty. Ltd., 91-105 Harpin Street, Bendigo East, Victoria) e 49,2% para GavacTM (Heber Biotec S.A., Havana, Cuba) (ANDREOTTI, 2006). Este percentual encontrado está abaixo do que foi demonstrado em diferentes regiões do mundo (DE LA FUENTE, 1999; PATARROYO et al., 2002; RAND et al., 1989; RICHARDSON et al., 1993; RODRIGUEZ et al., 1995).

Várias vacinas recombinantes com o antígeno *Bm86*, têm sido formuladas (CANALES et al, 2009; DE LA FUENTE et al., 1999; PATARROYO et al., 2002; RAND et al., 1989, ; RODRIGUEZ et al., 1995), porém, com eficácias variáveis contra cepas de carrapato encontradas em diferentes áreas geográficas. Estas diferenças podem ser motivadas por variações alélicas naturalmente presentes no gene da *Bm86* (DE LA FUENTE; KOCAN, 2003; FREEMAN et al., 2010).

Vários inibidores de tripsina de *R. microplus* (*BmTIs*) com atividade inibitória contra Calicreína Plasmática Humana (HuPK), Elastase de Neutrófilo Humano (HNE) e Plasmina presente em ovos e larvas têm sido descritos (ANDREOTTI et al., 2001; SASAKI et al., 2004). Um ensaio vacinal com *BmTIs* extraídas de larvas de carrapatos por métodos cromatográficos apresentou 72,8% de eficácia protetora contra carrapatos e afetou os parâmetros reprodutivos, reduzindo 69,7% o número de teleóginas e 71,3% do peso de ovos (ANDREOTTI et al., 2002). Um peptídeo sintético desenhado a partir da sequência parcial de aminoácidos da *BmTI-A* obteve 18,4% de eficácia na imunoproteção de animais cruzados (ANDREOTTI, 2007).

Devido a quantidade de *BmTIs* purificada de larvas e ovos por métodos cromatográficos ser muito pequena, a produção de *BmTI* recombinante para ser usada como antígeno vacinal é, portanto, essencial.

Este trabalho teve por objetivo sintetizar a sequência da *BmTI* otimizada para códons usuais de *Pichia pastoris*, a fim de melhorar a expressão e testar a eficácia de imunoproteção em bovinos.

Material e Métodos

1. Carrapatos

Os carrapatos *R. microplus* foram obtidos de uma cepa mantida pela Embrapa Gado de Corte, livre de *Babesia* spp. e *Anaplasma marginale*. As teleóginas foram incubadas para obtenção de larvas em estufa incubadora B.O.D. a 28°C e 80% de umidade relativa. Foram utilizadas larvas com 18 dias de idade para infestação dos bovinos.

2. Manipulação de DNA

A sequência de DNA que codifica *BmTI-6* de *R. microplus* depositada no GenBank (número de acesso CK186726) (GUERRERO et al., 2005) foi otimizada para códons usuais de *P. pastoris* e sintetizada pela empresa Epoch Biolabs, inc. Codon. A sequência foi então clonada em pPICZA α e nomeada pPICZ α ABmTIS.

Utilizou-se 80 μ L da cepa X33 de *P. pastoris* eletrocompetentes que foram transformadas com 10 μ g do plasmídeo recombinante linearizado com *Sac* I (Invitrogen, Australia), com 1 pulso de 20 kV por 5 msec. O plasmídeo pPICZ α A foi transformado para ser utilizado como controle negativo. As células recombinantes foram selecionadas em placas YPDS contendo ZeocinaTM (1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% dextrose; 1 M sorbitol; 2% ágar; 100 μ g/ml Zeocina).

O DNA genômico dos clones de *P. pastoris* foi extraído pelo método de pérolas de vidro, quantificado em Espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA) e armazenado a -20⁰ C. Para análise do fenótipo foi realizada a PCR com os *primers* 3'AOX1 com 5'AOX1 e com os *primers* 3'AOX1 com α -Factor para confirmação do inserto, nas condições descritas no EasySelectTM Pichia Expression Kit (INVITROGEN, 2009).

Os produtos de PCR dos DNAs genômicos dos clones recombinantes foram sequenciados com oligonucleotídeos desenhados para o promotor *P_{AOX1}* em um sequenciador automático ABI 3100, utilizando BigDye Terminator Chemistry, de acordo com o manual de instruções. Os resultados dos sequenciamentos foram comparados por alinhamento com o gene *BmTI-6*, por meio do software ClustalW.

