

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO DA CALRETICULINA DO *Rhipicephalus (Boophilus)*  
*microplus* (Acari: Ixodidae) NA INTERAÇÃO PARASITA HOSPEDEIRO**

Dissertação de Mestrado

**HERBERT RECH**

Porto Alegre

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO DA CALRETICULINA DO *Rhipicephalus (Boophilus)*  
*microplus* (Acari: Ixodidae) NA INTERAÇÃO PARASITA HOSPEDEIRO**

**Herbert Rech**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr.

**Porto Alegre  
Fevereiro, 2007.**

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

## DEDICATÓRIA

A minha família por me dar quando necessário o que ninguém pode comprar,  
Amor e carinho!

A porta da verdade estava aberta,  
Mas só deixava passar  
Meia pessoa de cada vez.

Assim não era possível atingir toda a verdade,  
Porque a meia pessoa que entrava  
Só trazia o perfil de meia verdade.  
E sua segunda metade  
Voltava igualmente com meio perfil.  
E os meios perfis não coincidiam.

Arrebentaram a porta. Derubaram a porta.  
Chegaram ao lugar luminoso  
Onde a verdade esplendia seus fogos.  
Era dividida em metades  
Diferentes uma das outras.

Chegou-se a discutir qual a metade mais bela.  
Nenhuma das duas era totalmente bela.  
E carecia optar. Cada um optou conforme  
Seu capricho, sua ilusão, sua miopia.

(Carlos Drummond de Andrade)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr, por orientar e mostrar os caminhos do aprendizado.

A Dra. Sandra Estrazula Farias, Dra. Aoi Masuda, Dr. Carlos Alexandre e Dr. Carlos Termignoni, pela colaboração e pelos conhecimentos repassados.

A minha “mana” Malu pelo carinho, amizade, alegria e incentivo diário, enfim por tudo que enfrentamos juntos.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal e outros laboratórios: Fernanda Klein (a Fê), Carolina, Leonara, Paula, Josiane, Caroline, Luiz Fernando, Roberta, Juliana, Dani, Alexandre, Filipe, Raquel, Andréia, Juliana Ceolatto, Adriana Seixas, Andréia Estrela, Antônio Pinto e Renata Terra, Daniel, Alexandre Heimmer, Kiyoko, Letícia, Ana Paula, Matheus, Gabriel, Maurício, Isis Abel e Pedro entre outros; obrigado pelo convívio e cooperação.

Agradeço a todos os colegas dos diferentes laboratórios que participaram nos experimentos de infestação. E aos colegas de outros laboratórios do Centro de Biotecnologia.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Faculdade de Veterinária.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	10
INTRODUÇÃO.....	11
Carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	11
Ciclo de vida.....	12
Métodos de controle .....	13
Controle químico .....	13
Controle biológico .....	14
Controle imunológico.....	16
A proteína calreticulina .....	20
OBJETIVOS.....	23
Objetivos Gerais .....	23
Objetivos Específicos .....	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
Análise Filogenética das seqüências de CRT .....	24
Predição de epítomos com potencial antigênico e sítios de ligação a C1q.....	24
Expressão da rBmCRT .....	25
Purificação da rBmCRT e rHICRT .....	25
SDS-PAGE, Western e Dot blot.....	26
Imunização de camundongos.....	26
Análise de antigenicidade da rBmCRT 400 e rBmCRT 500.....	27
Imunização e desafio dos bovinos .....	27
Hipersensibilidade cutânea em bovinos .....	28
Análise da antigenicidade da rBmCRT e rHICRT com soros de bovinos infestados e vacinados .....	28
Identificação de CRT em extrato de larvas .....	28
Titulação por ELISA das IgGs anti-CRT dos soros bovinos.....	29
ELISA de competição dos soros bovinos .....	29
Inibição da coagulação .....	30

Atividade da trombina sobre o substrato S2238 após adição de rBmCRT e rHICRT .....	30
Efeito da rBmCRT ou rHICRT na atividade da trombina sobre o fibrinogênio..	30
Influência da rBmCRT sobre o tempo de recalcificação plasmática.....	30
Influência da rBmCRT e rHICRT sobre o tempo de protrombina .....	31
Análises estatísticas .....	31
RESULTADOS .....	32
Análise Filogênica das seqüências de CRT .....	32
Predição dos sítios de ligação de C1q em seqüências de CRT .....	33
Estrutura 3D das CRT.....	33
Epitopos antigênicos da rBmCRT e rHICRT .....	33
Expressão e purificação da rBmCRT .....	37
Imunogenicidade da BmCRT em camundongos .....	39
Imunogenicidade da rBmCRT e rHICRT .....	40
ELISA de competição dos soros bovinos .....	43
Hipersensibilidade cutânea em bovinos .....	43
Inibição da coagulação .....	44
Tempo de recalcificação plasmática.....	44
DISCUSSÃO .....	46
CONCLUSÕES .....	54
PERSPECTIVAS.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
h	hora
min	minuto
s	segundo
g	grama
mg	miligrama
µg	micrograma
ng	nanograma
l	litro
ml	mililitro
µl	microlitro
kDa	quilodalton = 1000 dalton
M	molar
mM	milimolar
µM	micromolar
nM	nanomolar
nm	nanômetro
g	gravidade
MHz	megahertz
qsp	quantidade suficiente para
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
NBT	tretazolio nitroazul
OPD	o-phenilenediamino
rBmCRT	Calreticulina de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> recombinante
rHICRT	Calreticulina de <i>Haemaphysalis longicornis</i> recombinante
HuCRT	Calreticulina humana
DNA	ácido desoxirribonucléico
ELISA	ensaio imunoabsorvente de ligação enzimática
IgG	imunoglobulina G
IPTG	isopropionil-B-D-tiogalactopiranosídeo
LPS	lipopolissacarídeo
PAGE	eletroforese com gel de poliacrilamida
SDS	dodecilsulfato de sódio
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PBMC	células mononucleares do sangue periférico



## RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasito hematófago que infesta os rebanhos bovinos de regiões tropicais e subtropicais, causando grandes prejuízos à pecuária. O principal método de controle baseia-se nos acaricidas. No entanto, o uso de vacinas tem sido estudado como um método de controle alternativo. A calreticulina (CRT) é uma proteína multifuncional presente em quase todas as células de animais. A secreção da CRT durante a alimentação pode estar relacionada a modulação da interação parasita hospedeiro. No presente estudo, as CRTs de *R. microplus* (rBmCRT) e do *Haemaphysalis longicornis* (rHICRT) foram expressas em *Escherichia coli* e purificadas por cromatografia. As propriedades imunogênicas e antigênicas da BmCRT e HICRT foram analisadas por diferentes métodos. *In silico*, foram comparados os epítomos das CRTs pelo índice de Jamerson-Wolf, que mostrou 6 regiões com potenciais epítomos antigênicos diferentes entre as CRTs. Enquanto, a análise *in silico*, da rBmCRT e rHICRT mostraram 6 regiões que podem interagir com a proteína C1q. *In vitro*, por *Western blot*, a rBmCRT, mas não a rHICRT, foi reconhecida pelo soro de bovino infestado experimentalmente com *R. microplus*. Em *Western blot* de extrato de larvas, os soros do coelho imunizado com rBmCRT e bovinos imunizados com rBmCRT ou rHICRT reconheceram a BmCRT, sugerindo que os anticorpos direcionados às proteínas recombinantes também reconhecem a proteína nativa BmCRT. Também a rBmCRT mostrou um efeito anticoagulante no teste de recalcificação plasmática. *In vivo*, a rBmCRT e rHICRT induziram reações de hipersensibilidade cutânea imediata em bovinos imunizados com rBmCRT ou rHICRT, mas não foi possível detectar alterações na análise histopatológica. Juntos, estes resultados sugerem, que a rBmCRT e rHICRT são imunogênicas e pode ter funções imunomoduladoras sobre o sistema imune do hospedeiro, mas não suficiente para prevenir o desenvolvimento da imunidade humoral.

**Palavras-chave:** *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, rBmCRT, rHICRT, anticoagulante, sistema complemento, carrapato, bovinos.

## ABSTRACT

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a blood-sucking ectoparasite of bovines from tropical and subtropical regions, causing serious damages to the livestock production. The main method of control is based on the acaricides. However, the use of vaccines has been studied as a promising control method. The calreticulin (CRT) is a multifunctional protein present in almost all cells of animals. The secretion of CRT during feeding might be linked to the modulation of the parasite-host interaction. In the present study, recombinant CRTs of *R. microplus* (rBmCRT) and of *Haemaphysalis longicornis* (rHICRT) were expressed in *Escherichia coli* and purified by ion exchange chromatography. The immunogenic and antigenic capacities of BmCRT e HICRT were analyzed by different methods. *In silico*, were comparisons of the CRTs epitopes, identified by Jameson-Wolf antigenic index, indicates that there are three different regions between the tick CRTs. While, *in silico* analysis showed 6 regions in rBmCRT and in rHICRT that could interact with C1q protein. *In vitro*, by Western blot, rBmCRT, but not rHICRT, was recognized by the serum of bovine experimentally infested with *R. microplus*. In Western blot with extracts of larvae, the sera of a rabbit immunized with rBmCRT and bovines immunized with rBmCRT or rHICRT recognized BmCRT; this suggests that antibodies directed to recombinant proteins also recognize native BmCRT. Also, the rBmCRT showed an anticoagulant effect in recalcification time. *In vivo*, the rBmCRT and rHICRT induced reactions of immediate cutaneous hypersensitivity in bovines immunized with rBmCRT and rHICRT, but it was not possible to detect alterations in histopathologic test. Together, these results suggest that the rBmCRT and rHICRT are immunogenic and could have immunomodulatory functions on the immunity system of the host, but not enough to prevent the development of humoral immunity.

Keywords: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, rBmCRT, rHICRT, anticoagulant, complement system, tick, bovine.

## INTRODUÇÃO

### **Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

O *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887), popularmente conhecido no Brasil como carrapato do boi ou carrapato sul americano do boi, é um ectoparasito hematófago originário da Ásia que parasita praticamente somente bovinos. É esporadicamente encontrado em outras espécies. Atualmente classificado como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (HORAK, et al 2002), este carrapato pertence ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acari, Sub-ordem Ixodida e família Ixodidae, conhecida como família dos carrapatos duros. Os membros da ordem Acari diferem de outros aracnídeos, não tendo o corpo segmentado, peças bucais modificadas e as larvas tendo três pares de patas, enquanto as ninfas e adultos tem quatros pares (URQUHART *et al.*, 1998; IACET, 2006). O *R. microplus* é um dos principais parasitos que afetam a pecuária entre os paralelos 32°N e 32°S, abrangendo os rebanhos da América, África, Ásia e Oceania (JOHNSTON *et al.*, 1986). O parasitismo causado pelo carrapato bovino acarreta significativo dano econômico à pecuária bovina (HORN & ARTECHE, 1985), causando grandes perdas na produção de leite e carne (SUTHERST *et al.*, 1983), danos ao couro causados pelas lesões e reações inflamatórias nos pontos de fixação do carrapato (SEIFERT *et al.*, 1968), além de ser vetor de protozoários do gênero *Babesia* e da riquetsia *Anaplasma marginale* (McCOSKER, 1981; YOUNG & MORZARIA, 1986). Estima-se que, anualmente, as perdas decorrentes da infestação pelo *R. microplus* cheguem a 1 bilhão de dólares americanos no Brasil (GOMES, 2000). Estudos recentes indicam a possibilidade de estimar a infestação de carrapatos e atribuir seu efeito, sugerindo que cada carrapato ingurgitado seja responsável por perdas de mais de um grama de peso vivo (JONNISON, 2006).

Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores de carne bovina do mundo, possui um rebanho bovino de aproximadamente 200 milhões de cabeças, sendo o sétimo maior produtor mundial de leite, com 23.320 toneladas em 2005 e exportando aproximadamente 2,1 bilhões de dólares em carne no primeiro semestre de 2006 (EMBRAPA, 2006; CNPC, 2006). Neste contexto, o controle do carrapato bovino é fundamental para a manutenção da sanidade do rebanho nacional e o desenvolvimento da bovinocultura.

### **Ciclo de vida**

As teleóginas (fêmeas completamente ingurgitadas) ao desprenderem-se do hospedeiro caem ao solo, dando início à fase de vida livre que pode variar aproximadamente 20 dias, quando há boas condições climáticas, até vários meses em condições adversas de temperatura e umidade. As teleóginas possuem geotropismo positivo e buscam abrigo no solo e vegetação para iniciar o processo de postura, logo após o período de pré-postura que, em temperatura ideal, dura de 2 a 3 dias podendo se estender por muitos dias em épocas de frio. A ovoposição pode chegar a 3.000 ovos/teleógina, em temperatura de 27 °C e umidade superior a 70% que são condições ideais para o desenvolvimento do *R. microplus* (GONZALES, 1995). Nestas condições, o período de postura dura aproximadamente de 12 a 15 dias. Aproximadamente sete dias após o final da postura, inicia-se a eclosão dos ovos, que dura em torno de 5 dias. Após um período de aproximadamente 7 dias as neolarvas transformam-se em larvas infestantes, aptas a iniciar a fase de vida parasitária. Em baixas temperaturas as larvas podem sobreviver por vários meses, mas a capacidade infestante restringe-se aos primeiros 90 dias (GONZALES, 1995).

No início da fase de vida parasitária, a larva infestante se fixa no hospedeiro e esta fase de vida parasitária dura em média 21 dias. As larvas migram para determinadas regiões corporais, como a região posterior das coxas e as regiões perianal e perivulvar, as quais são mais propícias para o seu desenvolvimento em virtude da espessura, vascularização e temperatura da pele, bem como pela dificuldade de autolimpeza do hospedeiro (WAGLAND, 1978; CORDOVÉS, 1996). Durante a fase parasitária, o carrapato passa por vários instares até atingir a fase adulta. Os instares e seus respectivos períodos de duração são: larva a metalarva (4 dias, em média); metalarva à ninfa (4 dias); ninfa a metaninfa (3 dias); a partir desta etapa ocorre à diferenciação sexual; metaninfa a neandro (3 dias) e gonandro (1-2 dias) – macho adulto; metaninfa a neógina (4 dias); neógina a partenógina (3 dias) e partenógina a teleógina (3-4 dias) – fêmea adulta (GONZALES, 1995).

## Métodos de controle

### Controle químico

Ao longo do tempo foram utilizados, seqüencialmente, acaricidas baseados em compostos arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidas, piretróides e avermectinas (GEORGE *et al.*, 2004). Os acaricidas químicos, se corretamente aplicados, são eficientes e de custo efetivo, no entanto, freqüentemente são utilizados incorretamente, selecionando populações de carrapatos resistentes aos princípios ativos utilizados e causando acúmulo de resíduos em alimentos (WILLADSEN, 2006). Com a finalidade de determinar o melhor momento de aplicação dos acaricidas em *Bos indicus* e seus cruzamentos JONSSON, (2006) utilizaram a fórmula  $n = C \times 10^3 / Pdkt$ , desenvolvida por SUTHERST *et al.*, (1983) onde “n” é o menor número de carrapatos que a aplicação de acaricida é viável, “C” o custo de aplicação do acaricida por cabeça (\$), “P” o preço do boi vivo (\$), “d” a perda (g) de peso vivo por carrapato ingurgitado, “k” a proporção de carrapatos mortos a cada banho e “t” é o número médio em dias que o carrapato parasita o hospedeiro (21 dias para *R. microplus*). Foi determinado que acima de 100 carrapatos é a quantidade mais econômica de carrapatos parasitando um bovino para realização de banho com acaricida. No entanto, o uso freqüente e disseminado de acaricidas também favorece a seleção de populações de carrapatos resistentes (RODRIGUEZ-VIVAS, 2006). Na década de 30, foram descritos os primeiros casos de resistência aos compostos arsenicais. A partir disso, novos casos de resistência, para as diferentes drogas introduzidas, foram descritos ao longo do século XX (SEDDON, 1967; WHARTON *et al.*, 1980; MARTINS *et al.*, 2001; GEORGE *et al.*, 2004). O *R. microplus* pode apresentar resistência mais rapidamente que outros carrapatos, presumivelmente, pelo menor período de tempo entre as gerações (KOCAN, 1995). Novos acaricidas, como os inibidores de desenvolvimento fluazuron e fipronil, estão sendo avaliados para serem utilizados contra carrapatos, não sendo detectado nenhum caso relevante de resistência até o momento (SABATINI *et al.*, 2001; GEORGE *et al.*, 2004).

### Controle biológico

No campo, o *R. microplus* encontra inúmeras adversidades, que o dificultam ou impedem de completar o ciclo biológico. O estudo dos inimigos naturais dos carrapatos amplia as alternativas de utilização de métodos de controle individual ou associado. Várias formas de controle podem ser citadas como a garça vaqueira *Egretta ibis* (ALVES-BRANCO *et al.*, 1983) e as formigas que podem reduzir o nível de infestação em uma determinada área (GONZALES, 1995), além de alternativas como a seleção de raças menos sensíveis ao carrapato (JONSSON, 2006), o manejo do rebanho (WHARTON *et al.*, 1980), a rotação de pastagens (ELDER *et al.*, 1980), o cultivo de forrageiras que dificultam o desenvolvimento das fases livres do carrapato (SUTHERST *et al.*, 1982; FARIAS *et al.*, 1986; BASSO *et al.*, 2005) e as condições climáticas (SUTHERST, *et al.*, 2006) influenciam no ciclo de desenvolvimento dos carrapatos.

O tipo de vegetação é um dos fatores capazes de influenciar o ciclo do carrapato, 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* (SUTHERST *et al.*, 1982) e do capim gordura (*Melinis minutiflora*) (FARIAS *et al.*, 1986) podem contribuir consideravelmente para o controle do carrapato. Estudos demonstraram que *M. minutiflora*, *S. scabra* e *S. viscosa* possuem ação repelente e podem causar a morte de larvas do carrapato (FARIAS *et al.*, 1986). A rotação de pastagens é outra prática de manejo que comprovadamente reduz o nível de infestação pelo *R. microplus*, especialmente nas épocas de pico parasitário (ELDER *et al.*, 1980, NORTON *et al.*, 1983).

Vários patógenos tem sido estudados no controle biológico de pestes, SAMISH *et al.* (2004) relataram a existência de 96 formulações baseadas em microorganismos. Porém, apenas algumas espécies foram avaliadas contra carrapatos, sendo que os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* tem sido os mais estudados e parecem os mais promissores (SAMISH *et al.*, 2004). O *M. anisopliae*, um deuteromiceto entomopatogênico, é altamente patogênico para carrapatos *Ixodes scapularis* (ZHIOUA *et al.*, 1997) e *R. microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000). No Brasil, já foram encontrados isolados de *M. anisopliae* infectando naturalmente o *R. microplus* (DA COSTA *et al.*,

2002). Avaliação *in vitro* de 12 isolados de *M. anisopliae* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* mostraram que existem isolados mais patogênicos e que podem causar morte de até 100% dos carrapatos infectados *in vitro*, dependendo da concentração de esporos na suspensão utilizada (FRAZZON *et al.*, 2000). Outros estudos demonstraram que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* induziram uma taxa de mortalidade de aproximadamente 30% em *Rhipicephalus appendiculatus* adultos alimentados em coelhos, enquanto que *M. anisopliae* induziu mortalidade de 37% em *Amblyomma variegatum* adultos. É interessante ressaltar que estes fungos não perdem sua capacidade de infecção sobre o carrapato quando são incubados com acaricida por mais de 5 dias, mantendo o crescimento e suas características morfológicas normais (KAAYA *et al.*, 1996, BAHIENSE, 2006). BASSO *et al.* (2005) avaliaram o efeito de *M. anisopliae* na população de *B. microplus* e a influência das pastagens *Brachiaria brizantha* e Tifton 85 (*Cynodon* spp.) nessa interação, evidenciando menor número de larvas no Tifton, indicando que o tipo de pastagem favoreceu a ação do fungo. Esse resultado demonstra que a associação de medidas de controle pode potencializar o resultado do controle biológico. Bactérias, como *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* são naturalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato e também têm sido estudadas no controle biológico. Existem relatos de uma diminuição de até 47% na ovoposição quando teleóginas de *R. microplus* foram submersas em suspensão de *C. lapagei* (BRUM, 1988). Outros organismos parasitas, tais como nematódeos, tem sido também avaliados como ferramentas no controle biológico de carrapatos, já que têm se mostrado eficientes no controle de insetos (SAMISH *et al.*, 2001).

Outra estratégia envolvendo controle biológico é a utilização de compostos naturais como pesticidas. DAVEY *et al.* (2001) testaram em bovinos diferentes concentrações de “spinosad”, um acaricida natural de *Sacharopolyspora spinosa* (actinomiceto), obtendo uma drástica redução no número de fêmeas ingurgitadas, na massa de ovos e no índice de fecundidade do *R. microplus*. O extrato de *Sapindus saponaria*, uma árvore rica em saponinas e encontrada nos EUA, México, Argentina e Brasil, foi testado *in vitro* contra larvas de *R. microplus*, demonstrando excelente ação larvicida (FERNANDES *et al.*, 2005). Resultado semelhante foi obtido com óleo essencial extraído de 3 espécies de *Eucalyptus* (CHAGAS *et al.*, 2002). A utilização de ferormônios para captura e controle

dos carrapatos apresenta alguns resultados promissores, mas ainda precisam ser melhor estudados (SONENSHINE, 2004).

### **Controle imunológico**

São reconhecidas as condições de resistência imune ao carrapato em bovinos e que sua origem não é inata, e sim adquirida durante as sucessivas infestações pelo parasita (ALLEN, 1994). A diferença na habilidade do *B. taurus* e *B. indicus* em desenvolver imunidade protetora naturalmente adquirida foi reconhecida em 1918 por JOHNSTON & BRANCOFT que publicaram o primeiro artigo que relata o fenômeno (BROWN, 1988). A imunidade é observada após a primeira infestação por carrapatos e mediada por dois tipos de respostas imunológicas: a resposta inata e a resposta adquirida (WIKEL *et al.*, 1997), que envolvem células apresentadoras de antígenos, citocinas, anticorpos, linfócitos B e T, granulócitos, entre outras células e moléculas (WIKEL, 1996). Os primeiros trabalhos de controle de carrapatos pelo sistema imunológico foram fundamentados pela transferência passiva de imunidade de animais resistentes para animais suscetíveis. Apesar do limitado grau de proteção, ROBERTS *et al.*, (1976) demonstraram transferência passiva de imunidade através da transferência de soro de bovinos resistentes ao *R. microplus* para bovinos sensíveis, confirmando o envolvimento de anticorpos na resistência adquirida. WIKEL & ALLEN, (1976) demonstraram a importância dos linfócitos na resposta adquirida contra *Dermacentor andersoni*, através da transferência de células de linfonodos de cobaias resistentes para suscetíveis. Bovinos infestados naturalmente com carrapatos desenvolvem linfócitos T e B de memória, que permitem uma resposta mais eficiente em futuras infestações (WIKEL, 1996). Apesar da importância dos linfócitos T na indução e manutenção de uma resposta eficaz ser bem definida, ainda não foi elucidado qual a importância de cada tipo de resposta (celular ou humoral) para a proteção contra o carrapato (WIKEL *et al.*, 1997; WILLADSEN, 2004; RUIZ, *et al.*, 2006). Acredita-se que a resistência imunológica ao carrapato seja pela ação de anticorpos, complemento ou reações de hipersensibilidade (VALENZUELA, 2004).

As células inflamatórias liberam histamina que inibem a salivação do carrapato e sua alimentação (PAINE, 1983). MUKAI *et al.*, (2002) induziram hipersensibilidade cutânea imediata administrando extrato de ninfas não alimentadas em cães infestados repetidas vezes, sugerindo que em cães a imunidade celular é um importante mecanismo de



resistência aos carrapatos. No entanto, reações celulares nos locais de fixação do carrapato variam entre indivíduos susceptíveis e resistentes (WIKEL, 1996).

A avaliação do padrão de resposta humoral em bovinos parcialmente resistentes (raças zebuínas) e suscetíveis (raças européias) à infestação por *R. microplus* foi determinada por KASHINO *et al.* (2005), encontrando maiores níveis de IgG anti-saliva em animais da raça Nelore (zebuínos) comparado a bovinos da raça Holandesa e Aberdeen (européias).

A administração de imunossupressores inibe a resistência a carrapatos tornando os indivíduos susceptíveis (WIKEL *et al.*, 1976b; WILLADSEN, 2004). Ao longo da evolução, os carrapatos desenvolveram maneiras de suprimir ou evadir as respostas imunes do hospedeiro. Um exemplo dessa adaptação é a saliva dos artrópodes hematófagos, que contém moléculas anti-hemostáticas, vasodilatadoras, antiinflamatórias e imunomoduladoras, que facilitam o processo de alimentação e transmissão de patógenos (RIBEIRO, 1989; NUTTALL *et al.*, 2004). Essa imunomodulação é particularmente importante para os carrapatos, inclusive o *R. microplus*, que permanece se alimentando em um único hospedeiro por vários dias (WIKEL *et al.*, 1997). O *R. microplus* consegue inibir a resposta humoral, a ativação do sistema complemento, a proliferação de linfócitos T, produção de citocinas e mediadores químicos como histamina e serotonina (VALENZUELA, 2004; BROSSARD *et al.*, 2004).

Apesar das substâncias imunomoduladoras do carrapato o bovino adquire resistência através da produção de anticorpos contra substâncias da saliva do carrapato (KASHINO *et al.*, 2005). Segundo WILLADSEN (1987), o repertório de antígenos em potencial, ou seja, moléculas do parasita que possam ser encontradas pelo sistema imune do hospedeiro durante a alimentação é bastante limitado, enquanto que a variedade de moléculas do parasita que é exposta aos componentes do sangue do hospedeiro durante a ingurgitação é grande. Surgindo assim o conceito de “antígenos ocultos”, ou seja, aqueles que nunca são diretamente expostos ao sistema imune do hospedeiro durante uma infestação por carrapatos. A utilização de "antígenos ocultos" sugere que possam aumentar a resposta protetora, tendo em vista que são moléculas desconhecidas do sistema imune do hospedeiro e portanto os parasitas não desenvolveram mecanismos de evasão para a resposta imune. No entanto, há necessidade de revacinação para manutenção da proteção, porque na infestação natural não ocorre o estímulo do sistema imune do hospedeiro

(WILLADSEN, 2004). A identificação da glicoproteína Bm86 (antígeno oculto), isolada de intestino no *R. microplus* por WILLADSEN *et al.*, (1988) estimulou a pesquisa de outras proteínas capazes de induzir resposta imunológica em bovinos imunizados. Baseados neste antígeno, duas vacinas comerciais foram lançadas no mercado: a “TickGard”, desenvolvida na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO, e a “Gavac” desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba. As duas vacinas são produzidas em sistema heterólogo, porém, a proteína da TickGard é obtida em *E. coli* e a da Gavac em *Pichia pastoris*. Embora essas vacinas estejam comercialmente disponíveis, elas não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas (WILLADSEN *et al.*, 1996, JONSSON *et al.*, 2000). Portanto, novos antígenos continuam sendo estudados como o antígeno oculto denominado Bm91, identificado pelo grupo Australiano, que em associação com a Bm86 aumenta a eficácia da vacinação (RIDING *et al.*, 1994, WILLADSEN *et al.*, 1996). Resultados de proteção parcialmente efetiva com diferentes antígenos geraram confiança sobre a viabilidade técnica de desenvolvimento de uma vacina. Todavia, mesmo diante do lançamento no mercado de vacinas contra carrapato é consenso a necessidade da busca de novos antígenos ocultos e naturalmente expostos ao sistema imune do hospedeiro para aprimorar a eficiência da imunização.

LOGULLO *et al.* (1998) purificaram um precursor de proteinase aspártica de *R. microplus*, a BYC (*Boophilus Yolk Cathepsin*). Esse antígeno demonstrou degradação da vitelina durante a embriogênese. Experimentos de inoculação de anticorpos monoclonais anti-BYC em teleóginas, no início da postura, demonstraram redução no peso de ovos e na sobrevivência das teleóginas durante a postura (DA SILVA VAZ Jr. I., *et al.*, 1998). Além disso, bovinos imunizados com BYC recombinante e desafiados com 20.000 larvas de carrapatos apresentaram proteção global de 25,24% (LEAL, *et al.*, 2006). Esta proteção parcial obtida com a BYC recombinante foi similar aos descritos com a BYC nativa (da SILVA VAZ Jr., *et al.*, 1998).

As pesquisas estão voltadas à descoberta de novos antígenos que possam compor uma vacina anticarrapatos. Para isso, são investigadas diversas moléculas envolvidas em vias metabólicas importantes para a sobrevivência dos parasitas. Para exemplificar descreveremos alguns antígenos com potencial vacinal:

Uma Glutathione S-transferase (GST) foi isolada de larvas (HE *et al.*, 1999) e de glândula salivar de *R. microplus* (ROSA DE LIMA *et al.*, 2002). Altos níveis de expressão de GST têm sido relacionados à resistência a inseticidas em vários organismos (KAWALEK *et al.*, 1984), além de estar associada a reações alérgicas mediadas por IgE (O'NEILL *et al.*, 1994). O aumento da expressão de GST é altamente correlacionado com resistência, particularmente a compostos organofosforados (WEI *et al.*, 2001). Embora, ainda não tenha sido comprovado correlação entre expressão de GST em *R. microplus* e a resistência frente aos acaricidas, DA SILVA VAZ JR, I. *et al.*, (2004) descreveram o efeito de alguns acaricidas sobre a atividade enzimática de GST.

BRAZ *et al.* (1999), demonstraram que o *R. microplus* não sintetiza heme, obtendo o heme necessário para o seu desenvolvimento da hemoglobina do hospedeiro. O carrapato bovino desenvolveu, ao longo da sua evolução, mecanismos para obtenção e reciclagem de heme. A THAP (*Tick Heme-binding Aspartic proteinase*) foi à primeira enzima descrita com a capacidade de ligar heme e ter sua atividade regulada por esta molécula. Existem indícios que o substrato natural dessa proteína é a vitelina, que no caso do carrapato é uma hemoproteína. Experimentos *in vitro* para mensurar a capacidade de ligação de heme à vitelina, demonstraram que cada molécula de vitelina é capaz de ligar até 31 moléculas de heme, impedindo a formação de radicais livres (LOGULLO *et al.*, 2002).

Uma cisteíno endopeptidase degradadora de vitelina (VTDCE) foi purificada e caracterizada a partir de ovos de *R. microplus* (SEIXAS *et al.*, 2003). Essa enzima é naturalmente associada à vitelina, sendo ativada por acidificação. Foi demonstrado atividade em larvas não alimentadas, ovários e ovos de fêmeas ingurgitadas, sugerindo um papel na embriogênese do carrapato bovino (SEIXAS *et al.*, 2003). Assim como a BYC, o envolvimento na embriogênese associado à capacidade imunogênica faz dessa cisteíno endopeptidase um antígeno potencial, que poderia ser utilizado em associação com a BYC (SEIXAS *et al.*, 2003).

Outras proteínas com potencial vacinal podem ser descobertas, com maior facilidade, com o seqüenciamento do genoma do *R. microplus* (ULLMANN *et al.*, 2005; GUERREIRO *et al.*, 2006). Os estudos realizados, até o momento, para confecção de uma vacina contra carrapatos não possibilitam substituir totalmente o uso de acaricidas, sendo indispensável a identificação de novos antígenos para obter uma vacina eficiente contra *R. microplus*.

## A proteína calreticulina

A calreticulina (CRT) é uma proteína secretada na saliva do carrapato que se liga a cálcio. Foi primeiramente localizada no retículo endoplasmático de músculo esquelético (OSTWALD *et al.*, 1974), depois sendo identificada em um grande número de espécies e em todas as células nucleadas de mamíferos, demonstrando sua participação em uma ampla gama de funções celulares (MICHALAK *et al.*, 1999). Em SDS-PAGE, a CRT apresenta massa molecular de aproximadamente 55 kDa (OSTWALD, 1974), devido à migração anômala causada pelo domínio C que é altamente ácido. No entanto, a massa molecular predita através da seqüência de cDNA é de 46 kDa para a CRT madura de *R. microplus* (FERREIRA *et al.*, 2002).

A CRT apresenta três domínios. O domínio N-terminal (domínio N) corresponde à região mais conservada entre as proteínas das diferentes espécies e é somente encontrada nesta família de proteínas até o momento (KRAUSE *et al.*, 1997). A porção N-terminal da calreticulina humana, denominada vasostatina, mostrou-se capaz de inibir a proliferação de células endoteliais sem afetar outras linhagens, suprimir angiogênese *in vivo*, além de reduzir significativamente o linfoma de Burkitt e o carcinoma de cólon humano (PIKE *et al.*, 1998; CHENG *et al.*, 2001). Foi demonstrado posteriormente que a calreticulina completa apresenta as mesmas atividades anti-angiogênica, que foram mapeadas na região entre os aminoácidos 120 a 180 da porção N-terminal, confirmando seu potencial como inibidor da angiogênese patológica e na supressão de tumores (PIKE *et al.*, 1999). O domínio N liga  $Zn^{2+}$  envolvendo 4 resíduos de histidina, mas não liga  $Ca^{2+}$ , (MICHALAC *et al.*, 1999; TAN *et al.*, 2006), o domínio N interage com o domínio ligante de DNA dos receptores de glicocorticóides *in vitro* (BURNS *et al.*, 1994), com  $\alpha$ -integrinas (COPPOLINO *et al.*, 1997), com as proteínas disulfato-isomerase e a proteína 57 do retículo endoplasmático (ERp57) (KIMURA *et al.*, 2005). Estas interações proteína-proteína são reguladas por  $Ca^{2+}$  ligado ao domínio P da calreticulina (CORBETT *et al.*, 1999).

O domínio P é o domínio interno, o qual apresenta um sítio de ligação de cálcio com alta afinidade e baixa capacidade e um sinal de localização nuclear que é encontrado em outras proteínas como a calnexina (BAKSH *et al.*, 1991; KRAUSE *et al.*, 1997). Com três repetições da seqüência PXXIXDPDAXKPEDWDE seguidas por três repetições da

seqüência GXWXPPXIXNPXYX, estas repetições são importantes para a atividade chaperona de lectina (MICHALAK *et al.*, 1999).

O domínio C-terminal (domínio C) é composto majoritariamente por resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico, sendo altamente ácido. Apresenta alta capacidade e baixa afinidade de ligação de cálcio (25 mol de  $\text{Ca}^{2+}$ /mol de proteína), se liga a fatores de coagulação sanguínea e este domínio também é encontrado em outras proteínas (MICHALAK *et al.*, 1999).

A inibição da via alternativa do complemento foi demonstrada com extrato de glândula salivar de *Ixodes ricinus* inibindo fortemente a geração de C3a e a clivagem do fator B no soro, mas não tendo efeito significativo sob a formação, estabilidade ou atividade da C3 convertase (C3bBb) no soro (LAWRIE *et al.*, 2004). No carrapato *A. americanum* foi demonstrado a secreção de calreticulina na saliva diretamente no hospedeiro, sendo sugerido que atue modulando o sistema imune e/ou a hemostase do hospedeiro (JAWORSKI *et al.*, 1995). Também foi sugerido que nestes carrapatos a calreticulina pode ser utilizada como biomarcador e que os níveis de anticorpos contra esta proteína podem estar diretamente relacionados com índices de ingurgitação do parasita (SANDERS *et al.*, 1998; SANDERS *et al.*, 1999).

As secreções da glândula salivar do carrapato são descritas como moduladoras da relação carrapato hospedeiro (RIBEIRO, 1989), sendo a CRT uma das proteínas secretadas na saliva durante a alimentação (JAWORSKI, 1995). No entanto, a purificação e caracterização de suas atividades são difíceis devido à pequena quantidade secretada na saliva. A clonagem da região codificante do gene e a expressão da BmCRT em sistema heterólogo (rBmCRT) possibilita o estudo de suas funções biológicas na interação parasito hospedeiro. O uso da calreticulina como potencial imunógeno em parasitas já foi sugerido a *Necator americanum* (PRITCHARD *et al.*, 1999), *Schistosoma spp* (HAWN *et al.*, 1993; KHALIFE *et al.*, 1994; HUGGINS *et al.*, 1995; GENGEHI *et al.*, 2000), além do carrapato *A. americanum* (JAWORSKI *et al.*, 1995). Além disso, reatividade cruzada de anticorpos anti-CRT tem sido demonstrado entre carrapatos (SANDERS *et al.*, 1998, 1999). Estes dados sugerem que a secreção de CRT na saliva tenha uma função comum a todos os carrapatos.

O *Haemaphysalis longicornis*, igualmente ao *R. microplus*, é classificado como um carrapato duro. Pode ser encontrado no oeste da Ásia e Oceania, parasitando bovinos.