3. Produção de soros policlonais

Soros policlonais anti-extrato de larvas e anti *BmTI* recombinante (*rBmTIS*) foram produzidos usando camundongos BALB/c. O extrato de larva foi obtido a partir de 8 g de larvas da cepa mantida pela Embrapa Gado de Corte, que foram congeladas a -20⁰ C e maceradas. Em seguida, adicionou-se Tris-HCl 150 mM, pH 7,4 para o volume final de 8 mL. O extrato eluído foi sonificado com 2 pulsos de 10 segundos com 60 % de amplitude e mais 4 pulsos de 10 segundos com 20 % de amplitude. O conteúdo final foi filtrado e armazenado à -

20⁰ C. O extrato de larva foi quantificado e 3 mg de proteína total foi diluída em 15 mL de Tris-HCl 150 mM, pH7,4, e emulsificado em 15 mL de adjuvante completo de Freund's (Sigma-Aldrich, USA), obtendo-se 30 mL de emulsão de extrato de larva e utilizado como vacina.

A vacina *rBmTIS* foi preparada com 500 µg de proteína *rBmTIS* ressuspendida em 4 mL de Tris-HCl 150 mM, pH 7,4 e emulsificada com 6 mL de Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris). Foram utilizadas doze fêmeas de camundongos BALB/c, separadas em dois grupos de seis indivíduos. Cada grupo recebeu uma das duas vacinas na concentração de 50 µg mL⁻¹ dose⁻¹ de *rBmTIS* e 100 µg mL⁻¹ dose⁻¹ de vacina de extrato de larva. Foram aplicadas 3 doses, via intramuscular, com intervalos de 21 dias por dose e o soro foi coletado 21 dias após a última vacinação.

4. Análise de recombinantes por *Dot blot*

Cada clone obtido foi repicado em 5 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1 %; peptona 2 %; fosfato de potássio 100 mM; YNB 1,34 %; biotina 4.10⁻⁵ %; glicerol 1 %; pH 6,0) e incubado em agitador orbital a 30⁰C, 220 g, juntamente com os controles negativos. Após 24 horas de incubação, as culturas foram centrifugadas a 1.500 g, 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspendidas em 5 mL de BMMY (extrato de levedura 1 %; peptona 2 %; fosfato de potássio 100 mM; YNB 1,34 %; biotina 4.10⁻⁵ %; metanol 0,5 %; pH 6,0) e retornaram ao agitador orbital durante 4 dias. A cada 24 horas foi adicionado 0,5 % de metanol a cada cultura. Ao final, as culturas foram centrifugadas e os sobrenadantes foram separados em tubos de polipropileno de 2 mL e congelados a -20⁰C.

Duas membranas de PVDF foram lavadas por 10 segundos em metanol e por 5 minutos em água Milli-Q estéril. Ambas receberam uma alíquota de 5 µL do sobrenadante de cada clone selecionado e foram secas em estufa a 300C. Como controle positivo foram utilizados 5 µL do extrato larval sobre as membranas. As membranas foram bloqueadas com tampão fosfato salino (PBS) contendo 5% leite desnatado seco com agitação por 1 hora a 30⁰C e posteriormente, lavadas duas vezes (5 minutos de cada vez) com PBS-T (PBS com 0,1% Tween 80, pH 7,4). Em seguida, uma membrana foi incubada com agitação por 1 hora a

30⁰C com anticorpos policlonais primários bovinos, produzidos a partir do bovinos vacinados com peptídeo sintético (ANDREOTTI, 2007), diluído 1:150 em PBS. Este foi seguido por três lavagens com PBS-T, e pela incubação com agitação por 1 hora a 30⁰C com o anticorpo secundário de coelho anti-IgG bovino conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) diluído 1:1.000 em PBS-T. A outra membrana foi incubada com anticorpo secundário monoclonal anti-histidina conjugado com peroxidase (Invitrogen, EUA), diluído 1:15.000 em PBS-T. Finalmente, o material foi lavado 3 vezes com PBS-T e incubadas em 5 mL de solução de revelação (diaminobenzidine – DAB 0,5 %; uréia 0,075 %) até a coloração dos pontos na membrana. A membrana foi então lavada com água Mili-Q estéril e fotodocumentada.

5. Produção da *rBmTIS*

Para a expressão da *rBmTIS* foi selecionado um clone Mut⁺ (X33*BmTIS*17) e uma colônia de X33 controle negativo isoladas em placas YPD contendo ZeocinaTM (extrato de levedura 1%, peptona 2%; dextrose 2%; ágar 2%; Zeocina 100 µg/ml). Estas colônias foram inoculadas em frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL contendo 25 mL de meio BMGY e incubado em um agitador orbital, 220 g, 30 °C até DO_{600 nm} = 4, entre 16 a 18 horas. A cultura foi subsequentemente centrifugada a 1500 g por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O sedimento do clone Mut⁺ e do controle negativo foram ressuspendidos em 200 mL de meio BMMY em um Erlenmeyer de 2 litros até OD_{600 nm} = 1.0. Cada cultura foi suplementada com metanol a cada 24 horas para concentração de 1%, totalizando um período total de indução de 96 horas. Após o período de indução o cultivo foi centrifugado em 3300 g, 4 °C por 5 minutos e o sobrenadante foi separado e tratado com PMSF 1mM e estocado a -20 °C.

6. Purificação e quantificação da *rBmTIS*

O sobrenadante do material expressado pelos clones Mut⁺ clone foi quantificado pelo método de curva padrão com albumina sérica bovina (BSA) em SDS-PAGE 7,5 %. Foi preparada uma solução contendo 25 µL de BSA (1 µg.µL⁻¹), com 10 µL de tampão de amostra

para SDS-PAGE e 15 μL de água Milli-Q estéril, resultando em 50 μL de uma solução com BSA na concentração 0,5 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Foram aplicados 1, 2, 4, 6 e 8 μL desta solução em gel de poliacrilamida 7,5 % (concentrações de 0,5, 1, 2, 3 e 4 μg , respectivamente) juntamente com as amostras a serem quantificadas. Os fragmentos nos géis de poliacrilamida 7,5 % foram quantificados por análise pelo software TotalLab 2.0 (Amersham/Biosciences, Reino Unido), que também estimou a massa molecular aparente das bandas.

Uma alíquota de 25mL do sobrenadante Mut⁺ foi incubada por 1 hora com 50 % de metanol e as proteínas foram precipitadas por centrifugação 5.000 g, a 4°C por 30 minutos. O método cromatográfico utilizado para a purificação da rBmTIS foi afinidade pelo níquel utilizando a coluna Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Alemanha). Em seguida o sedimento das proteínas precipitadas foi eluído pela adição de Tampão de Ligação Desnaturante (Uréia 8 M, Fosfato de Sódio 20 mM pH 7,8, NaCl 500 mM). A solução foi passada em coluna previamente equilibrada com Tampão de Ligação Desnaturante, seguida por cinco lavagens com Tampão de Lavagem Desnaturante (Uréia 8 M, Fosfato de Sódio 20 mM, pH 6,0, NaCl 500 mM). A proteína rBmTIS foi eluída em Tampão de Eluição Desnaturante (Uréia 8 M, Fosfato de Sódio 20 mM, pH 4,0, NaCl 500 mM).

O processo de purificação foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. As frações eluídas de alta pureza foram alíquotadas e dialisadas contra PBS.

7. SDS-PAGE e Western blotting da rBmTIS

100 μL dos sobrenadantes dos clones foram misturados com 20 μL de tampão desnaturante 6x SDS-PAGE, separadamente. As amostras foram incubadas por 6 min, a 95°C, e 20 μL de cada amostra foram pipetados em gel de poliacrilamida 10%. A eletroforese correu a 30 mA por 1 hora e meia, em sistema de eletroforese 2D (Amersham/Biosciences, Reino Unido) (Figura 2). O *Western blot* partiu do gel de poliacrilamida 10%, no qual correram-se 10 μL do sobrenadante do clone Mut⁺. A proteína foi transferida para do gel para uma membrana de PVDF pré-tratada com metanol por 10 segundos e água Milli-Q estéril por 5 minutos, em sistema de transferência (Amersham/Bioscience, Reino Unido) imerso em tampão de transferência (Tris base 0,3% ; glicina 1,44%; metanol 15%; pH 8,4) a 100 mA

por 2 horas. A membrana foi lavada com PBS e deixada secar na estufa a 25°C, por 1 hora. A membrana foi corada com solução de Ponceau S (Ponceau S 0,5%; ácido acético glacial 1%), e recortada em tiras. As tiras foram bloqueadas com PBS com 5 % de leite em pó desnatado, a 30 °C, por 1 hora, sob agitação e lavadas duas vezes com PBS-T por 5 minutos e incubadas com anticorpo primário 1:150 em PBS a 30°C por 1 hora em agitação (uma tira para cada tipo de soro: anti-extrato de larva, anti-*rBmTIS*, anti-peptídeo sintético e anti-Histag monoclonal). As fitas foram lavadas separadamente duas vezes com PBS-T por 5 minutos, e após, incubadas com o anticorpo secundário IgG conjugado com peroxidase anti-camundongo ou anti-bovino de coelho (Sigma-Aldrich, USA) 1:1.000 em PBS-T por 1 hora a 30 °C sob agitação, separadamente. As fitas foram novamente lavadas com PBS-T por 3 vezes de 5 minutos, enxaguadas com água Milli-Q estéril e, então, reveladas com solução de revelação (água Milli-Q 5 mL; DAB 5 mg; NH₄ 0,75 mg) até o aparecimento de bandas bem definidas na membrana de PVDF, de 5 a 10 segundos.