No entanto, ao inverso do *R. microplus*, também é encontrado parasitando outras espécies. Na Ásia, é um importante vetor de *Theileria sp* a bovinos (ONUMA *et al.*, 1998) e no Japão, de *Babesia sp* a humanos e animais (HOMER *et al.*, 2000). Embora, ainda não tenha sido mostrada a secreção de CRT junto à saliva de *H. longicornis*, baseado em estudos que demonstram a reatividade cruzada de anticorpos anti-CRT entre carrapatos (SANDERS *et al.*, 1998, 1999), formulamos a hipótese a CRT de *H. longicornis* (HICRT), fosse capaz de estimular uma resposta humoral cruzada contra a BmCRT. Portanto, neste trabalho comparamos o potencial imunogênico da BmCRT e da HICRT e caracterizamos algumas funções modulatórias da BmCRT.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos Gerais**

Análise do potencial imunogênico da rHICRT e da rBmCRT.

Caracterização das funções da rBmCRT relacionadas com a evasão do sistema imune do hospedeiro.

### **Objetivos Específicos**

Comparação da imunogenicidade da rBmCRT e rHICRT em bovinos imunizados e infestados com o *R. microplus*.

Predição da interação da rBmCRT e rHICRT com o fator do sistema complemento C1q.

Avaliação do efeito a rBmCRT sobre o sistema de coagulação do plasma bovino.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Análise Filogenética das seqüências de CRT**

Uma árvore filogenética foi gerada pelo método *Bootstrap neighbor-joining* e testada com 1000 repetições através do programa MEGA versão 3.1 (KUMAR, 2004). As seqüências de aminoácidos deduzidos para as seqüências de CRT foram acessados do GenBank com os seguintes números de acesso: *Homo sapiens*, AAH02500; *Macaca mulatta* isoforma 1, XP\_001110174; *Mus musculus*, AAH03453; *Rattus norvegicus*, AAH62395; *Bos taurus*, BAB86913; *Oryctolagus cuniculus*, AAB20096; *Gallus gallus*, AAS49610; *Haemaphysalis longicornis*, (não depositada); *Amblyomma americanum*, AAR29932; *Dermacentor variabilis*, AAR29944; *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, AAN03709 e *Rhipicephalus sanguineus*, AAR29961.

### **Predição de epítomos com potencial antigênico e sítios de ligação a C1q**

Utilizou-se o índice de Jamerson-Wolf com o programa LASERGENE versão 7.0.0 (DNASTAR, 2006) para predição de regiões com potencial determinante antigênico por combinação de métodos de predição de estrutura protéica. Foram utilizadas, para a predição, as seqüências BmCRT com 411 aminoácidos (GenBank AAN03709) e HICRT com 410 aminoácidos (não depositada).

Para a predição dos sítios ligantes de C1q semelhantes aos da CRT humana, foram alinhadas pelo algoritmo CLUSTALW usando o programa MEGA versão 3.1 (KUMAR *et al.*, 2004) as seqüências protéicas de CRT de: *Homo sapiens*, (AAH02500), *Bos taurus*, (BAB86913), *Haemaphysalis longicornis*, (não depositada); *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, (AAN03709), *Necator americanus* (CAA07254), *Haemonchus contortus*, (AAR99585). O programa GeneDoc versão 2.6.003 (NICHOLAS *et al.*, 1997) foi utilizado para avaliar as características físico-químicas conservadas dos aminoácidos.

A predição das estruturas tridimensionais das seqüências das proteínas CRT: *Homo sapiens*, (AAH02500), *Haemaphysalis longicornis*, (não depositada); *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, (AAN03709), foram submetidas ao ESyPred3D Web Server 1.0 (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>). As seqüências com potencial ligante de C1q foram localizadas e avaliadas quanto a sua exposição da superfície



das moléculas dos modelos protéicos em comparação com a CRT humana, com auxílio do software PyMOL™ v.0.99.

### **Expressão da rBmCRT**

O plasmídeo recombinante pET-5b/BmCRT, previamente clonado, foi transformado em *E. coli*, linhagem AD494 DE pLysS (Novagen), e plaqueado em agar SOB contendo os antibióticos canamicina, cloranfenicol e ampicilina. Uma colônia isolada foi inoculada em 25 ml de meio SOB contendo ampicilina ( $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ), canamicina ( $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) e cloranfenicol ( $3,4 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) e crescidas 16 horas a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação de 180 rpm. Após o cultivo, as células foram coletadas por centrifugação a  $10.000 \text{ g}$  por 10 min e ressuspensas em meio fresco sem antibiótico e usado para inocular em 500 ml de meio SOB em frascos de 2 litros. Estes frascos foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação de 180 rpm até alcançar densidade ótica 0,8 no comprimento de onda de 600 nm. Para indução da expressão da proteína, isopropiltio- $\beta$ -D-galactosida (IPTG) foi adicionado para concentração final de 1 mM e o cultivo incubado por 16 h a  $23^\circ\text{C}$ . As células cultivadas foram centrifugadas a  $10.000 \text{ g}$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$  e o sedimento ressuspensa em tampão fosfato de sódio 10 mM, 300 mM de NaCl, pH 6,5. Para lisar as células, essas foram congeladas e descongeladas 3 vezes e sonicadas 5 vezes com ultra-som por 30 s, com intervalo de 1 min e amplitude de 40 Mhz. A fração solúvel e insolúvel foi separada por centrifugação a  $10.000 \text{ g}$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  até o uso.

### **Purificação da rBmCRT e rHICRT**

A rHICRT clonada em pET-43a/HICRT com cauda de histidina foi produzida nas mesmas condições descritas para a rBmCRT, com exceção da temperatura de expressão que foi a  $30^\circ\text{C}$  (rHICRT, gentilmente cedida por PARIZI, L. F). Depois do cultivo, o sobrenadante do lisado das células com pET-43a/HICRT ou pET-5b/BmCRT foram submetidos a cromatografia de troca iônica HiTrap Mono Q (Amersham Biosciences) equilibrada com o tampão 10 mM fosfato de sódio, 300 mM de NaCl, pH 6,5 e eluídas com o tampão 10 mM de fosfato de sódio, 400 mM de NaCl, pH 6,5 e tampão 10 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl, pH 6,5. As frações eluídas foram dialisadas em PBS e concentradas por filtração com Centricon YM10 (Millipore) e utilizadas para imunização dos animais. As amostras utilizadas para os testes *in vitro*, após concentradas, foram

purificadas por cromatografia de gel filtração. Aplicando 500 µg das amostras em coluna de cromatografia de gel filtração (Superdex 75, Amersham Biosciences, de 30 ml) equilibrada com PBS.

### **SDS-PAGE, Western e Dot blot**

As amostras protéicas para SDS-PAGE foram preparadas com tampão Tris 250 mM pH 6,8, 2% SDS, 0,025% azul de bromofenol, 5% de glicerol, 1,0% de β-mercaptoetanol e 5 M uréia e separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 12%. Para avaliação do SDS-PAGE, o gel foi corado com azul de *Coomassie* por 1 h e depois descorado por fervura por 5 min com água.

Para os *Western blot*, após a realização do SDS-PAGE as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45 µm, 70 V por 1 h a 4°C em tampão carbonato 12 mM, pH 9,9, 20% metanol (DUNN, 1986).

Para a imunodeteção por *dot blot* das frações separadas por cromatografia de gel filtração, as amostras foram adsorvidas em membrana de nitrocelulose 0,45 µm por 1 h (aproximadamente 0,5 µg de proteína por amostra).

Os sítios de ligação inespecíficos para proteínas das membranas de nitrocelulose foram bloqueados com *blotto* 5% (fosfato de sódio 10 mM, 150 mM de NaCl, 5% leite desnatado) por 1 h a temperatura ambiente. Para a adsorção dos anticorpos não específicos para CRTs, todos os soros (anticorpos primário) utilizados para sondagem, foram diluídos e incubados previamente por 1 h a temperatura ambiente com lisado de *E. coli* AD494 DE pLysS cultivado (as bactérias foram ressuspensas em PBS com 10% do volume de cultivo) como descrita no item expressão protéica. Para sondagem do *Western blot* da expressão de rBmCRT foi utilizado soro de coelho anti-rHICRT, já disponível no laboratório, diluindo 1:1000. Os conjugados anti-IgG de coelho (1:5.000), anti-IgG de camundongo (1:10.000) e anti-IgG de bovino (1:20.000) foram incubados por 1 h. A revelação foi feita pela adição de NBT/BCIP em tampão 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5.

### **Imunização de camundongos**

Para comparar a imunogenicidade das CRTs recombinantes, as frações eluídas com 400 mM ou 500 mM de NaCl foram inoculadas em camundongos. Os animais foram divididos em três grupos com dois camundongos, inoculados três vezes por via

intraperitoneal com intervalos de 14 dias. O grupo controle recebeu emulsão composta por 50 µl de PBS com 50 µl de adjuvante incompleto de Freund por dose. Os grupos tratamentos receberam 50 µl da emulsão de rBmCRT 400 ou 500 (100 µg/dose) com 50 µl de adjuvante incompleto de Freund.

### **Análise de antigenicidade da rBmCRT 400 e rBmCRT 500**

As frações de rBmCRT eluídas com 400 mM ou 500 mM de NaCl (rBmCRT 400 e rBmCRT 500, respectivamente), foram aplicadas em SDS-PAGE 12% com redução, com 3,33 µg de proteína por centímetro linear de gel e transferidas para membrana de nitrocelulose como descrito anteriormente. Fitas de 3 mm com 0,1 µg de rBmCRT 400 ou rBmCRT 500 foram sondadas por uma hora com os soros dos camundongos diluídos 1:200 e reveladas como descrito anteriormente.

### **Imunização e desafio dos bovinos**

Para comparar a imunogenicidade e capacidade de indução de uma resposta imune protetora, a calreticulina de *R. microplus* e de *Haemaphysalis longicornis*, foram utilizados três bovinos fêmeas da raça Hereford (*Bos taurus taurus*) de 18 meses de idade, oriundos de área livre de carrapatos. Os bovinos foram alojados em baias a prova de carrapatos com assoalho ripado e alimentados duas vezes por dia com feno e concentrado, com água disponível *ad libitum*. Os animais foram alocados em controle (bovino 1), tratamento rBmCRT (bovino 2) e tratamento rHICRT (bovino 3), inoculados três vezes por via subcutânea no pescoço com intervalos de duas semanas. O bovino controle recebeu emulsão composta por 1 ml de PBS com 1 ml de adjuvante oleoso (Montanide 888 e Marcol 52) por dose. Os bovinos tratamento receberam a emulsão de rBmCRT eluída com 500 mM de NaCl ou rHICRT eluída com 500 mM de NaCl (100 µg/dose) com 1 ml de adjuvante. Vinte dias após a última inoculação, os bovinos foram desafiados com 2.000 larvas de *R. microplus* da linhagem Porto Alegre com 10 dias de idade, livres de *Babesia spp* e *Anaplasma spp*.

### **Hipersensibilidade cutânea em bovinos**

A região escapular dos bovinos foi tricotomizada para inoculação de 2 µg de rBmCRT e rHICRT por via intradérmica. Foram utilizados como controles 2 µg BYC nativa (gentilmente cedida por Leal, A.), previamente caracterizadas como produtora de reação de hipersensibilidade cutânea imediata em bovinos vacinados com BYC (LEAL, A. comunicação pessoal), e extrato de bactéria *E. coli* AD494 DE pLysS expressando as proteínas do vetor pET-43a. Foi observada a presença ou ausência de alterações macroscópicas como edema e eritema 30, 60 e 120 min, 24 e 48 horas após inoculação. Foram coletados fragmentos de pele nos pontos de inoculação 2 e 48 horas após a inoculação, com auxílio de Punch e anestesia local com lidocaína 2%. As amostras foram acondicionadas em formol 10% tamponado até avaliação histopatológica. As amostras foram coradas com hematoxilina-eosina e avaliadas quanto a presença de eosinófilos, neutrófilos e monócitos pelo Laboratório de Patologia Animal da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

### **Análise da antigenicidade da rBmCRT e rHICRT com soros de bovinos infestados e vacinados**

Utilizando os soros coletados após cada infestação de outros dois bovinos (bovinos 4 e 5) infestados experimentalmente 12 vezes repetidas (6 vezes com 18.000 e 6 vezes com 800 larvas de *R. microplus*) (FERREIRA, C.A.S., comunicação pessoal) e soros de bovinos imunizados com rBmCRT ou rHICRT foi feita a caracterização da capacidade antigênica das CRTs. Foi feito SDS-PAGE 12% com redução e aplicado as proteínas rBmCRT e rHICRT na quantidade de 3,33 µg de proteína por centímetro linear de gel e a seguir transferidas para membrana de nitrocelulose e cortadas em fitas de 3 mm com 0,1 µg de rBmCRT ou rHICRT. Foram testados os soros pré-infestação, da segunda e décima infestação diluídos 1:50 e soros dos bovinos imunizados com rBmCRT e rHICRT diluídos 1:200. A revelação foi realizada como descrito no item SDS-PAGE, *Western* e *Dot blot*.

### **Identificação de CRT em extrato de larvas**

Larvas de *R. microplus* de 20 dias foram maceradas sobre o gelo em PBS, centrifugadas por 15 min a 12.000 g a 4 °C e o sobrenadante sonificado 5 vezes com ultra-

som por 30 s, com intervalo de 1 min e amplitude de 40 Mhz. Depois de centrifugado por 40 min a 32.000 g a 4°C, foi adicionado solução de inibidores de proteases (7 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8,2, 1.000 µl de deoxicolato 1%, 20 µl Pepstatina A 1mg/ml, 20 µl Leupeptina A 8 mg/ml, 20 µl TPCK 0,1 mM) a 300 µl da fração solúvel. A concentração de proteínas do extrato de larvas obtido foi determinado pelo método de BRADFORD (BRADFORD, 1976) e submetido a uma eletroferese SDS-PAGE 12% com redução. Foram aplicados 118 µg de proteína por centímetro linear de gel. Depois de transferidas para membrana de nitrocelulose, como previamente descrito, foram feitas fitas de 3 mm contendo 35,4 µg de extrato de larvas e os sítios de ligação inespecíficos para proteínas das membranas foram bloqueadas com *blotto* 5% por 1 h. Após sondadas por 16 horas com soro dos bovinos imunizados com rBmCRT e rHICRT e com o soro do coelho imunizado com rBmCRT, diluídos 1:50. A revelação foi realizada como descrito no item SDS-PAGE, *Western* e *Dot blot*.

### **Titulação por ELISA das IgGs anti-CRT dos soros bovinos**

O soro coletado dos bovinos, após duas semanas de cada imunização, foi utilizado para titulação das IgGs por ELISA. Placas de polietileno foram sensibilizadas com 100 ng/poço dos antígenos rBmCRT ou rHICRT por 16 horas a 4°C em tampão carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9,6. Os dois antígenos foram sondados com os soros dos bovinos imunizados com rBmCRT e rHICRT previamente incubados por 1 h com 10% de extrato de bactéria *E. coli* AD494 DE pLysS. Detectado com conjugado peroxidase anti-IgG bovino, diluído 1:20.000 incubado por 1 h e revelado com uma solução de 3,2 mg de OPD e 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 10 ml tampão fosfato-citrato 0,1 M pH 5,0, por 20 min e após interrompida a reação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12,5%. A densidade ótica utilizada para leitura foi 490 nm. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata.

### **ELISA de competição dos soros bovinos**

Para verificar a competição entre os anticorpos dos soros e as proteínas solúveis rBmCRT ou rHICRT foi realizado ELISA de competição com os soros dos bovinos. Na placa foram fixadas as proteínas rBmCRT ou rHICRT (como descrito no item anterior). Foram adicionadas aos poços rBmCRT e rHICRT solúveis em quantidades crescentes de 50 a 800 ng, juntamente com os soros e incubados por 1 hora. Os soros testados foram

anteriormente diluídos 1:200 e incubados para adsorção por 1 h com 10% de extrato de bactéria *E. coli* AD494 DE pLysS. Os procedimentos de incubação do anticorpo secundário e revelação foram idênticos aos descritos no item acima. Foram realizados dois experimentos independentes e em duplicata.

## **Inibição da coagulação**

### **Atividade da trombina sobre o substrato S2238 após adição de rBmCRT e rHICRT**

Os efeitos da rBmCRT ou rHICRT sobre a atividade de trombina foram mensurados por ensaio de cinética com o substrato cromogênico específico para trombina (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, Chromogenix™), sendo quantificados por espectrofotometria com densidade ótica de 405 nm. Em placa de 96 poços, 0,4  $\mu\text{M}$  de trombina bovina foi incubada por 15 min a 37 °C com 0,55 ou 1,1  $\mu\text{M}$  de rBmCRT ou rHICRT. Depois foi adicionado 0,2 mM do substrato S2238 e tampão (Tris 50 mM pH 7,5 com NaCl 150 mM e  $\text{CaCl}_2$  10 mM), qsp 100  $\mu\text{l}$ . A reação foi analisada com leituras a cada 15 s durante 30 min. Foram realizados três experimentos independentes e em duplicata.

### **Efeito da rBmCRT ou rHICRT na atividade da trombina sobre o fibrinogênio**

O efeito da presença da rBmCRT ou rHICRT na atividade da trombina sobre o seu substrato natural (fibrinogênio) foi analisado pela formação de rede de fibrina. Em placa de 96 poços, 0,4  $\mu\text{M}$  de trombina bovina e 0,36 ou 0,73  $\mu\text{M}$  de rBmCRT ou rHICRT, foram incubados por 15 min a 37°C. Após foi adicionado 200  $\mu\text{g}$  de fibrinogênio bovino e tampão (Tris 20 mM, pH 7,5), qsp 150  $\mu\text{l}$ . A reação foi analisada com leituras a cada 15 s durante 20 min com densidade ótica de 650 nm. Foram realizados três experimentos independentes e em triplicata.

### **Influência da rBmCRT sobre o tempo de recalcificação plasmática**

O tempo de recalcificação plasmática foi mensurado pela adição de cálcio. Para a obtenção de plasma, foi respeitada a proporção de 9 partes de sangue bovino para 1 parte de citrato de sódio 3,8% (0,11 mol/l) e centrifugado 1.000 g por 10 min. O plasma obtido foi congelado -20°C até o uso. Em placa de 96 poços, 0,8 ou 3,1  $\mu\text{M}$  de rBmCRT e 6 mM

de  $\text{CaCl}_2$ , foram incubados por 15 min a  $37^\circ\text{C}$ . Após foi adicionado 50  $\mu\text{l}$  plasma bovino e tampão (Tris 20 mM, pH 7,5), qsp 150  $\mu\text{l}$ . A coagulação foi analisada com leituras a cada 15 s durante 20 min com densidade ótica de 650 nm. Foram realizados três experimentos independentes e em triplicata.