8. Ensaio vacinais

O antígeno *rBmTIS* expresso em *P. pastoris* foi emulsificado com o adjuvante Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris) e doses de 2 ml contendo 100 µg de proteína recombinante foram preparadas. Um ensaio vacinal foi realizado para avaliar a capacidade imunogênica e protetora do antígeno *rBmTIS*. Bezerros de um ano de idade da raça Holandesa foram distribuídos randomicamente em dois grupos de seis animais cada. Um grupo foi imunizado com a vacina preparada com os antígenos purificados *rBmTIS*. O segundo grupo foi vacinado com o adjuvante isolado (grupo controle). Seguindo um método adaptado de Andreotti et al., (2006) todos os animais foram vacinados via intramuscular, nas semanas 0, 2 e 4. Amostras de soro foram coletadas de cada animal semanalmente e antes de cada imunização. Vinte e um dias após a última imunização, os animais foram desafiados com um total de 15.000 larvas da cepa de carrapatos mantida pela Embrapa Gado de Corte durante três dias consecutivos, no dorso do animal. No final do período parasitário, quando as teleóginas se desprendiam do bovino de forma espontânea, iniciou-se a coleta manual de todas as teleóginas que se encontravam no chão das baias e nos cochos.

As fêmeas coletadas diariamente foram pesadas em balança de precisão e acondicionadas em placas de Petri, e incubadas em estufa B. O. D. A 28 °C e 80% de umidade até o término da postura. Os ovos foram pesados e incubados para determinar o percentual de eclosão.

9. Análises do Anti-soro Bovino

Foram colhidas amostras de sangue da veia jugular semanalmente, utilizando tubo siliconizado de 10 mL sem anticoagulante (Labor Vaccum®) a fim de extrair o soro, que foi aliquotado e estocado a -20 °C, até ser analisado por ELISA. Placas de microtitulação foram sensibilizadas com 1 mg/mL de antígeno rBmTIS em Tampão Carbonato 20Mm pH 9,6 deixando-se adsorver *overnight* a 4 °C. As placas foram lavadas cinco vezes com PBST (tampão fosfato de sódio, pH 7,4, Tween 20 0,1%), e bloqueadas com 2% de BSA em PBST. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37 °C com soro bovino imunizado com rBmTIS, diluído a 1:100 em PBST. Após outra etapa de lavagem, 50 µL de anticorpo secundário de coelho anti-IgG bovina conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, MO), diluído a 1:20.000, foram adicionados e a incubação ocorreu por 30 minutos em temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada com PBST, e a revelação foi realizada com a adição de 50 µL do substrato cromogênico o-fenilenodiamina 1,0 mM, por um período de 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de NaOH 0,2 M e a leitura foi realizada em leitor de microplacas de absorvância a 405 nm.

10. Análises Estatísticas

Os níveis médios de anticorpos foram determinados para cada grupo e comparados usando ANOVA. O teste não-paramétrico de Mann–Whitney foi utilizado para comparar os resultados de eficácia da vacinação. A eficácia de proteção contra os carrapatos foi calculada utilizando os seguintes parâmetros biológicos:

$$100 \times [1 - (\text{NET} \times \text{EW} \times \text{EF} \times \text{H})]$$

Onde NET = número total de carrapatos do grupo dos bovinos imunizados/grupo controle; EW = (peso ovos/números de carrapatos) produzidos pelo grupo imunizado/grupo

controle; EF = (peso ovos/peso das fêmeas ingurgitadas) do grupo imunizado/grupo controle; H= eclodibilidade produzida no grupo imunizado/grupo controle.

A eficácia da vacina foi avaliada empregando a fórmula anteriormente descrita para o efeito sobre o número de fêmeas adultas (DT), oviposição (DO), fertilidade (DF) e eficácia da vacina em geral (E).

Resultados

1. Construção do pPICZαA-BmTIS

O plasmídeo recombinante foi projetado para inserir a sequência do gene *BmTIS* no sítio de múltipla clonagem do vetor pPICZαA, entre as enzimas de restrição de *EcoR* I e *Kpn* I (Figura 1). A sequência do inserto foi confirmada pelo sequenciamento e alinhamento com o gene *BmTI-6* com 78% de identidade. A sequência sintética foi clonada respeitando o cassete de expressão controlado pelo promotor do gene *AOX1*. O local de múltipla clonagem foi mantido antes da sequência *BmTIS* permitindo a clonagem futura de outra sequência de interesse, como a de um modulador da resposta imune.

2. Expressão da proteína rBmTIS

Um clone Mut⁺ foi selecionado para induzir a expressão. Análises do sobrenadante em SDS-PAGE 10% revelam bandas protéicas de aproximadamente 46 kDa, próximo ao peso molecular estimado (Figura 2a). A quantificação direta do sobrenadante do cultivo mostram a produção de 550 mg L⁻¹ de rBmTIS pelo clone Mut⁺. A purificação por cromatografia de afinidade usando coluna de níquel, mostrou uma banda de 46 Kda em SDS-PAGE e rendimento da purificação de 870 mg L⁻¹.

Análises do *Western blot* da proteína rBmTIS foi realizado com dois soros primários de camundongo (anti-extrato de larva de e anti-rBmTIS), um de bovino (anti-peptídeo sintético) e um anticorpo monoclonal anti-Histag. As revelações mostraram afinidade por uma proteína de aproximadamente 46 kDa (Figura 2b).

3. Imunoproteção

A resposta de anticorpos a *rBmTIS* foi mensurada por ELISA usando amostras semanais agrupadas em uma mistura. O soro apresentou alta reação 40 dias após a primeira imunização e 16 dias após a infestação do gado. A avaliação sérica bovina indicou uma correlação negativa quando comparada com produção do número de fêmeas ingurgitadas do carrapato. A resposta aos antígenos *rBmTIS* do grupo dos soros imunizados diminuiu após a infestação (Figura 3).

4. Análise do Ensaio Vacinal

O desenvolvimento de carrapatos nos animais foi supervisionado durante o ciclo de vida do parasita. A contagem de fêmeas ingurgitadas foi determinada em 15 dias após o início do desprendimento do carrapatos e o perfil mostrado indicou pico na produção e peso de carrapatos no quarto dia, com significância de $p < 0,05$ (teste não-paramétrico Mann-Whitney). Os bovinos imunizados que foram desafiados com carrapatos apresentaram redução de 28% no número de carrapatos, com eficácia final de 31,8%.

Discussão

O sistema de expressão em *P. pastoris* foi escolhido por ser atualmente o mais eficiente na produção de proteínas heterólogas (CREGG et al., 1993). É também superior aos sistemas de expressão procarióticos devido a sua capacidade de expressar proteínas com conformação correta, contendo glicosilação e pontes dissulfetos (BUCKHOLZ; GLEESON, 1991). Apesar de ser um sistema de expressão eucariótico complexo e trabalhoso, esse sistema requer menos procedimentos que as expressões em culturas de células eucarióticas baseadas em células de insetos ou mamíferos, e geralmente seu rendimento é maior (CREGG et al., 1993), gerando baixo custo de produção.

O plasmídeo pPICZ α *BmTIS*, foi construído e é capaz de expressar de forma eficaz a proteína recombinante *rBmTIS* solúvel no meio de cultura, tornando fácil obter a proteína através da precipitação do sobrenadante. Este método é mais simples, se comparado à purificação a partir da membrana plasmática ou do citoplasma das células, e as características

imunogênicas e antigênicas que são importantes para a produção de um imunógeno eficaz foram mantidas.

O sequenciamento e alinhamento do plasmídeo recombinante pPICZ α ABmTIS com o gene *BmTI-6* apresentou 78% de identidade, esta diferença deve-se a otimização da sequência para códons usuais de *P. pastoris* a fim de melhorar a expressão.

SDS-PAGE apresentou uma banda majoritária de aproximadamente 46 kDa, correspondendo ao tamanho esperado da *rBmTIS*. O reconhecimento da *rBmTIS* pelo soro de bovinos vacinados com peptídeo sintético (ANDREOTTI, 2007) mostrou que as proteínas produzidas são antígenicamente similares, reforçando o potencial antigênico da *rBmTIS*, dado que o peptídeo sintético apresentou proteção contra os carrapatos.

O reconhecimento da *rBmTIS* pelos anticorpos produzidos contra a vacina de extrato de larvas, que tem a forma nativa da proteína *BmTI* é particularmente importante. Este dado confirma a expressão de uma proteína recombinante imunogenicamente similar à *BmTI* nativa, sugerindo que a forma recombinante é um potencial antígeno vacinal, e poderá ser utilizado para testes de vacinação de bovinos. O reconhecimento da *rBmTIS* pelo soro de camundongo anti-*rBmTIS* indica que a proteína é capaz de induzir resposta imune, e subsequentemente reconheceu a si própria. Observa-se que não há resposta contra outra proteína que poderia existir, uma vez que a vacina foi formulada com o sobrenadante total da expressão, provando seu potencial imunogênico.

O sistema de expressão selecionado produziu *rBmTIS in vitro* na concentração de 550 mg L⁻¹, sendo portanto superior ao nível de expressão 20 mg L⁻¹ obtido por SASAKI; TANAKA, 2008.

Os animais vacinados apresentam resposta imune, considerando os níveis de IgG. A resposta de anticorpos nos animais vacinados foi bem-sucedida e sua cinética e níveis de resposta de anticorpos em bovinos vacinados apresentaram o mesmo perfil por ANOVA e foram semelhantes aos dos relatórios anteriores usando *BmTI* (ANDREOTTI et al., 2002). O soro dos animais do grupo controle não reagiu com o antígeno *rBmTIS*.