Para verificar a influência das imunoglobulinas do bovino vacinado sobre a rBmCRT no sistema de recalcificação plasmática (descrito acima), IgGs do soro dos bovinos vacinados com rBmCRT foram purificadas por cromatografia de afinidade com coluna HiTrap G (Amersham Biosciences) equilibrada com tampão fosfato 20 mM pH 7,0. Cada 1 ml das proteínas eluídas com tampão glicina 100 mM pH 2,7 foram imediatamente adicionadas a 60  $\mu\text{l}$  de tampão Tris 1 M, pH 9,0. As frações eluídas foram dialisadas contra tampão fosfato de sódio 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4 por 24 horas e purificadas por cromatografia de gel filtração com coluna Superose 12 (Amersham Biosciences) equilibrada com tampão fosfato de sódio 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4. O ensaio foi realizado como descrito a cima, acrescentando um período de incubação da rBmCRT com 1,5  $\mu\text{g}$  de IgG por 15 min, antes da adição do  $\text{CaCl}_2$ . Foram realizados três experimentos independentes e em triplicata.

### **Influência da rBmCRT e rHlCRT sobre o tempo de protrombina**

O ensaio de tempo de protrombina foi realizado adicionando 200  $\mu\text{l}$  de fator tissular cálcico (extrato de cérebro de coelho, Dade Behring<sup>®</sup>) a  $37^\circ\text{C}$  sobre 100  $\mu\text{l}$  plasma bovino previamente incubado com 1,52 ou 3  $\mu\text{M}$  de rBmCRT ou rHlCRT por 5 min. O tempo para a formação do coágulo (em segundos) e a consistência da coagulação foi classificado em coágulo firme e frouxo e rede de fibrina firme e frouxa baseados nos resultados obtidos da curva de referência com plasma sem CRT. As formações dos coágulos foram avaliadas visualmente. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **Análises estatísticas**

As médias dos tempos de recalcificação foram testados por One-Way AOV e a comparação das médias pelo teste LSD com intervalo de confiança de 0,05.

## RESULTADOS

### Análise Filogenética das seqüências de CRT

A construção filogenética *Neighbor-joining* com as seqüências protéicas de CRT é mostrada na Figura 1. Os ramos da árvore referentes às seqüências de CRT de carrapatos (seqüências sublinhadas) mostram altos valores de *bootstrap* com exceção do *Amblyoma americanum*. As seqüências de rBmCRT e rHICRT apresentam proximidade nos ramos, indicando, com forte suporte estatístico, uma provável origem em comum. (Figura 1).

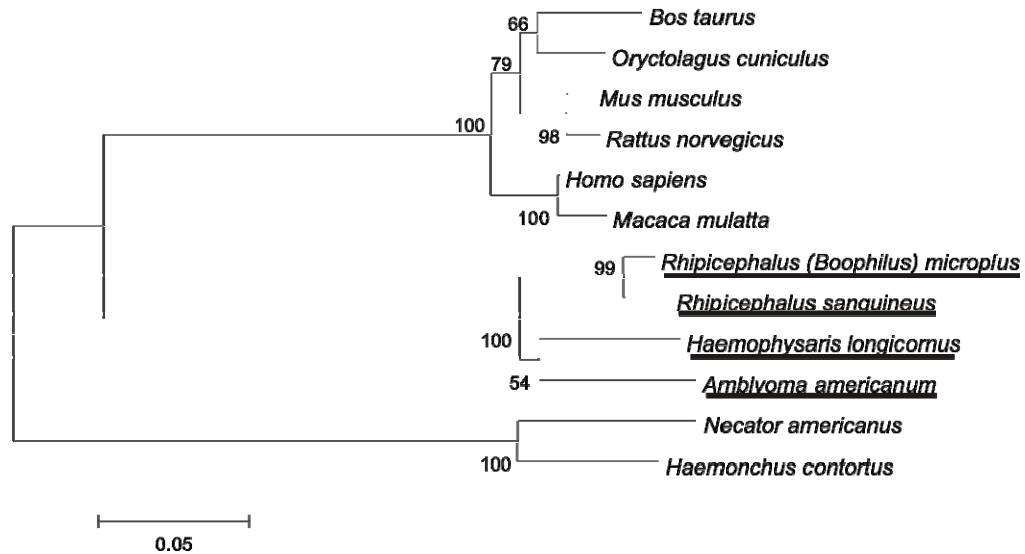


Figura 1 Dendrograma de seqüências protéicas de CRTs. A barra de escala indica 0,05 substituições por sítio. As proporções de *bootstrap* indicadas dos braços ilustram a quantidade de vezes (em porcentagem) que as seqüências se repetiram neste arranjo. As seqüências sublinhadas são de artrópodes.



### **Predição dos sítios de ligação de C1q em seqüências de CRT**

Foram identificados 6 sítios com potencial ligante de C1q nas regiões 38-46, 59-65, 149-155, 160-167, 220-228, 274-280, em todas as seqüências analisadas (Figura 2). Todas as seqüências apresentam em três sítios (38-46, 59-65 e 220-228) um aminoácido não conservado. A região 59-65 do *H. longicornis* é conservada quando comparada com *H. sapiens* e a de *R. microplus* é conservada nas seqüências de *N. americanus* e *H. contornus*. A região 220-228 apresenta todos aminoácidos conservados entre as seqüências, com exceção das seqüências de *N. americanus* e *H. contornus*, que possuem somente um resíduo de glutamina (E) que não é conservado.

### **Estrutura 3D das CRT**

Para a predição das estruturas tridimensionais, as seqüências de aminoácidos de CRT humana, rBmCRT e rHICRT foram submetidas ao ESyPred3D, utilizando como molde a estrutura tridimensional da calnexina (1JHN) apresentando respectivamente, 33,4, 31,6 e 31,5% de resíduos idênticos com as seqüências de CRTs. Nas estruturas tridimensionais preditas foram observadas 7 regiões formando fitas  $\beta$  antiparalelas e uma região formando  $\alpha$ -hélice na porção globular e 1 região formando fitas  $\beta$  antiparalelas no domínio P, que se apresenta na forma de um braço estendido (Figura 3).

### **Epítomos antigênicos da rBmCRT e rHICRT**

A utilização do índice de Jamerson-Wolf para a predição de regiões com potencial antigênico demonstrou múltiplas regiões positivas em comum e 6 regiões positivas diferentes entre as proteínas rBmCRT e rHICRT, com valor maior que 1. Estes dados indicam que as duas proteínas apresentam potencial antigênico semelhantes e 6 prováveis epítomos antigênicos diferentes (Figura 4).



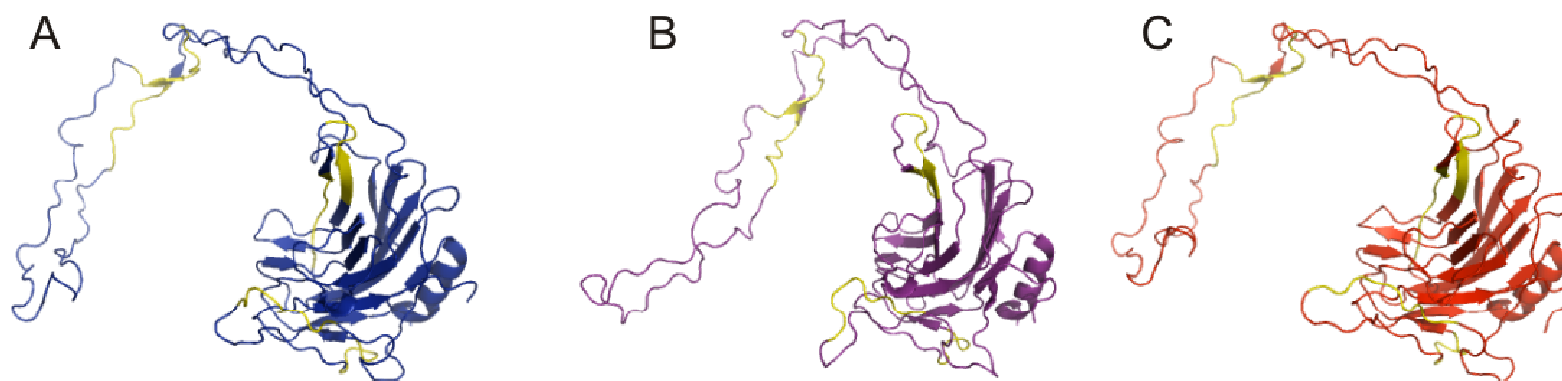


Figura 3 – Estrutura 3D predita da rBmCRT, rHICRT e CRT humana. “A” calreticulina de *R. microplus*; “B” calreticulina de *H. sapiens*, “C” calreticulina de *H. longicornis*. Em amarelo estão selecionadas as regiões com potencial ligante de C1q.

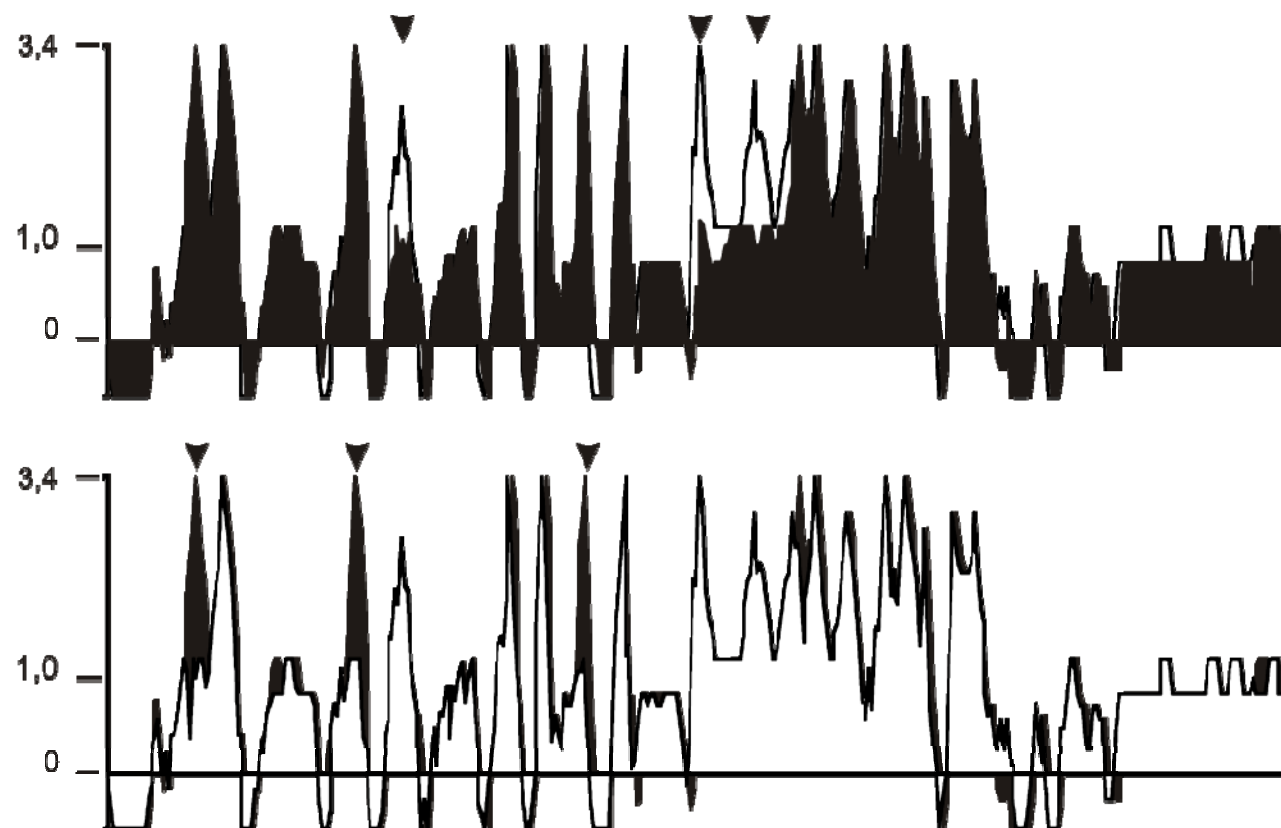


Figura 4 – Predição do potencial de antigenicidade para BmCRT e HICRT pelo índice de Jamerson-Wolf (1988). Os resultados deste índice aparecem como picos múltiplos com potencial determinante antigênico, onde os picos com índice positivo e maior que 1 são mais antigênicos. Na figura “A” o gráfico branco representa a rBmCRT sobre-posto pelo gráfico da rHICRT (gráfico preto). Na figura “B” o gráfico da rHICRT (gráfico preto) foi sobreposto pelo gráfico da rBmCRT (gráfico branco). As setas indicam regiões com potencial antigênico diferente entre as seqüências.

## Expressão e purificação da rBmCRT

A expressão da rBmCRT na forma solúvel em *E. coli* AD494 DE pLysS foi induzida com 1 mM de IPTG e cultivada por 16 horas a 23°C. A expressão foi confirmada por SDS-PAGE e *Western blot* (Figura 6), com uma banda com 55 a 60 kDa reconhecida por anticorpo policlonal de coelho contra rHICRT.

As purificações da rBmCRT e rHICRT foram realizadas por cromatografia de troca iônica, obtendo o mesmo padrão de eluição para as duas proteínas com tampão fosfato 10 mM, 400 ou 500 mM de NaCl (Figura 7), as quais foram utilizadas para imunização dos animais. Enquanto, para os testes *in vitro*, as duas proteínas eluídas com 400 e 500 mM de NaCl foram submetidas a cromatografia por gel filtração com Superdex 75. Apresentando dois picos entre o 8° e 9° ml após a aplicação da rBmCRT 400 ou rHICRT 400 e um pico único e estreito no 9° ml após a aplicação da rBmCRT 500 ou rHICRT 500.

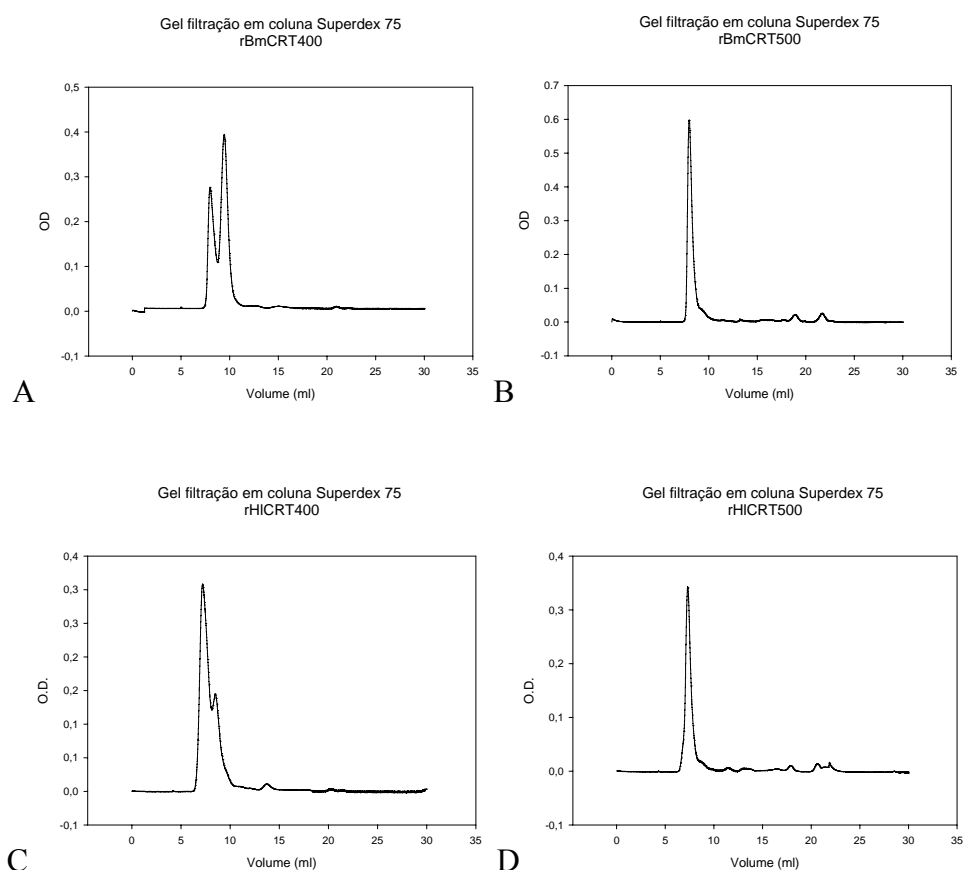


Figura 5 – Cromatografia de gel filtração em coluna Superdex 75. As amostras rBmCRT 400 e rHICRT 400 apresentam dois picos no 8° e 9° ml (gráfico A e C) e a rBmCRT 500 e rHICRT 500 apresentam no 9° ml um pico estreito (gráfico B e D).

As frações foram testadas por *dot blot* com soro de coelho anti-rHICRT confirmando a presença de rBmCRT predominantemente no 8º e 9º ml para a rBmCRT 400 e rHICRT 400 e para a rBmCRT 500 e rHICRT 500 predominantemente no 9º ml (dados não mostrados), sendo confirmada por SDS-PAGE 12% a presença de banda compatível com a rBmCRT e rHICRT (Figura 7).

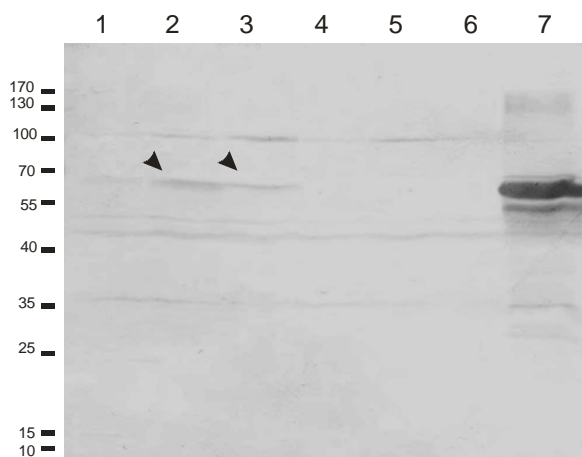


Figura 6 - Western blot mostrando a expressão da rBmCRT. As amostras foram resolvidas por SDS-PAGE 12% com redução e sondada com anticorpo de coelho anti-rHICRT diluído 1:1000 e detectados com conjugado fosfatase anti-IgG de coelho diluído 1:5000. **Linha 1**, sobrenadante do extrato de bactéria pET5b/BmCRT antes da indução; **linha 2**, sobrenadante do extrato de bactéria pET5b/BmCRT 4 horas após indução; **linha 3**, sobrenadante do extrato de bactéria pET5b/BmCRT 16 horas após a indução; **linha 4**, sobrenadante do extrato de bactéria pET5b antes da indução; **linha 5**, sobrenadante do extrato de bactéria pET5b 4 horas após indução; **linha 6**, sobrenadante do extrato de bactéria pET5b 16 horas após a indução; **linha 7**, controle positivo (sobrenadante de extrato de bactéria pET43a/HICRT após 16 horas de indução). As setas indicam a posição esperada para a rBmCRT. O padrão de massa molecular é expresso em kDa (Fermentas).