Embora o nível de proteção de anticorpos foi semelhante ao de estudos anteriores (RODRIGUEZ et al., 1995; ANDREOTTI, 2002; JITTAPALAPONG et al., 2010), os

resultados referentes ao desenvolvimento dos carrapatos nos animais imunizados apresentaram menor ação do que *BmTI* nativa (ANDREOTTI et al., 2002), mas foram superiores ao peptídeo sintético (ANDREOTTI, 2007) (Tabela 2). Entretanto a eficácia da proteção imune foi limitada e os resultados não confirmaram as expectativas.

Um estudo anterior utilizando a mesma cepa de carrapato (ANDREOTTI, 2006), realizado em condições de estábulo em vacas mestiças sob infestação controlada vacinadas com GavacTM e TickGard^{PLUS}, apresentou 49,2% e 46,4% de eficácia de proteção, de modo que o resultado de 31,8 % de eficácia obtido com a *rBmTIS* poderia ser otimizado se fosse utilizado em associação com antígenos com diferentes mecanismos de ação em uma vacina poli antigênica.

Agradecimentos

À Embrapa Gado de Corte, CNPq e Fundect pelo apoio financeiro.

Referências

- ANDREOTTI, R. Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, p. 97-100, 2006.
- ANDREOTTI, R. Synthetic bmti n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. *Exp. Parasitol.* 116: 66– 70. 2007.
- ANDREOTTI, R., GOMES, A., MALAVAZI-PIZA, K.C., SASAKI, S.D., SAMPAIO, C.A., TANAKA, A.S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *Int. Immunopharmacol.* 2: 557–563. 2002.
- ANDREOTTI, R., MALAVAZI-PIZA, K.C., SASAKI, S.D., TORQUATO, R.J., GOMES, A., TANAKA, A.S. Serine proteinase inhibitors from eggs and larvae of tick *Boophilus microplus*: purification and biochemical characterization. *J. Protein Chem.* 20: 337–343. 2001.
- ANDREOTTI, R., PEDROSO, M. S., CAETANO, A. R., AND MARTINS, N. F. Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants Bm86 Campo Grande strain, Bm86 and Bm95. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 93-98, 2008.
- BASTOS, R. G., UETI, M. W., KNOWLES, D. P., SCOLES, G. A. The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute *Babesia bovis* infection. *Parasites & Vectors*, v. 3, p. 1-11, 2010.
- BRAKE, D.K., WIKEL, S.K., TIDWEL, J.P., LÉON, A.P. Rhipicephalus microplus salivary gland molecules induce differential CD86 expression in murine macrophages **Parasites & Vectors**, 3:103, 2010.
- BUCKHOLZ, R.G., GLEESON, M.A. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. **Biotechnology**, v. 9, p. 1067-1072, 1991.
- CANALES, M., DE LA LASTRA, J. M., NARANJO, V., NIJHOF, A. M., HOPE, M., JONGEJAN, F., AND DE LA FUENTE, J. Expression of recombinant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. **BMC Biotechnology**, v. 8, p.14, 2008.
- CANALES, M., ALMAZAN, C., NARANJO, V., JONGEJAN, F., AND DE LA FUENTE, J. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. **BMC Biotechnology**, v. 9, p. 29, 2009.
- CREGG, J. M., VEDVICK, T. S., AND RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, v. 11, p. 905-910, 1993.

- DE LA FUENTE, J., KOCAN, K.M., Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. **Expert Review of Vaccines**, v. 2, p. 583-593, 2003.
- DE LA FUENTE, J., RODRIGUEZ, M., REDONDO, M., MONTERO, C., GARCIA-GARCIA, J. C., MENDEZ, L., SERRANO, E., VALDES, M., ENRIQUEZ, A., CANALES, M., RAMOS, E., BOUE, O., MACHADO, H., LLEONART, R., DE ARMAS, C. A., REY, S., RODRIGUEZ, J. L., ARTELES, M., AND GARCIA, L. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 16, p. 366-373, 1998.
- DE LA FUENTE, J., RODRIGUEZ, M., MONTERO, C., REDONDO, M., GARCIA-GARCIA, J. C., MENDEZ, L., SERRANO, E., VALDES, M., ENRIQUEZ, A., CANALES, M., RAMOS, E., BOUE, O., MACHADO, H., AND LLEONART, R. Vaccination against ticks (*Boophilus spp.*): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Genet Anal**, v. 15, p. 143-148, 1999.
- FREEMAN, J.M., DAVEY, R.B., KAPPMAYER, L.S., KAMMLAH, D.M., OLAFSON, P.U. Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. **Parasites and Vectors**, v. 3, p. 1-8, 2010.
- GARCIA-GARCIA, J. C., GONZALEZ, I. L., GONZALEZ, D. M., VALDES, M., MENDEZ, L., LAMBERTI, J., D'AGOSTINO, B., CITRONI, D., FRAGOSO, H., ORTIZ, M., RODRIGUEZ, M., AND DE LA FUENTE, J. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Experimental and Applied Acarology**, v. 23, p. 883-895, 1999.
- GOUGH, J. M., KEMP, D. H. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. **Journal of Parasitology**, v. 79, p. 900-907, 1993.
- GUERRERO, F.D., MILLER, R.J., ROUSSEAU, M.E., SUNKARA, S., QUACKENBUSH, J., LEE, Y., NENE, V. BmiGI: a database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 585-595. 2005.
- INVITROGEN, 2009. *Pichia* Expression Kit. For Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Catalog no. K1710-01.
- JITTAPALAPONG, S., KAEWHOM, P., KENGRADOMKIJ, C., SARATAPAN, N., CANALES, M., DE LA FUENTE, J., STICH, R. W. Humoral Immune Response of Dairy Cattle Immunized with rBm95 (KU-VAC1) derived from Thai *Rhipicephalus microplus*. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 91-95, 2010.
- PATARROYO, J. H., PORTELA, R. W., DE CASTRO, R. O., PIMENTEL, J. C., GUZMAN, F., PATARROYO, M. E., VARGAS, M. I., PRATES, A. A., AND 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.

- RAND, K. N., MOORE, T., SRISKANTHA, A., SPRING, K., TELLAM, R., WILLADSEN, P., AND COBON, G. S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. , Proceedings of the National Academy of Sciences v. 86, p. 9657-9661, 1989.
- RICHARDSON, M. A., SMITH, D. R., KEMP, D. H., AND TELLAM, R. L. Native and baculovirus-expressed forms of the immuno-protective protein BM86 from *Boophilus microplus* are anchored to the cell membrane by a glycosyl-phosphatidyl inositol linkage. **Insect Molecular Biology**, v. 1, p. 139-147, 1993.
- RODRIGUEZ, M., MASSARD, C. L., DA FONSECA, A. H., RAMOS, N. F., MACHADO, H., LABARTA, V., AND DE LA FUENTE, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine**, v. 13, p. 1804-1808, 1995.
- RODRIGUEZ, M., PENICHET, M.L., MOURIS, A.E., LABARTA, V., LUACES, L.L., RUBIERA, R., CORDOVES, C., SANCHEZ, P.A., RAMOS, E., SOTO, A. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet. Parasitol.* 57: 339–349. 1995.
- SASAKI, S.D., AZZOLINE, S.S., HIRATA, I.Y., ANDREOTTI, R., TANAKA, A.S. *Boophilus microplus* tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors. *Biochimie* 86: 643–649. 2004.
- SASAKI, S.D, TANAKA, A.S rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick *Boophilus microplus*, its cloning, expression and biochemical characterization. **Veterinary Parasitology**, 155, 133–141, 2008.
- WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 209-222, 1997.
- WILLADSEN, P., KEMP, D. H. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. **Parasitology Today**, v. 4, p. 196-198, 1988.
- WILLADSEN, P., MCKENNA, R.V. Vaccination with 'concealed' antigens: myth or reality? **Parasite Immunology**, v. 13, p. 605-616, 1991.
- WILLADSEN, P., RIDING, G. A., MCKENNA, R. V., KEMP, D. H., TELLAM, R. L., NIELSEN, J. N., LAHNSTEIN, J., COBON, G. S., AND GOUGH, J. M.,. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, v. 143, p. 1346-1351, 1989.