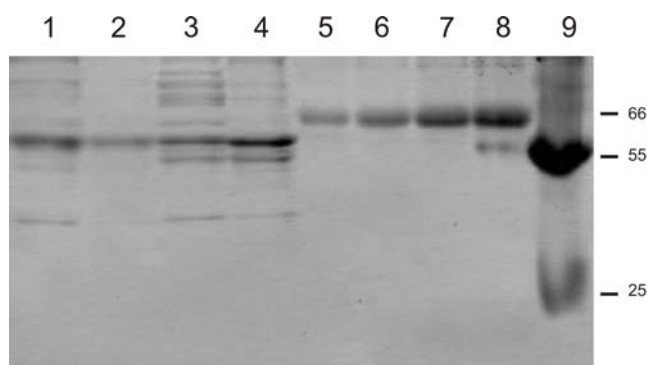


Figura 7 - SDS-PAGE 12% com redução corados com Coomassie blue G-250, das amostras de rBmCRT e rHICRT purificadas por cromatografia de troca iônica e concentrados com Centricon Ym10. **Linha 1**, rBmCRT 400; **linha 2**, rBmCRT 500; **linha 3**, rHICRT 400; **linha 4**, rHICRT 500; **linhas 5 a 8**, 1, 2, 4 e 6 µg de BSA bovino, respectivamente; **linha 9**, IgG suína.

### Imunogenicidade da BmCRT em camundongos

O padrão de reconhecimento entre os soros dos camundongos imunizados com as proteínas rBmCRT 400 e rBmCRT 500 avaliadas por *Western blot*, mostraram um padrão de reconhecimento diferente. Por tanto, o padrão de reconhecimento não foi influenciado pela fração protéica sondada, mas pelo soro utilizado. O padrão de reconhecimento foi muito semelhante quando as proteínas rBmCRT 400 e rBmCRT 500 foram sondadas com soros de camundongos imunizados com rBmCRT 500. Diferindo deste padrão, quando as proteínas rBmCRT 400 e rBmCRT 500 foram sondadas com os soros dos camundongos imunizados com rBmCRT 400. Estas variações podem estar relacionadas com diferenças no grau de purificação das proteínas eluídas. No entanto, todos os soros reconhecem uma intensa banda na posição esperada para a migração da rBmCRT, mostrando que ambas as frações eluídas são capazes de estimular uma resposta imune humoral (Figura 8).

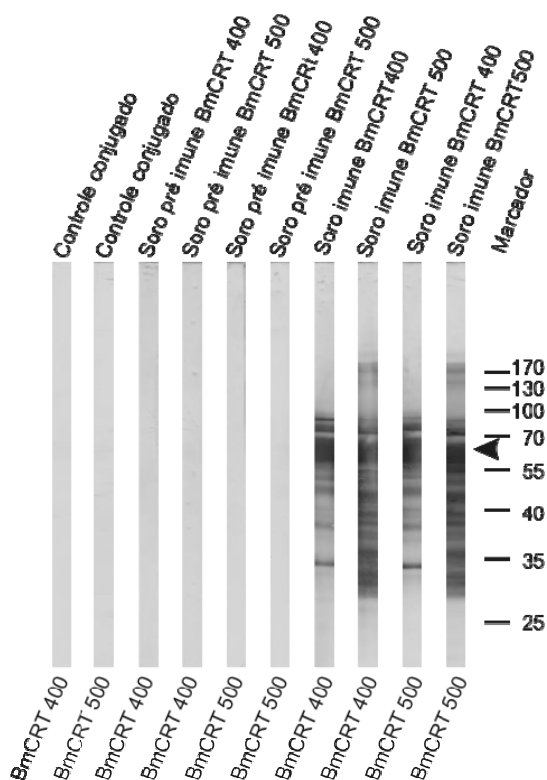


Figura 8 - Western blot da rBmCRT 400 e rBmCRT 500. As fitas foram sondadas com soro de camundongos após terceira imunização com rBmCRT 400 ou rBmCRT 500. Os soros foram diluídos 1:200 e adsorvido com 10% extrato de bactéria *E. coli* AD494 DE pLysS e detectado com conjugado fosfatase alcalina anti-IgG de camundongo diluído 1:5.000. A seta indica a posição esperada para a rBmCRT. O padrão de massa molecular é expresso em kDa (Fermentas).

### Imunogenicidade da rBmCRT e rHICRT

Os soros de bovinos imunizados com rBmCRT e rHICRT foram utilizados para sondar, por *Western blot*, extrato de larva de *R. microplus* de 20 dias. Os quais reconheceram uma proteína de massa molecular prevista para a migração da BmCRT. Enquanto o soro do bovino utilizado como controle negativo não reconheceu nenhuma proteína com esta massa molecular (Figura 9). Confirmando os resultados, o soro do coelho imunizado com rBmCRT reconheceu uma proteína de massa molecular prevista para a migração da BmCRT.

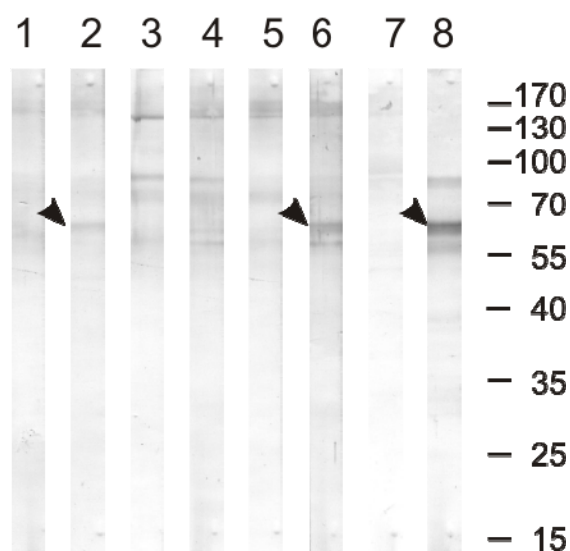


Figura 9 - Análise por Western blot de extrato de larva de 20 dias de carrapatos *R. microplus*, sondado com soros de animais imunizados com rBmCRT e rHICRT. **Linha 1**, soro pré-imune do bovino 3; **Linha 2**, soro do bovino 3 após terceira imunização; **Linha 3**, soro pré-imune do bovino 1; **Linha 4**, soro do bovino 1 após terceira imunização; **Linha 5**, soro pré-imune do bovino 2; **Linha 6**, soro do bovino 2 após terceira imunização; **Linha 7**, soro pré-imune do coelho; **Linha 8**, soro de coelho após quarta imunização. As setas indicam a posição esperada para a BmCRT. O padrão de massa molecular é expresso em kDa (Fermentas).

Os soros dos dois bovinos na 10<sup>a</sup> infestação experimental não reconheceram por *Western blot* o antígeno rBmCRT. Foi identificada com o soro do bovino 4 na quarta infestação uma proteína de massa molecular prevista para a migração da rBmCRT (Figura 10b). Enquanto, com os soros dos bovinos 4 e 5 não foi identificada a proteína rHICRT em



nenhuma das sondagens (Figura 10a). Foram utilizados como controles positivos os soros dos bovinos 2 e 3 imunizados com rBmCRT ou rHICRT, respectivamente.

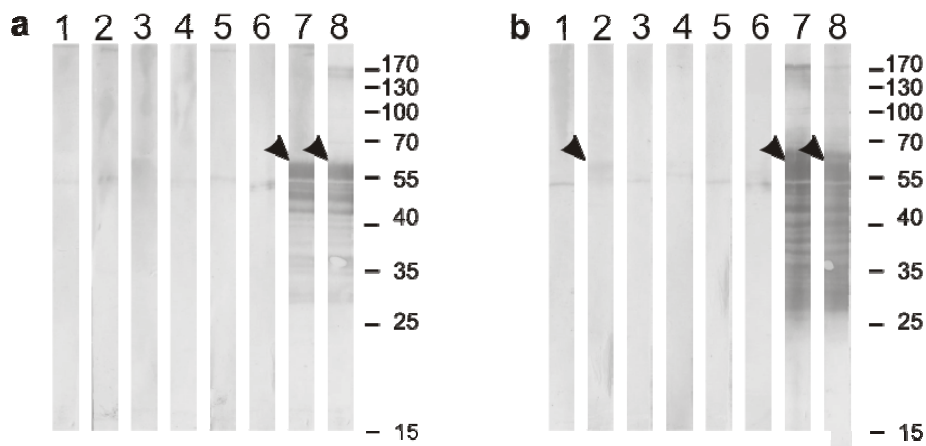


Figura 10 - Análise por *Western blot* de “a” e “b” (rHICRT e rBmCRT respectivamente) com os soros de animais infestados com *R. microplus* ou imunizados contra rHICRT e rBmCRT. **Linha 1**, soro do bovino 4 antes das infestações; **Linha 2**, soro do bovino 4 após a quarta infestação; **Linha 3**, soro do bovino 4 após a décima infestação; **Linha 4**, soro do bovino 5 antes das infestações; **Linha 5**, soro do bovino 5 após a quarta infestação; **Linha 6**, soro do bovino 5 após a décima infestação; **Linha 7**, soro de bovino 2 imunizado após a 3ª dose de rBmCRT; **Linha 8**, soro do bovino 3 imunizado após a 3ª dose de rHICRT. As setas indicam a posição esperada para a CRTs. O padrão de massa molecular é expresso em kDa (Fermentas).

A titulação por ELISA dos soros dos bovinos vacinados mostrou capacidade de produção de anticorpos contra as proteínas rBmCRT ou rHICRT. Os títulos foram de 1.500 para o bovino 2 (imunizado com rBmCRT) testado contra a rBmCRT ou rHICRT e título de 6.000 e 1.500 para o bovino 3 (imunizado com rHICRT) testado contra rHICRT e rBmCRT, respectivamente (Figura 11). A cinética de produção de anticorpos mostrou aumento dos títulos após a segunda dose de rBmCRT ou rHICRT, diminuindo 40 dias após a última dose para os dois bovinos (Figura 12). O bovino 1 inoculado com PBS, não desenvolveu título para rBmCRT ou rHICRT durante o período de imunização e mesmo após a infestação (dados não mostrados).

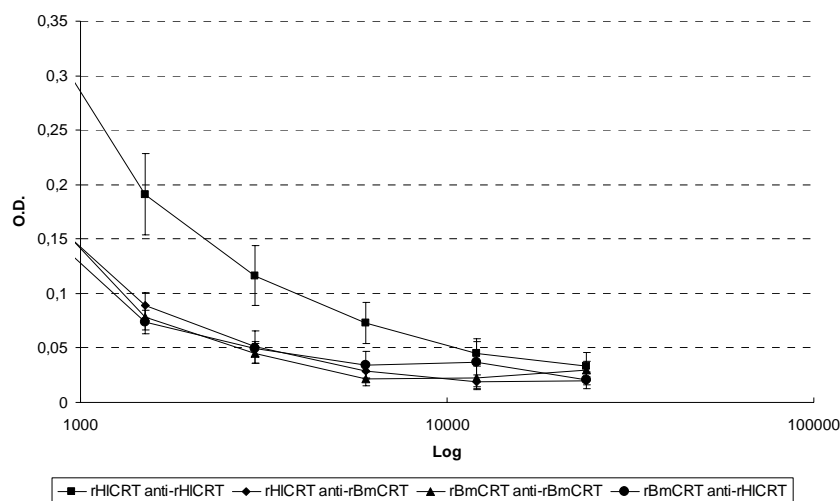


Figura 11 - Titulação por ELISA dos soros dos bovinos imunizados com rBmCRT ou rHICRT. Os soros dos bovinos foram detectados com conjugado peroxidase anti-IgG bovino diluído 1:20.000. A média dos valores obtidos com os soros pré-ímmunes foram utilizados para determinar o ponto de corte de 0,05. O bovino 1 inoculado com PBS manteve os mesmos valores dos soros pré-ímmunes (dados não mostrados). Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata.

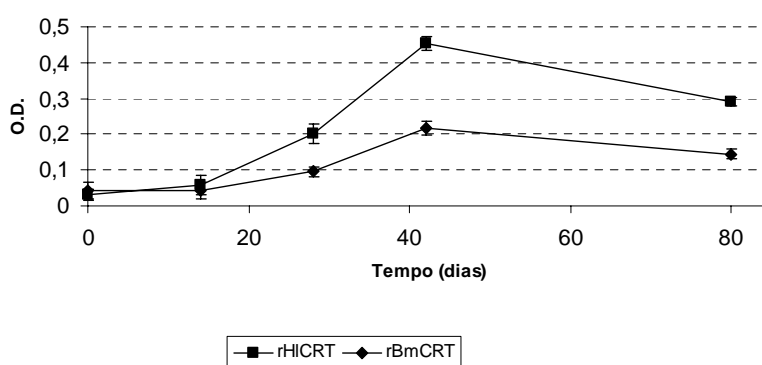


Figura 12 - Cinética por ELISA dos soros dos bovinos imunizados com rBmCRT ou rHICRT. O eixo das abcissas está representando os dias de vacinação, sendo 0 dias soro pré-ímmune, 14 dias primeira dose, 28 dias segunda dose, 42 dias terceira dose e 80 dias após a terceira dose. Os soros dos bovinos foram diluídos 1:500 e detectados com conjugado peroxidase anti-IgG bovino diluído 1:20.000. A média dos valores obtidos com os soros pré-ímmunes foram utilizados para determinar o ponto de corte de 0,05. O bovino 1 inoculado com PBS manteve os mesmos valores dos soros pré-ímmunes. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata.

### ELISA de competição dos soros bovinos

A presença de epítomos diferentes entre rBmCRT e rHICRT foi analisada por ELISA de competição com soro de bovinos imunizados com rBmCRT e rHICRT (Figura 13). As rBmCRT ou rHICRT incubada com os soros dos bovinos 2 e 3 (vacinados respectivamente, com rBmCRT ou rHICRT) apresentaram acentuada competição comparada à competição com a rHICRT ou rBmCRT, respectivamente. A competição da rBmCRT incubada com o soro do bovino 3 ocorreu com menor intensidade que a rHICRT incubada com o soro do bovino 2. Atingindo um platô de competição de 400 a 800 ng de antígeno solúvel, sugerindo a presença de epítomos antigênicos diferentes entre as proteínas.

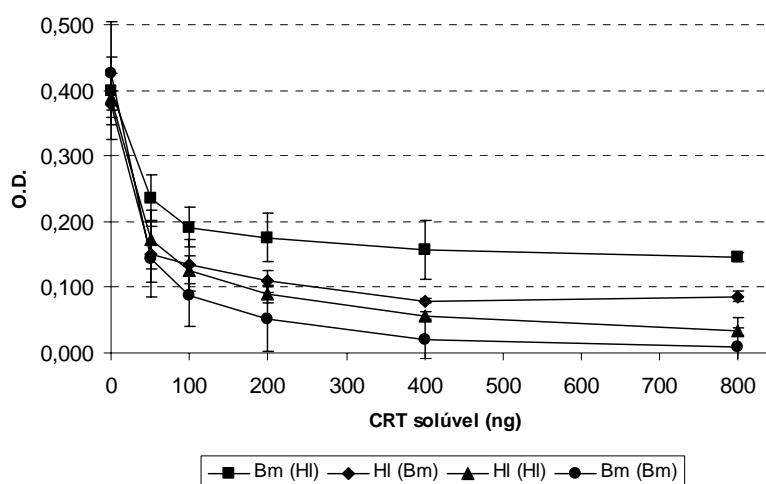


Figura 13 - ELISA de competição das proteínas solúveis rBmCRT ou rHICRT com os soros dos bovinos 2 ou 3 detectados com conjugado peroxidase anti-IgG bovino diluído 1:20.000. O eixo das abscissas indica a diluição do antígeno solúvel e o eixo das ordenadas à absorbância obtida. As abreviações Bm e HI fora dos parênteses indicam os soros dos bovinos 2 e 3, respectivamente e (Bm) e (HI) as proteínas solúveis incubadas para competição com os soros. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata.

### Hipersensibilidade cutânea em bovinos

Os bovinos 2 e 3 imunizados com rBmCRT e rHICRT, respectivamente, desenvolveram edema local 30 a 120 min após a inoculação intradérmica de 2  $\mu$ g dos antígenos. O bovino 3 desenvolveu edema de 12 mm, 30 min após inoculação intradérmica com rBmCRT e rHICRT, enquanto o bovino 2 apresentou edema de 18 mm após 120 min

na área inoculada com rHICRT e um nódulo discreto na área inoculada com rBmCRT. A inoculação do controle de purificação desenvolveu edema de 6 mm no bovino 3, não sendo observadas alterações nos outros animais. No bovino 1 (imunizado com PBS) não foi observado alterações macroscópicas em nenhuma área de inoculação. Nas amostras de pele coletadas 2 horas após administração dos antígenos e analisadas por histopatologia, apresentaram no bovino 1 (bovino controle) infiltrado perivascular e de parede de vasos moderado, na derme superficial e profunda, constituído por neutrófilos e eosinófilos, enquanto, nos bovinos 2 e 3 (imunizados com rBmCRT e rHICRT, respectivamente), foi observado infiltrado perivascular e de parede de vasos discreto ou leve, na derme superficial e profunda constituído por neutrófilos e eosinófilos. Nas amostras coletadas 48 horas após administração dos antígenos foi observado infiltrado perivascular discreto ou leve na derme superficial, constituído por células mononucleares e eosinófilos nos três bovinos.