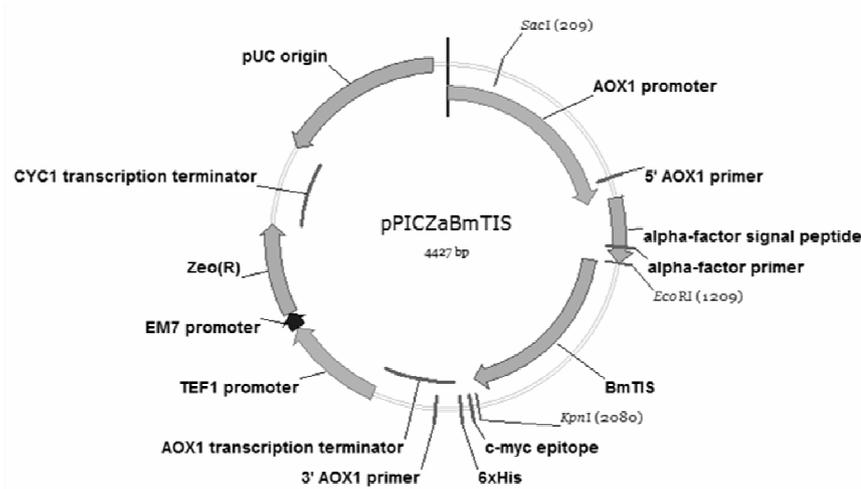


Figura 1. pPICZ α BmTIS representado com Vector NTI 8 software; 5'AOX1: promotor fortemente induzido por metanol; Sac I: enzima usada para linearizar o plasmídeo antes da transformação em *P. pastoris*; Alpha-factor: sequência ao peptídeo secretado da rBmTIS; BmTI Sintético : sequência do gene BmTI inserido no plasmídeo; 3'AOX1 Terminação: sequência que determina o fim da transcrição; pUC origin: Origem de Replicação de *E. coli*.

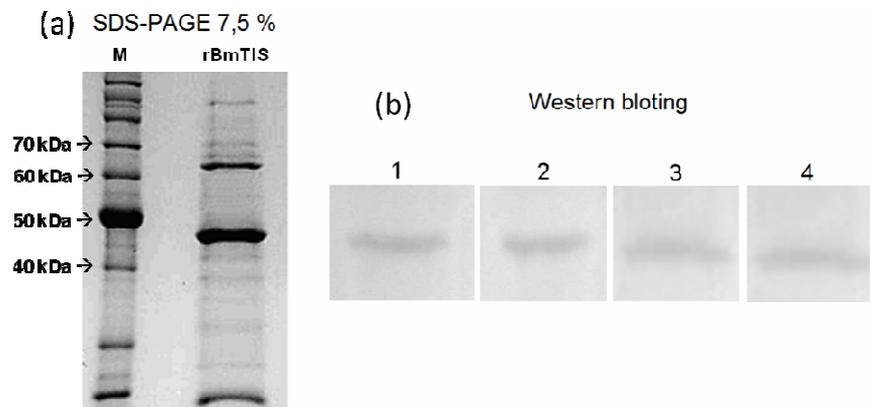


Figura 2. SDS-PAGE 10% e Western blotting do sobrenadante do cultivo de X33 clonado com pPICZ α ABmTIs. (a) SDS-PAGE: M) Marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen); (rBmTIS) sobrenadante do cultivo da expressão de rBmTIs. (b) Western blotting da rBmTIS contra: 1) Anticorpo monoclonal anti-His; 2) soro de bovinos vacinados com peptídeo sintético BmTI; 3) soro de camundongo vacinado com rBmTIS; 4) soro de camundongo vacinado com extrato de larva.

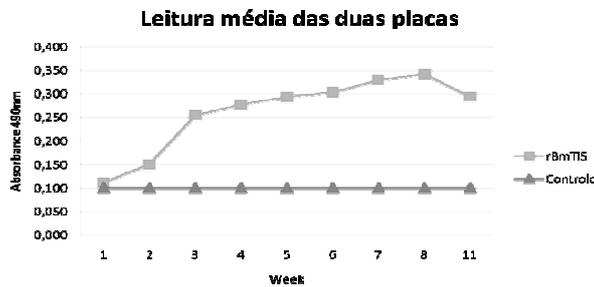


Figura 3. Reconhecimento da *rBmTI* pelo anti-soro de bovinos imunizados com antígenos. Absorbância dos testes ELISA das amostras de soro coletadas semanalmente a partir de dois grupos de seis bovinos imunizados em 0, 15 e 30 dias com *rBmTIS* (linha clara) e Montanide ISA (linha escura).

Tabela 1. Resultados do desafio com larvas de carrapatos no teste de estábulo.

Parâmetro	Grupo Controle	Grupo Imunizado	Redução (%)
Número total de carrapatos	4,594 ^a	3,209 ^a	30,14
Média dos números de carrapatos	766 ^a	534 ^a	
Peso Total dos carrapatos ingurgitados	1,346 ^a	674 ^a	49,07
Peso das fêmeas ingurgitadas	0.293 ^a	0.210 ^a	
Peso dos ovos/número de carrapatos	0.1380^a	0.148^a	
Peso dos ovos/ Peso das fêmeas ingurgitadas	0,52 ^a	0,52 ^a	
Eclodibilidade	96.63 ^a	87.96 ^b	8.67

Peso em gramas; número médio de carrapatos em relação a produção de um bovino.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre as médias com nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Tabela 2. Comparação do alinhamento dos aminoácidos da BmTI-6, com as BmTIs testadas em ensaios vacinais

BmTI-6	Identidade	Imunoproteção
BmTIS	99,00%	31,80%
BmTI-A	38,00%	72,80%
sintetic_BmTI	37,00%	18,40%