### **Inibição da coagulação**

#### **Tempo de recalcificação plasmática**

O tempo de recalcificação plasmática foi  $78,01 \pm 9,61$  ( $p < 0,04$ ) e  $105,25 \pm 24,19$  ( $p < 0,005$ ) segundos maior em relação ao controle, quando adicionado 0,8 e 3,1  $\mu\text{M}$  de rBmCRT, respectivamente (Figura 14). Não ocorrendo alterações significativas entre o tempo de recalcificação do controle positivo e o controle de purificação das rCRTs (purificação do extrato de bactéria *E. coli* AD494 DE pLysS expressando as proteínas do vetor pET-43a) ou com a BYC. Com a intenção de testar a possibilidade de inibir o efeito anticoagulante da CRT sobre o plasma foi adicionada IgG purificada dos soros dos bovinos imunizados com rBmCRT ou rHICRT, não sendo observado efeito inibitório sobre o aumento do tempo de recalcificação plasmática causado pela CRT.

Quando foi adicionado rBmCRT ou rHICRT, nos testes de atividade de trombina bovina sobre fibrinogênio ou substrato sintético S2238, não foi observado efeito inibitório da atividade de trombina. Para testar o efeito da rBmCRT e rHICRT na via extrínseca da cascata de coagulação plasmática foi utilizado o teste do tempo de protrombina, não sendo observadas alterações em comparação com a curva de referência com soro bovino sem adição de rBmCRT ou rHICRT.

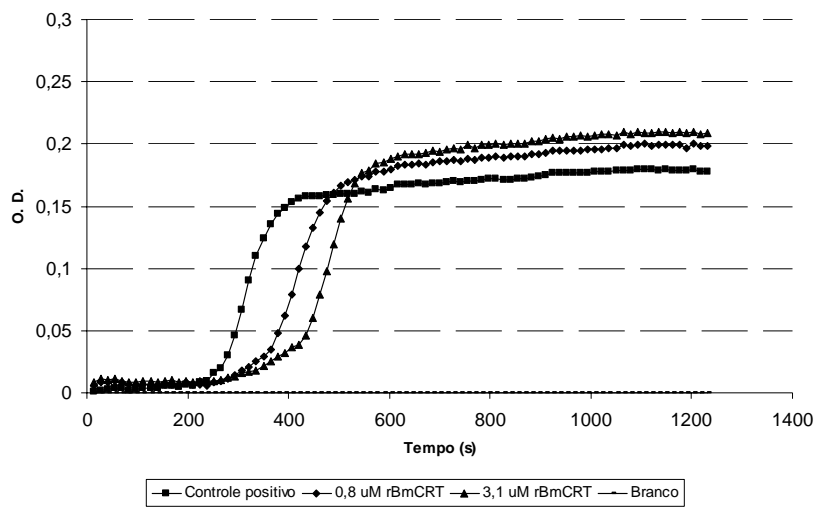


Figura 14 - Efeito da rBmCRT sobre o tempo de recalcificação plasmática. O tempo de formação dos coágulos foram determinados à absorbância atingiu 0,075 com densidade ótica de 650 nm. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

## DISCUSSÃO

A utilização de extratos brutos em vacinas comerciais contra carrapatos é inviável por motivos econômicos e sanitários. Uma alternativa é a identificação, clonagem e expressão em sistema heterólogo de antígenos com potencial vacinal. Entre eles, se destacam a Bm86 (WILLADSEN *et al.*, 1988) e a Bm91 (RIDING *et al.*, 1994), ambos descritos como antígenos protetores contra carrapatos. Quando os antígenos ocultos Bm86 e Bm91 foram associados, houve aumento da eficiência da vacinação (RIDING *et al.*, 1994, WILLADSEN *et al.*, 1996), no entanto, não assegurando um grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas (WILLADSEN *et al.*, 1996, JONSSON *et al.*, 2000). Recentemente a investigação voltou-se para os antígenos expostos, tendo como alvo moléculas envolvidas na interação parasito-hospedeiro (WILLADSEN, 2004; NUTTALL & LABUDA, 2004).

A capacidade do *R. microplus* de parasitar o hospedeiro, entrando em contato com moléculas envolvidas na imunidade inata e adquirida, pode ser melhor compreendido com o estudo dos componentes da saliva. Estas substâncias da saliva são possíveis moléculas alvo para o desenvolvimento de vacinas e para melhor entender como a resposta imune do hospedeiro pode ser alterada ou direcionada para uma resposta efetiva contra o parasito (REED *et al.*, 2003; WILLADSEN, 2004). Alguns componentes da saliva e glândula salivar dos carrapatos foram identificados com funções de inibir ou inativar moléculas do sistema imune (LAWRIE *et al.*, 2005) e da coagulação (CIPRANDI *et al.*, 2006). JAWORSKI *et al.*, (1995) demonstraram que a CRT é um dos componentes secretados da saliva do carrapato *Amblyomma americanum* e que entram em contato com o sistema imune do hospedeiro durante a alimentação, sendo sugerido que atue modulando o sistema imune e/ou hemostase do hospedeiro. Em outros parasitas como o *Haemonchus contortus* (SUCHITRA *et al.*, 2005) e *Trypanosoma cruzi* (FERREIRA *et al.*, 2004), também foi identificada a secreção de CRT com funções imunomodulatórias e anticoagulantes.

As regiões codificantes dos genes da CRT da glândula salivar de *R. microplus* (FERREIRA *et al.*, 2002) e HICRT foram clonadas. Mas, a caracterização das funções das proteínas recombinantes rBmCRT e rHICRT na interação parasito hospedeiro e o potencial imunogênico ainda não tinham sido estudadas. Nesse contexto, objetivamos verificar o potencial imunomodulador da rBmCRT e rHICRT.

Uma das funções atribuídas à calreticulina é a capacidade de inibir a via clássica do sistema complemento por ligação ao C1q (KISHORE *et al.*, 1997; KOVACS *et al.*, 1998). Esta característica foi sugerida para *A. americanum* (JAWORSKI *et al.* 1995), *N. americanus* (PRITTCHARD *et al.* 1999), *Trypanosoma cruzi* (FERREIRA *et al.*, 2004) e *H. contortus* (SUCHITRA, 2005). Sendo que a CRT de *H. sapiens*, *H. contortus*, *N. americanus* tem efeito inibitório da via clássica do complemento já documentado (KOVACS *et al.*, 1998; SUCHITRA, 2005; JAWORSKI *et al.* 1995). Analisando as características físico-químicas dos resíduos das regiões de ligação de C1q, descritos por KOVACS *et al.*, (1998), identificamos 6 regiões ligantes de C1q em todas as seqüências avaliadas. No entanto, foram localizadas 3 regiões de ligação de C1q parcialmente conservadas entre as seqüências. Resumidamente, podemos concluir que a BmCRT e HICRT apresentam, respectivamente, 4 e 5 motivos de ligação de C1q com todos resíduos conservados em comparação a CRT humana (HuCRT). Assim, podemos inferir que a BmCRT e HICRT também poderiam ter a capacidade de inibir a ativação da via clássica do sistema complemento durante a alimentação do *R. microplus* e *H. longicornis*, respectivamente. A predição da disposição espacial das regiões de ligação de C1q das seqüências de HuCRT, BmCRT e HICRT se mostraram semelhantes; ratificando a inferência de que a BmCRT e HICRT também poderia se ligar a C1q. Reforçando a hipótese da BmCRT se ligar a C1q, foram descritas três frações protéicas com atividade anticomplementar para via clássica do complemento em extrato de glândulas salivares do *R. microplus* purificado com gel filtração (FERREIRA *et al.* 1998, 2002).

Recentemente tem aumentado o interesse no estudo de proteínas naturalmente expostas envolvidas na interação parasito-hospedeiro (WILLADSEN, 2004; NUTTALL *et al.*, 2004). A proteína ligante de IgG encontrada na saliva de carrapatos -IGBPs (WANG *et al.*, 1999), proteínas do cemento (MULENGA *et al.*, 1999; TRIMNNEL *et al.*, 2005) são exemplos de proteínas naturalmente expostas ao hospedeiro e que têm sido propostas como alvo vacinal. Neste contexto, pode ser incluída a calreticulina, também encontrada na saliva dos carrapatos. No entanto, necessitando mais estudos para verificar sua função na interação parasito-hospedeiro e seu potencial vacinal.

No presente trabalho, as regiões codificantes dos genes BmCRT e HICRT foram clonadas, respectivamente, nos vetores pET-5b e pET-43a e expressas em *E. coli* AD494 DE pLysS, produzindo proteínas solúveis. Sendo que a rHICRT possui cauda de histidina.

A obtenção das frações, de ambas proteínas, eluídas da cromatografia de troca iônica com os tampões fosfato de sódio 10 mM, 400 mM de sódio, pH 6,5 (rBmCRT 400) e tampão fosfato de sódio 10 mM, 500 mM de sódio, pH 6,5 (rBmCRT 500) mostram a existência de duas proteínas com cargas iônicas diferentes da rBmCRT ou rHICRT, necessitando concentrações de sais diferentes para a eluição da matriz da coluna. Para identificar diferenças imunogênicas entre as frações protéicas eluídas, estas proteínas após dialisadas contra tampão PBS, foram inoculadas em camundongos. Foi mostrado por *Western blot*, que existe um padrão de reconhecimento diferente entre os soros, independente do antígeno sondado (rBmCRT 400 ou rBmCRT 500), sugerindo que os epítomos reconhecidos entre as duas frações protéicas eluídas provavelmente sejam idênticos imunogenicamente. Além disso, uma banda intensa na posição prevista para rBmCRT é observada em todas as fitas sondadas com os soros imunes (Figura 8). As demais bandas possivelmente sejam proteínas truncadas ou degradadas e alguns contaminantes bacterianos. Este padrão de bandas também foi observado na calreticulina recombinante de *T. cruzi* (FERREIRA *et al.*, 2005).

Os bovinos imunizados com rBmCRT e rHICRT desenvolveram resposta imune humoral contra as calreticulinas. A imunogenicidade observada no bovino 2 se opõem aos resultados de FERREIRA *et al.*, (2002) com a rBmCRT, que mostraram ausência de resposta imune humoral em bovinos vacinados ou infestados. Foi possível detectar IgG contra CRT nos bovinos, após a segunda dose com rBmCRT ou rHICRT, mostrando que ambas são imunogênicas a bovinos. Algumas diferenças da nossa metodologia com a utilizada por FERREIRA *et al.*, (2002), para a obtenção dos antígenos e na imunização dos animais, podem ter auxiliado o reconhecimento da rBmCRT pelo bovino. No entanto, RODRIGUEZ *et al.*, (1995) relataram 6% de animais que não responderam à imunização, de um total de 98 bovinos vacinados com proteína recombinante Bm86. O bovino imunizado com rHICRT mostrou título de 6.000 enquanto o bovino imunizado com rBmCRT mostrou título de 1.500, estas diferenças no título podem ser variações individuais, que é frequentemente observada em vacinação de animais não isogênicos e tem sido descrita em outros experimentos de vacinação (DA SILVA VAZ *et al.*, 1998; ANDREOTTI *et al.*, 2002; LEAL *et al.*, 2006). Os títulos de anticorpos se mantiveram por 40 dias após a última dose com redução de 33% e 36% para os bovinos imunizados com rBmCRT e rHICRT, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por



ANDREOTTI *et al.*, (2002), após imunização de bovinos com inibidores de tripsina de *R. microplus* (BmTIs) e desafio com carrapatos, atingindo 50% do título máximo 3 meses após o desafio.

Em humanos, os níveis de anticorpos contra a calreticulina de *Amblyomma americanum* e *Ixodes scapularis* estão diretamente relacionados com os índices de ingurgitamento dos carrapatos (SANDERS *et al.*, 1998; SANDERS *et al.*, 1999). Entretanto, os resultados da recuperação e peso de teleóginas, peso e fertilidade dos ovos de *R. microplus* dos bovinos imunizados e desafiados, não apresentaram resultados conclusivos (dados não mostrados). Devido ao pequeno número de animais avaliados e a grande variação individual que ocorre em animais heterogênicos. Será necessário testar um número maior de animais para observar a existência de diferença entre os tratamentos.

Os soros dos bovinos imunizados com rBmCRT ou rHICRT e do coelho com rBmCRT reconheceram, em extrato de larvas de *R. microplus* de 20 dias, uma proteína na posição prevista para a migração da BmCRT. Mostrando que as rBmCRT e rHICRT induzem a produção de anticorpos contra BmCRT. Adicionalmente, foi identificado por *Western blot* uma proteína com posição prevista para migração da rBmCRT utilizando soro de um bovino com 4 infestações consecutivas com *R. microplus*, no entanto, com o soro pré-imune e da 10<sup>a</sup> infestação, não foi possível a identificação desta proteína. Estes resultados são um indício que a BmCRT estimula o sistema imune do hospedeiro; porém, alguns mecanismos de proteção dos carrapatos, como o fator inibidor de células B (BIF) identificado na saliva de *Hyalomma asiaticum asiaticum* (Yu *et al.*, 2006), podem modular a resposta do sistema imune do hospedeiro causando imunotolerância e/ou imunossupressão. Associado a aquisição de resistência dos bovinos, com redução do título de anticorpos anti-CRT, poderiam justificar a ausência da identificação da rBmCRT no soro da 10<sup>a</sup> infestação.

A diferença no reconhecimento da BmCRT e HICRT, pelos soros dos bovinos infestados, podem ser resultante de epítomos diferentes entre essas proteínas. A predição da antigenicidade gerado através do índice de Jamerson-Wolf confirma a existência de somente 6 regiões com potencial antigênico diferentes entre a rBmCRT e rHICRT. Podemos inferir, avaliando os resultados da predição das regiões com potenciais antigênicos e do ELISA de competição, que a rBmCRT e rHICRT desenvolvem resposta imunogênica a diferentes epítomos entre as proteínas. A identificação de epítomos

antigênicos de CRT específicos somente para algumas doenças hepáticas e de cólon (SÁNCHEZ et al., 2003), reforça a hipótese de anticorpos específicos para rBmCRT ou rHICRT, embora ocorra a predominância de anticorpos em comum. Os resultados do ELISA de competição ratificam a predição de antigenicidade da BmCRT e HICRT, sugerindo que ocorre a formação de anticorpos específicos para cada CRT e também de anticorpos comuns para as duas proteínas. Estes dados sugerem que a resposta gerada pelo sistema imune dos bovinos é parcialmente diferente para as duas proteínas, ocorrendo maior especificidade (melhor reconhecimento) para a proteína que estimulou o sistema imune. Permitindo-nos supor que a não identificação da rHICRT pelos soros dos bovinos infestados possa ser devido a uma menor especificidade em relação aos anticorpos produzidos contra a BmCRT.

A rBmCRT e rHICRT induzem hipersensibilidade imediata em bovinos imunizados. A hipersensibilidade imediata consiste em uma seqüência típica de eventos com exposição do antígeno, ativação de células Th2 específica para o antígeno, produção de anticorpos IgE, ligação do anticorpo ao receptor de mastócitos e degranulação dos mastócitos e eosinófilos liberando fatores vasoativos, espasmódicos e quimiotáticos que causaram permeabilidade dos vasos sanguíneos conseqüentemente edema e taxia de PBMC, macrófagos e neutrófilos (ABBAS *et al.*, 2005). Testes de hipersensibilidade cutânea têm sido utilizados para determinar antígenos responsáveis por reações alérgicas. HLATSHWAYO *et al.*, 2004 inocularam extrato de *Amblyomma cajennense* na orelha de coelhos induzindo hipersensibilidade cutânea em indivíduos previamente infestados. A inoculação de antígenos purificados de larvas de *R. microplus* produziram reações de pele relacionados com o nível de resistência do hospedeiro (WILLADSEN et al., 1978). Cobaias vacinados com o antígeno 64TRP apresentaram lesões papulares eritematosas e necrose da pele, com abandono do local de alimentação pelo *R. sanguineus*. Na histopatologia, foi visualizada hiperplasia de epitélio com fissuras epidérmicas, infiltrados de eosinófilos e basófilos (TRIMNELL *et al.*, 2005). Quanto ao tipo de reação de hipersensibilidade cutânea induzida no local de fixação dos carrapatos *R. sanguineus* em hospedeiros infestados, observou-se uma forte reação de hipersensibilidade imediata em cães e camundongos (hospedeiros susceptíveis), enquanto que cobaias (hospedeiros resistentes) desenvolveram uma pequena reação imediata, e forte reação de hipersensibilidade tardia (SZABÓ *et al.*, 1995; FERREIRA *et al.*, 2003). Estes resultados

sugerem uma imunossupressão causada pela saliva de carrapatos sobre células de linfonodos de cães e camundongos. O mesmo não ocorrendo para células de linfonodos de cobaias infestadas sucessivamente, sugerindo que esses hospedeiros demonstram diferenças significativas na elaboração da resposta imune contra carrapatos (FERREIRA *et al.*, 2003). FRANZIN (2005), verificou a predominância de um perfil de citocinas de padrão Th1 na resistência a carrapatos em cobaias, enquanto diversos trabalhos sugerem uma resposta Th2 para cães, camundongos e coelhos infestados por *R. sanguineus* ou *A. cajennense* (HLATSHWAYO *et al.*, 2004; MUKAI *et al.*, 2002; SZABÓ *et al.*, 2005). Em bovinos a resistência natural adquirida contra o carrapato desenvolve linfócitos T e B de memória, que permitem uma resposta de hipersensibilidade imediata mais eficiente contra o estágio de larva, a ativação do sistema complemento e a produção de anticorpos contra substâncias secretadas pelos carrapatos. Pouco se sabe a respeito do tipo de produtos secretados pelas larvas nos hospedeiros; porém, seriam estas secreções que provavelmente estariam envolvidos no desenvolvimento da resistência induzida por infestações sucessivas. A saliva, secretada durante a alimentação do carrapato, possui um “coquetel” de substâncias com atividade moduladora das reações imunes (WIKEL *et al.*, 1999) auxiliando a permanência do carrapato no bovino. A função imunomoduladora descrita para a CRT em outras espécies de carrapatos sugere que a BmCRT e HICRT estejam envolvidas no controle das reações inflamatórias e de hipersensibilidade local. A administração de rBmCRT e rHICRT em bovinos imunizados com estas proteínas causou hipersensibilidade imediata 30 a 120 minutos após a inoculação intradérmica, não sendo identificado alterações histopatológicas entre os tratamentos e controles. A presença de edema com a metade do diâmetro dos tratamentos, quando inoculado o controle de purificação (expressão com vetor selvagem), indica que a purificação realizada por cromatografia de troca iônica seguida de gel filtração não foi capaz de remover totalmente os contaminantes bacterianos, como o LPS, que são abundantes em *E. coli* e são conhecidas moléculas pró-inflamatórias (GWAKISA *et al.*, 2001). A discreta reação observada no bovino 2 (imunizado com rBmCRT) pode estar relacionada a diferenças de sensibilidade individuais ao antígeno (HLATSHWAYO *et al.*, 2004). Estes resultados sugerem que os bovinos desenvolveram uma resposta imune Th2 contra a rBmCRT e rHICRT, resultando no aumento de mastócitos e eosinófilos, estimulando a produção de anticorpos. Embora em algumas espécies susceptíveis a carrapatos a resposta Th2

(humoral) é predominante, em bovinos a resposta humoral está relacionada com indivíduos mais resistentes (WIKEL *et al.*, 1976). A saliva de *I. ricinus* inibe a proliferação de células B estimuladas e a secreção de IL-10 por células B ativadas (HANNIER *et al.*, 2003; HANNIER *et al.*, 2004), sendo outro indicativo que o envolvimento de anticorpos seja importante para a proteção. Outro estudo, avaliou o padrão de imunoglobulinas anti-saliva de *R. microplus*, em bovinos com diferentes graus de resistência natural ao carrapato, encontrando maiores níveis de IgG em animais resistentes (KASHINO *et al.*, 2005). Além da correlação entre título de anticorpos e proteção, outros achados experimentais sugerem que os anticorpos sejam a principal linha de defesa contra os carrapatos. Moléculas de IgG intactas foram observadas na hemolinfa de diferentes carrapatos, como *Ixodes ricinus* (BROSSARD *et al.*, 1984), *Hyalomma excavatum*, *Rhipicephalus sanguineus* (BEM-YAKIR, 1989) e *R. microplus* (Da SILVA VAZ Jr. *et al.*, 1996). A identificação de uma proteína ligante de IgG (*immunoglobulin G-Binding Proteins* – IGBPs) na saliva de *R. appendiculatus* é outro achado que demonstra a importância dos anticorpos na resposta contra carrapatos (WANG *et al.*, 1994). Em *R. microplus* foi identificado um gene similar a IGBP sendo abundantemente expresso na glândula salivar de machos (KASHINO *et al.*, 2005). Estes autores sugerem que a presença de uma IGBP na saliva de *R. microplus* é um forte indicativo de que os anticorpos exercem um efeito deletério sobre o carrapato. Apesar das evidências experimentais, ainda não foi obtida uma prova definitiva de como os anticorpos atuam contra os carrapatos e da sua verdadeira importância no controle da parasitose.

Para que os carrapatos se alimentem de sangue, por vários dias, sem que ocorra a coagulação, um coquetel de substâncias anticoagulantes são secretados junto com a saliva do carrapato, permitindo que o sangue estocado não coagule em seu intestino e seja metabolizado de forma gradativa durante o período de ovoposição. A saliva dos carrapatos contém algumas substâncias com função anticoagulante, como a microfilina (CIPRANDI *et al.*, 2006) e a BmAP (HORN *et al.*, 2000). Estas proteínas com atividade inibitória da trombina, presentes na saliva do *R. microplus*, impedem a hidrólise do fibrinogênio. Alguns trabalhos mostram que a CRT desempenha funções anticoagulantes (OSTWALD *et al.*, 1974; SUCHITRA *et al.*, 2005; TAN *et al.*, 2006), permitindo-nos supor que a CRT encontrada na saliva do *R. microplus* também possa desempenhar funções anticoagulantes. A primeira função descrita da calreticulina humana foi como proteína ligante de cálcio no

retículo endoplasmático (OSTWALD *et al.*, 1974). O domínio C-terminal (domínio C) apresentando alta capacidade / baixa afinidade de ligação a cálcio (25  $\mu\text{M}$ ) e o domínio P, que é um domínio interno, o qual apresenta um sítio de ligação de cálcio de alta afinidade e baixa capacidade (1  $\mu\text{M}$ ) de cálcio (OSTWALD *et al.*, 1974). A incubação de 0,8 ou 3,1  $\mu\text{M}$  rBmCRT com 6 mM de cálcio retardaram a recalcificação plasmática. O efeito anticoagulante foi observado incubando a rBmCRT com cálcio previamente. Não ocorrendo alteração do tempo de recalcificação plasmática quando incubado a rBmCRT previamente com plasma e após adicionando cálcio; em comparação com controle sem adição de rBmCRT. Sugerindo que a rBmCRT está com sua estrutura tridimensional correta dos sítios de ligação para o cálcio. É importante lembrar que, a CRT recombinante de *N. americanus* não ligou cálcio (KASPER *et al.*, 2001). Os efeitos inibitórios da rBmCRT sobre trombina bovina não foram observados (dados não mostrados). Ainda, é descrita a capacidade da CRT modular a produção de óxido nítrico pelos vasos endoteliais, bloqueando adesão e ativação plaquetária e a liberação de serotonina (KUWABARA *et al.*, 1995), evitando a formação de trombos em vasos lesionados, reduzindo o tempo coagulação do sangue total e de formação de coágulos dependentes de plaquetas (DAI *et al.*, 1997)

## CONCLUSÕES

A BmCRT é imunogênica a bovinos.

As frações rBmCRT 400 e rBmCRT 500 que foram utilizadas para imunização de camundongos, produziram anticorpos a epítomos comuns.

A análise, *in silico*, com o modelo de predição de potenciais antigênicos de Jamerson-Wolf e *in vitro*, por ELISA de competição, com a rBmCRT e a rHICRT sugerem a presença de epítomos diferentes e em comum.

A capacidade de ligação de cálcio das CRTs é mantida na rBmCRT, a qual é capaz de aumentar o tempo de recalcificação plasmática; no entanto, não são observados efeitos sobre a trombina bovina.

O mesmo número predito de sítios com potencial ligante de C1q são encontrados na rBmCRT e na rHICRT. Estando todos os sítios dispostos de formas semelhantes nas superfícies das moléculas preditas, quando comparadas à HuCRT, que possui potencial inibidor do complemento e ligante de C1q já conhecidos. Portanto, sugerimos que a rBmCRT e rHICRT também desempenhem estas funções.

## PERSPECTIVAS

A caracterização de algumas funções da calreticulina do *R. microplus* e seu potencial imunogênico a bovinos foi realizado neste trabalho, no entanto, para melhor entendermos a interação parasito-hospedeiro ainda é necessário ser avaliada:

- a predominância de estímulo a Th1 ou Th2 do sistema imune de bovinos.
- testar o potencial alergênico e ou imunossupressor da calreticulina livre de contaminantes pró-inflamatórios.
- verificar a ocorrência de IgE contra BmCRT no soro e na pele de animais infestados e imunizados.
- realizar desafio com *R. microplus* com um número suficiente de bovinos imunizados para realizar análise estatística sobre a sobrevivência dos carrapatos e fertilidade dos ovos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K. & LICHTMAN, A.H. *Cellular and Molecular Immunology*. 6<sup>th</sup> ed. Elsevier Science, 2005.
- ALLEN, J.R. Host resistance to ectoparasites. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 13: 1287-1303, 1994.
- ALVES-BRANCO, F.P.; ECHEVARRIA, F.A.M. & SIQUEIRA, A.S. Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. *Comunicado Técnico da EMBRAPA*, 1: 1-4, 1983.
- 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 micro plus* tick. *International Immunopharmacology*, 2: 557-563, 2002.
- BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K. & BITTENCOURT, V.R.E.P. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Veterinary Parasitology*, 141(3-4):319-24, 2006.
- BAKSH, S. & MICHALAK, M. Expression of calreticulina in *Escherichia coli* and identification of its Ca<sup>2+</sup> bindings domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 21458-21465, 1991.
- BASTIANI, M.; HILLEBRAND, S.; HORN, F.; KIST, T.B.; GUIMARÃES, J.A. & TERMIGNONI, C. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1439-1446, 2002.
- BASSO, L.M.S.; MONTEIRO, A.C.; BELO, M.A.A.; SOARES, V.E.; GARCIA, M.V. & MOCHI, D.A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40 (6): 595-600, 2005.
- BEM-YAKIR, D. Quantitative studies of host immunoglobulins G in the hemolymph of ticks (Acari). *Journal of Medical Entomology*, 244: 243-246, 1989



- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.
- BRAZ, G.R.C.; COELHO, H.S.L.; MASUDA, H. & OLIVEIRA, P.L. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Current Biology*, 9: 703-706, 1999.
- BROSSARD, M. & RAIS, O. Passage of hemolysins through the midgut epithelium of female *Ixodes ricinus* L. fed on rabbits infested or reinfested with tick. *Experientia*, 40: 561-563, 1984.
- BROSSARD, M. & WIKEL, S.K. Tick immunobiology. *Parasitology*, 129: S161–S176, 2004.
- BROWN, S.J. Highlights of contemporary research on host immune resistance to ticks. *Veterinary Parasitology*, 28: 321-334, 1988.
- BRUM, J.G.W. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei*: etiopatogenia e sazonalidade. *Tese* (Doutor em ciências). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio Janeiro, 1988.
- BURNS, K.; DUGGAN, B.; ATKINSON, E.A.; FAMULSKI, K.S.; NEMER, M.; BLEACKLEY, R.C. & MICHALAK, M. Modulation of gene expression by calreticulina binding to the glucocorticoid receptor. *Nature*, 367: 476-480, 1994.
- CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, M.W.M.; PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J. & FORTES, I.C.P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 39: 247-253, 2002.
- CHENG, W.F.; HUNG, C-F.; CHAI, C-Y; HSU, K-F; HE, L.; LING, M. & WU, T.-C. Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulina linked to a tumor antigen. *Journal Clinical Investigation*, 108: 669–678, 2001.
- CIPRANDI, A.; DE OLIVEIRA, S.K; MASUDA, A.; HORN, F. & TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Experimental Parasitology*, 114: 40–46, 2006.

- CNPC, Conselho Nacional da Pecuária de Corte. *EXPORTAÇÕES E IMPORTAÇÕES DE CARNE BOVINA*. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.abiec.com.br/estatisticas/63.pdf>. Arquivo capturado em 08 de dezembro de 2006.
- COPPOLINO, M.G.; WOODSIDE, M.J.; DEMAUREX, N.; GRINSTEIN, S.; STARNAUD, R. & DEDHAR, S. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signaling and cell adhesion. *Nature*, 386: 843-847, 1997.
- CORBETT, E.F.; OIKAWA, K.; FRANCOIS, P.; TESSIER, D.C.; KAY, C.; BERGERON, J.J.; THOMAS, D.Y.; KRAUSE, K.H. & MICHALAK, M. Ca<sup>2+</sup> regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *Journal Biology Chemical*, 274(10): 6203-11, 1999.
- CORDOVÉS, C.O. *Carrapato: controle e erradicação*. Alegrete: Galha, 1996.
- DAI, E.; STEWART, M.; RITCHIE, B.; MESAELI, N.; RAHA, S.; KOLODZIEJCZYK, D.; LUNDSTROM, M.; LIU, L.Y.; ETCHES, W.; NATION, N.; MICHALAK, M. & LUCAS, A. Calreticulin, a Potencial Vascular Regulatory Protein, Reduces Intimal Hyperplasia After Arterial Injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17: 2359-2368, 1997.
- DA COSTA, G.L.; SARQUIS, M.I.; DE MORAES, A.M. & BITTENCOURT, V.R. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*, 154: 207-209, 2002.
- DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E. & SNYDER, D.E. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Veterinary Parasitology*, 99: 41-52, 2001.
- DAVEY, R.B.; JOHN E. GEORGE, J.E.; MILLER, R.J. Comparison of the reproductive biology between acaricide-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 139: 211-220, 2006.
- DA SILVA VAZ JR., I.; MARTINEZ, R.H.M.; OLIVEIRA, A.; HECK, A.; LOGULLO, C.; GONZALES, J.C.; DEWES, H. & MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Veterinary Parasitology*, 62: 155-160, 1996.

- DA SILVA VAZ JR., I.; LOGULLO, C. J.; SORGINE, M.; VELLOSO, F.F.; ROSA DE LIMA, M.F.; GONZALES, J.C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P. L. & MASUDA, A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66: 331-341, 1998.
- DA SILVA VAZ JR, I.; LERMEN, T.T.; MICHELON, A.; FERREIRA, C.A.S.; FREITAS, D.R.J.; TERMIGNONI, C. & MASUDA, A. Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*, 119: 237–245, 2004.
- DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; BLOUIN, E.F.; NARANJO, V. & KOCAN, K.M. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitology Research*, 96: 137–141, 2005.
- DE ROSE, R; MCKENNA, R.V.; COBON, G; TENNENT, J.; ZAKRZEWSKI, H.; GALE, K.; WOOD, P.R.; SCHEERLINCK, J.P.; WILLADSEN, P. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 71(3-4):151-60, 1999.
- DNASTAR. Protean. Lasergene versão 7.0.0, 2006.
- DUNN, S.D. Effects of the Modification of Transfer Buffer Composition and the Renaturation of Proteins in Gels on the Recognition of Proteins on Western Blots by Monoclonal Antibodies. *Analytical Biochemistry*, 157, 144-153, 1986.
- EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária. *Informativo interno* [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.cppse.embrapa.br/informativo-interno/no-226-fevereiro-2006/> Arquivo capturado em 08 de dezembro de 2006.
- ELDER, J.K.; KEARNAN, J.F.; WATERS, K.S.; DUNWELL, G.H.; EMMERSON, F.R.; KNOTT, S.G. & MORRIS, R.S. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistant cattle and pasture spelling. *Australian Veterinary Journal*, 56: 219-223, 1980.
- FARIAS, N.A.R.; GONZALES, J.C. & SAIBRO J.C. Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 21: 1313-1320, 1986.

- FRAZZON, A. P.; DA SILVA VAZ JR., I.; MASUDA, A.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 94: 117-125, 2000.
- FERNANDES, F.F.; FREITAS, E.P.S.; COSTA, A.C. & SILVA, I.G. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control the cattle tick *Boophilus microplus*, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 1243-1245, 2005.
- FERREIRA, B.R.; SZABO, M.J.; CAVASSANI, K.A.; BECHARA, G.H. & SILVA, J.S. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. *Veterinary Parasitology*, 115(1): 35-48, 2003.
- FERREIRA, C.A.; DA SILVA VAZ JR., I.; DA SILVA, S.S.; HAAG, K.L.; VALENZUELA, J.G. & MASUDA, A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Experimental Parasitology*, 101: 25-34, 2002.
- FERREIRA, C.A.S.; BARBOSA, M.C.; SILVEIRA, T.C.; VALENZUELA, J.G.; DA SILVA VAZ JR., I. & MASUDA, A. cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. *Parasitology*, 125: 265-74, 2002b.
- FERREIRA, C.A.S.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. Anti-complement activity of *Boophilus microplus* saliva. In: XXVII Reunião anual da sociedade brasileira de bioquímica biologia molecular (SBBq), 23 a 26 de maio de 1998, Caxambu-MG. Programa e Resumos da XXIV Reunião Anual. Caxambu: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 156, 1998.
- FERREIRA, V.; MOLINA, M.C.; SCHWAEBLE, W.; LEMUS, D. & FERREIRA, A. Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin modulate the complement system and angiogenesis? *Trends in Parasitology*, 21(4): 169-174, 2005.
- FERREIRA, V.; MOLINA, M.C.; VALCK, C.; ROJAS, A.; AGUILAR, L.; RAMÍREZ, G.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Molecular Immunology*, 40: 1279–1291, 2004.
- FERREIRA, V.; MOLINA, M.C.M.; VALCK, C.; ROJAS, A.; AGUILAR, L.; RAMÍREZ, G.; SCHWAEBLE, W. & FERREIRA, A. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Molecular Immunology*, 40: 1279–1291, 2004.

- FERREIRA, V.; VALK, C.; SÁNCHEZ, G.; GINGRAS, A.; TZIMA, S.; MOLINA, M.C.; SIM, R.; SCHWAEBLE, W. & FERRIRA, A. The Classical Activation Pathway of the Human Complement System Is Specifically Inhibited by Calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*, 172: 3042-3050, 2004.
- FREITAS, D.R.J.; ROSA, R.M.; MORAES, J.; CAMPOS, E.; LOGULLO, C.; DA SILVA VAZ JR., I. & MASUDA, A. Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, (2006), doi:10.1016/j.cbpa.2006.04.032.
- FRANZIN, A.M. Expressão gênica de citocinas em cobaias resistentes a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*. *Dissertação de mestrado*, USP, 2005. [online] Disponível Internet via WWW. URL: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17147/tde-17102006-131001/publico/a.pdf>. Arquivo capturado em 12 de outubro de 2006.
- GENGEHI, N.; RIDI, R.; TAWAB, N.A.; DEMELLAWY, M.; MANGOLD, B.L. A *Schistosoma mansoni* 62-kDa band is identified as an irradiated vaccine T-cell antigen and characterized as calreticulina. *Journal Parasitology*, 86(5):993-1000, 2000.
- GEORGE, J.E.; POUND, J.M. & DAVEY, R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129: S353–S366, 2004.
- GOMES, A. Carrapato-de-boi: Prejuízos e controle. EMBRAPA. Campo Grande (MS), Dez, n.42, 2000. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD42.html>. Arquivo capturado em 08 de dezembro de 2006.
- GONZALES, J.C. *O controle do carrapato do boi*. 2ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995.
- GUERRERO, F.D.; NENE, V.M.; GEORGE, J.E.; BARKER, S.C. & WILLADSEN, P. Sequencing a New Target Genome: The *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Genome Project. *Journal Medicine Entomology*, 43(1): 9-16 (2006).
- GWAKISA, P.; YOSHIHARA, K.; LONG TO, T.; GOTOH, H.; AMANOB, F.; MOMOTANI, E. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks

- inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. *Veterinary Parasitology*, 99: 53–61, 2001.
- HANNIER, S.; LIVERSIDGE, J.; STERNBERG, J.M. & BOWMAN, A.S. *Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes. *Parasite Immunology*, 25: 27–37, 2003.
- HANNIER, S.; LIVERSIDGE, J.; STERNBERG, J.M. & BOWMAN, A.S. Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission. *Immunology*, 113: 401–408, 2004.
- HAWN, T.R.; TOM, T.D. & STRAND, M. Molecular cloning and expression of SmIrV1, a *Schistosoma mansoni* antigen with similarity to calnexin, calreticulin, and OvRall1. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 7692-7698, 1993.
- HE, H.; CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W. & GEORGE, J. E. Characterization and molecular cloning of glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 737-743, 1999.
- HLATSHWAYO, M.; SZABÓ, M.J.P.; BECHARA, G.H. & MBATI, P.A. Cutaneous hypersensitivity induced in rabbits by extracts by extracts of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Journal of the South African Veterinary Association*, 75(1): 37-39, 2004.
- HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S.R.<sup>3rd</sup>; KRAUSE, P.J. & PERSING, D.H. *Clinical Microbiology Rev.* 13: 451-469, 2000.
- HORAK, I.G.; CAMICAS, J.-L. & KEIRANS, J.E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental and Applied Acarology*, 28 (1-4): 27-54, 2002.
- HORN, F.; DOS SANTOS, P.C. & TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384: 68-73, 2000.
- HORN, S.C. & ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. *A Hora Veterinária*, 23: 12-32, 1985.

- HUGGINS, M.C.; GIBBS, J. & MOLONEY, N.A. Cloning of a *Schistosoma japonicum* gene encoding an antigen with homology to calreticulina. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 71, 81-87, 1995.
- IACET. International Association for Continuing Education & Training. TICK CONTROL [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.tlch2o.com/courses/TickControl.pdf>. Arquivo capturado em 03 de agosto de 2006.
- JAWORSKI, D.C.; SIMMEN, F.A.; LAMOREAUX, W.; COONS, L.B.; MULLER, M.T. & NEEDHAM, G.R. A secreted calreticulina protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *Journal Insect Physiology*, 41, 369-375, 1995.
- JAWORSKI, D. C.; SIMMEN, F. A.; LAMOREAUX, W.; COONS, L. B.; MULLER, M. T. & NEEDHAM, G. R. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *Journal of Insect Physiology*, 41: 369-375, 1995.
- JOHNSTON, L.A.Y.; KEMP, D.H. & PEARSON, R.D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects induced immunity on tick populations. *International Journal for Parasitology*, 16: 27-34, 1986.
- 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.
- JONSSON, N.N.; MAYER, D.G. & GREEN, P.E. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Veterinary Parasitology*, 88: 79-92, 2000.
- KAAYA, G.P.; MWANGI, E.N. & OUNA, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 15-20, 1996.
- KASHINO, S.S.; RESENDE, J.; SACCO, A.M.S.; ROCHA, C.; PROENÇA, L.; CARVALHO, W.A.; FIRMINO, A.A.; QUEIROZ, R.; BENAVIDES, M.; GERSHWIN, L.J. & DE MIRANDA SANTOS, I.K.F. *Boophilus microplus*: The

pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Experimental Parasitology*, 110: 12–21, 2005.

- KASPER, G.; BROWN, A.; EBERL, M.; VALLAR, L.; KIEFFER, N.; BERRY, N.; GIRDWOOD, K.; EGGLETON, P.; QUINNELL, R.; & PRITCHARD, D.I. A calreticulina-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signaling domains of some integrins. *Parasite Immunology*, 23, 141-152, 2001.
- KAWALEK, J.C.; REW, R.S. & HEAVNER, J. Glutathione S-transferase, a possible drug-metabolizing enzyme, in *Haemonchus contortus*: comparative activity of a combendazole-resistant and a susceptible strain. *International Journal for Parasitology*, 14: 173–175, 1984.
- KHALIFE, J.; LIU, J.L.; PIERCE, R.; PORCHET, E.; GODIN, C. & CAPRON, A. Characterization and localization of *Schistosoma mansoni* calreticulina Sm58. *Parasitology*, 108, 527-532, 1994.
- KISHORE, U.; SONTHEIMER, R.D.; SASTRY, K.N.; ZANER, K.S. ZAPPI, E.G.; HUGHES, G.R.V.; KHAMASHTA, M.A. STRONG, P.; REID, K.B.M. & EGGLETON, P. Release of calreticulin from neutrophils may alter C1q-mediated immune functions. *Biochemical Journal*, 322, 543-550, 1997.
- KENNEDY, N.J.; SPITHILL, T.W.; TENNENT, J.; WOOD, P.R.; PIEDRAFITA, D. DNA vaccines in sheep: CTLA-4 mediated targeting and CpG motifs enhance immunogenicity in a DNA prime/protein boost strategy. *Vaccine*, 24(7):970-9, 2006.
- KIMURA, T.; IMAISHI, K.; HAGIWARA, Y.; HORIBE, T.; HAYANO, T.; TAKAHASHI, N.; URADE, R.; KATO & KIKUCHI, M. ERp57 binds competitively to protein disulfide isomerase and calreticulina. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331: 224–230, 2005.
- KOCAN, K.M. Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle. *Veterinary Parasitology*, 57: 121-151, 1995.
- KOVACS, H.; CAMPBELL, I.D.; STRONG, P.; JOHNSON, S.; WARD, F.J.; REID, K.B.M. & EGGLETON, P. Evidence that C1q binds specifically to C<sub>H</sub>2-like immunoglobulin  $\gamma$  motifs present in the autoantigen calreticulina and interferes with complement activation. *Biochemistry*, 37, 17865-17874, 1998.



- KUMAR, S.; TAMURA, K. & NEI, M. MEGA 3.1: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163, 2004.
- KUWABARA, K.; PINSKY, D.J.; SCHMIDT, A.M.; BENEDICT, C.; BRETT, J.; OGAWA, S.; BROEKMAN, M.J.; MARCUS, A.J.; SCIACCA, R.R.; MICHALAK, M.; WANG, F.; PAN, Y.C.; GRUNFELD, S.; PATTON, S.; MALINSKI, T.; STERN, D.M. & RYAN, J. Calreticulin, an Antithrombotic Agent Which Binds to Vitamin K-dependent Coagulation Factors, Stimulates Endothelial Nitric Oxide Production, and Limits Thrombosis in Canine Coronary Arteries. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 14, 8179-8187, 1995.
- KRAUSE, K.H. & MICHALAK, M. Calreticulin. *Cell*, 88(4):439-43, 1997.
- LAWRIE, C.H.; SIM, R.B. & NUTTALL, P.A. Investigation of the mechanisms of anti-complement activity in *Ixodes ricinus* ticks. *Molecular Immunology*, 42(1):31-38, 2005.
- LEAL, A.T., SEIXAS A., POHL, P.C.; FERREIRA, C.A.S.; LOGULLO, C., OLIVEIRA, P.L.; FARIAS, S.E.; TERMIGNONI, C., DA SILVA VAZ JR, I.; MASUDA, A. Vaccination of bovines with recombinant Boophilus Yolk pro-Cathepsin. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2006), doi:10.1016/j.vetimm.2006.08.011.
- LOGULLO, C.; DA SILVA VAZ JR., I.; SORGINE, M.H.F.; PAIVA-SILVA, G.O.; FARIA, F.S.; ZINGALI, R.; ROSA DE LIMA, M.; ABREU, L.; OLIVEIRA, E.F.; ALVES, E.W.; MASUDA, H.; GONZALES, J.C.; MASUDA, A. & OLIVEIRA, P.L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 116: 525-532, 1998.
- LOGULLO, C.; MORAES, J.; DANSA-PETRETSK, I.M.; DA SILVA VAZ, I.; MASUDA, A.; SORGINE, M.H.; BRAZ, G.R.; MASUDA, H. & OLIVEIRA, P.L. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1805-11, 2002.
- MARTINS, J.R. & FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *The Veterinary Record*, 149 (2): 64, 2001.

- McCOSKER, P. L. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M. & KREIR, J. P. (Eds.) *Babesiosis*. New York: Academic Press, 1981.
- MICHALAK, M.; CORBET, E.F.; MESAELI, N.; NAKAMURA, K. & OPAS, M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochemical Journal*, 344: 281-292, 1999.
- MUKAI, L.S.; CASTRO NETTO, A.; SZABÓ, M.P.J. & BECHARA, G.H. Hypersensitivity Induced in Dogs by Nymphal Extract of *Amblyomma cajennense* Ticks (Acari: Ixodidae). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969:184-6, 2002.
- MULENGA, A.; SUGIMOTO, C.; SAKO, Y.; OHASHI, K.; MUSOKE, A.; MOZARIA, S. & ONUMA, M. Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infection and Immunity*, 67: 1652–1658, 1999.
- NICHOLAS, K.B. & NICHOLAS, H. B.JR. GeneDoc version 2.6.003: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments, 2006.
- NORTON, G.A.; SUTHERST, R.W. & MAYWALD, G.F. A framework for integrating control methods against the cattle tick, *Boophilus microplus*, in Australia. *Journal of Applied Ecology*, 20: 489-505, 1983.
- NUTTALL, P.A. & LABUDA, M. Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, 129: S177–S189, 2004.
- O'NEILL, G.M.; DONOVAN, G.R. & BALDO, B.A. Cloning and characterization of a major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1219: 521-528, 1994.
- ONUUMA M, KAKUDA T, SUGIMOTO C. Theileria parasite infection in East Asia and control of the disease. *Comp Immunology Microbiology Infectuos Diseases*, 21(3): 165–177, 1998.
- OSTWALD, T.J. & MACLENNAN, D.H. Effects of Cation Binding on the Conformation of Calsequestrin and the High Affinity Calcium binding Protein of Sarcoplasmic Reticulum. *The Journal Op Biological Chemistry*, 249(18): 5867-5871, 1974.
- PAINE, S.H.; KEMP, D.H. & ALLEN, J.R. In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles) effects of histamine and other mediators. *Parasitology*, 86(Pt3): 419-428, 1983.

- PIKE, S.E.; YAO, L.; SETSUDA, J.; JONES, K.D. CHERNEY, B.; APPELLA, E.; SAKAGUSHI, K.; NAKASHI, H.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WIRTH, P.; GUPTA, G. & TOSATO, G. Vasostatin, a calreticulina fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Journal of Experimental Medicine*, 188: 2349-2356, 1998.
- PIKE, S.E.; YAO, L.; SETSUDA, J.; JONES, K.D. CHERNEY, B.; APPELLA, E.; SAKAGUSHI, K.; NAKASHI, H.; ATREYA, C.D.; TERIYA-FELDSTEIN, J.; WIRTH, P.; GUPTA, G. & TOSATO, G. Calreticulin and calreticulina fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. *Blood*, 94: 2461-2468, 1999.
- PRITCHARD, D.I.; BROWN, A.; KARSPER, G.; MCELROY, P.; LOUKAS, A.; HEWITT, C.; BERRY, C.; FULLKRUG, R.; & BECK, E. A hookworm allergen which strongly resembles calreticulin. *Parasite Immunology*, 21, 439-450, 1999.
- PRUETT, J.H. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. *International Journal for Parasitology*, 29: 25-32, 1999.
- REED, S.G. & CAMPOS-NETO, A. Vaccines for parasitic and bacterial diseases. *Current Opinion in Immunology*, 15(4): 456-60, 2003.
- RIBEIRO, J.M.C. Role saliva in tick/host interactions. *Experimental and Applied Acarology*, 7: 15-20, 1989.
- RIDING, G.A.; JARMEY, J.; MAKENNA, R.V.; PEARSON, R.; COBON, G.S. & WILLADSEN, P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *Journal of Immunology*, 153: 5158-5166, 1994.
- ROBERTS, J. A. & KERR, J. D. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. *Journal of Parasitology*, 62: 485-488, 1976.
- ROSA DE LIMA, M.F.; FERREIRA, C.A.S.; FREITAS, D.R.J.; VALENZUELA, J.G. & MASUDA, A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 747-754, 2002.
- RODRIGUEZ, M.; PENICHER, M.L.; MOURIS, A.E.; LABARTA, V.; LORENZO LUACES, L.; RUBIERA, R.; CORDOVÉS, C.; SÁNCHEZ, P.A.; RAMOS, E.; SOTO, A.; CANALES, M.; PALENZUELA, D.; TRIGUERO, A.; LLEONART, R.; HERRERA, L. & DE LA FUENTE, J. Control of *Boophilus microplus* population in

- grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Veterinary Parasitology*, 57: 339-349, 1995.
- RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I., RODRÍGUEZ-AREVALO, F.; ALONSO-DÍAZ, M.A.; FRAGOSO-SANCHEZ, H.; SANTAMARIA, V.M. & ROSARIO-CRUZ, R. Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, México. *Preventive Veterinary Medicine*, 75: 280–286, 2006.
- RUIZ, L.M.; ARMENGOLA, G.; HABEYCHA, E.; ORDUZ, S. A theoretical analysis of codon adaptation index of the *Boophilus microplus* bm86 gene directed to the optimization of a DNA vaccine. *Journal of Theoretical Biology*, 239: 445–449, 2006.
- SABATINI, G.A.; KEMP, D.H.; HUGHES, S.; NARI, A. & HANSEN, J. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 95:53-62, 2001.
- SAMISH, M.; GINSBERG, H. & GLAZER, I. Biological control of ticks. *Parasitology*, 129: S389–S403, 2004.
- SAMISH, M. & GLAZER, I. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends in Parasitology*, 17: 368-371, 2001.
- SANDERS, M.L.; JAWORSKI, D.C.; SANCHEZ, J.L.; DEFRAITES, R.F.; GLASS, G.E.; SCOTT, A.L.; RAHA, S.; RITCHIE, B.C.; NEEDHAM, G.R. & SCHWARTZ, B.S. Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59: 279-285, 1998.
- SANDERS, M.L.; GLASS, G.E.; NADELMAN, R.B.; WORMSER, G.P.; SCOTT, A.L.; RAHA, S.; RITCHIE, B.C.; JAWORSKI, D.C. & SCHWARTZ, B.S. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* (Say) and are correlated with tick engorgement indices. *American Journal of Epidemiology*, 149: 777-784, 1999.
- SÁNCHEZ, D.; TUCKOVÁ, L.; MOTHEŠ, T.; KREISEL, W.; BENES, Z. & TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H. Epitopes of calreticulin recognised by IgA

- autoantibodies from patients with hepatic and coeliac disease. *Journal of Autoimmunity*, 21: 383–392, 2003.
- SEDDON, H.R. Arthropod Infestations, Ticks and Mites. In: ALBISTON, H.E. *Diseases of Domestic Animals in Australia*. Commonwealth of Australia, Dept. Health, Canberra, 1967.
- SEIFERT, G.W.; SPRINGELL, P.H. & TATCHELL R.J. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*, 58: 415-430, 1968.
- SEIXAS, A.; DOS SANTOS, P.C.; VELLOSO, F.F.; DA SILVA VAZ JR., I.; MASUDA, A.; HORN, F. & TERMIGNONI, C. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*, 126: 155-163, 2003.
- SMOOKER P.M.; RAINCZUK, A.; KENNEDY, Y.N. & SPITHILL, T.W. DNA vaccines and their application against parasites – promise, limitations and potential solutions. *Biotechnology Annual Review*, 10:189-236, 2004.
- SONENSHINE, D.E. Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. *Parasitology*, 129: S405–S425, 2004.
- SUCHITRA, S. & JOSHI, P. Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1722: 293– 303, 2005.
- SUTHERST, R.W. & BOURNE, A.S. The effect of desiccation and low temperature on the viability of eggs and emerging larvae of the tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Ixodidae). *International Journal for Parasitology*, 36: 193–200, 2006.
- SUTHERST, R.W.; JONES, R.J. & SCHNITZERLING, H.J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. *Nature*, 295: 320-321, 1982.
- SUTHERST, R.W.; MAYWALD, G.F.; KERR, J.D. & SIEGEMAN, D.A. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34: 317-327, 1983.

- SZABÓ, M. P. J.; MORELLI JR, J. & BECHARA, G. H. Cutaneous hypersensitivity induced in dogs and guinea-pigs by extracts of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 19(12), 723-730, 1995.
- TAN, Y.; CHENA, M.; LI, Z.; MABUCHI, K.; BOUVIER, M. The calcium- and zinc-responsive regions of calreticulin reside strictly in the N-/C-domain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760(5):745-53, 2006.
- TELLAM, R.L.; KEMP, D.; RIDING, G.; BRISCOE, S.; SMITH, D.; SHARP, P.; IRVING, D. & WILLADSEN, P. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Veterinary Parasitology*, 103: 141-156, 2002.
- TRIMNELL, A.R.; DAVIES, G.M.; LISSINA, O.; HAILS, R.S.; NUTTALL, P.A. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*, 23: 4329–4341, 2005.
- ULLMANN, A. J.; LIMA, C. M. R.; GUERRERO, F. D.; PIESMAN, J. & BLACK, W. C. Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* and the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Molecular Biology* 14(2): 217–222, 2005.
- URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M. & JENNINGS, F.W. *Parasitologia Veterinária*. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- VALENZUELA, J.G. Exploring tick saliva: from biochemistry to ‘sialomes’ and functional genomics. *Parasitology*, 129: S83–S94, 2004.
- ZHIOUA, E.; BROWNING, M.; JOHNSON, P.W.; GINSBERG, H.S. & LEBRUN, R.A. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal for Parasitology*, 83: 815-818, 1997.
- YOUNG, A.S. & MORZARIA, S.P. Biology of *Babesia*. *Parasitology Today*, 2: 211-219, 1986.
- YU, D.; LIANG, J.; YU, H.; WU, H.; XU, C.; LIU, J. & LAI, R. A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, *Hyalomma asiaticum asiaticum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343: 585–590, 2006.

- WAGLAND, B.M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animals. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 401-409, 1978.
- WANG, H. & NUTTALL, P.A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology*, 109: 525–530, 1994.
- WANG, H. & NUTTALL, P.A. Immunoglobulinbinding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56: 286–295, 1999.
- WEI, S.H.; CLARK, A.G.; SYVANEN, M. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticideresistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 1145–1153, 2001.
- WHARTON, R.H. & NORRIS, K.R. Control of Parasitic Arthropods. *Veterinary Parasitology*, 6: 135-164, 1980.
- WIKEL, S.K. & BERGMAN, D. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*, 13: 383-389, 1997.
- WIKEL, S.K. Tick Modulation of Host Cytokines. *Experimental Parasitology*, 84: 304-309, 1996.
- WIKEL, S.K. & ALLEN, J.R. Acquired resistance to ticks. I. Passive transfer of resistance. *Immunology*, 30: 311–316, 1976.
- WIKEL, S.K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *International Journal for Parasitology*, 29: 851-859, 1999.
- WILLADSEN, P; WILLIAMS, P.G.; ROBERTS, J.A. & KERR, J.D. Responses of cattle to allergens from *Boophilus microplus*. *International Journal for Parasitology*, 8(2):89-95, 1978.
- WILLADSEN, P. Immunological approaches to the control of ticks. *International Journal for Parasitology*, 17: 671-677, 1987.

- WILLADSEN, P.; MCKENNA, R.V. & RIDING, G.A. Isolation from the cattle tick, *B. microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *International Journal for Parasitology*, 18: 183–189, 1988.
- WILLADSEN, P.; COBON, G. & MCKENNA, R.V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunology*, 18: 241-246, 1996.
- WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. *Parasitology*, 129: S367–S387, 2004.
- WILLADSEN, P. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2): 161-168, 2006.