

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

PROTEÇÃO CRUZADA CONTRA A INFESTAÇÃO DE *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* EM BOVINOS VACINADOS COM A GLUTATIONA-S-
TRANSFERASE RECOMBINANTE DE *Haemaphysalis longicornis*

LUÍS FERNANDO PARIZI

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**PROTEÇÃO CRUZADA CONTRA A INFESTAÇÃO DE *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* EM BOVINOS VACINADOS COM A GLUTATIONA-S-
TRANSFERASE RECOMBINANTE DE *Haemaphysalis longicornis***

LUÍS FERNANDO PARIZI

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da UFRGS como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr.

Co-orientadora: Dra. Aoi Masuda

Porto Alegre, Fevereiro de 2010

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Instituição:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Centro de Biotecnologia, Brasil.

Fontes Financiadoras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Brasil.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brasil.

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Entomologia Molecular (INCT-EM),
Brasil.

DEDICATÓRIA

Alberto Caeiro

Acho tão Natural que não se Pense

*Acho tão natural que não se pense
Que me ponho a rir às vezes, sozinho,
Não sei bem de quê, mas é de qualquer coisa
Que tem que ver com haver gente que pensa...*

*Que pensará o meu muro da minha sombra?
Pergunto-me às vezes isto até dar por mim
A perguntar-me cousas...
E então desagrado-me, e incomodo-me
Como se desse por mim com um pé dormente...*

*Que pensará isto de aquilo?
Nada pensa nada.
Terá a terra consciência das pedras e plantas que tem?
Se ela a tiver, que a tenha...
Que me importa isso a mim?
Se eu pensasse nessas cousas,
Deixaria de ver as árvores e as plantas
E deixava de ver a Terra,
Para ver só os meus pensamentos...
Entristecia e ficava às escuras.
E assim, sem pensar tenho a Terra e o Céu.*

Dedico esse trabalho aos bons professores que tive ao longo dos anos.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Aoi Masuda, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr., pela orientação e confiança.

À Dra. Sandra Estrazulas Farias, pela colaboração e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, pela contribuição na dissertação.

À minha comissão de acompanhamento, Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira e Dr. Carlos Termignoni, pela atenção e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas, funcionários e professores do Centro de Biotecnologia.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aos órgãos de fomento.

A todos do Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal e do Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas que me ajudaram no desenvolvimento dos trabalhos, em especial a Melina Garcia Guizzo, Daiane Patrícia Oldiges, Aline Domingues Schuler e Andressa Varella Gonsiorosk, pelas inúmeras vezes que me auxiliaram.

Ao Dr. Alexandre Trindade Leal e ao MSc. Herbert Rech pelo apoio e amizade durante os primeiros anos no laboratório.

Aos colegas José Reck Júnior e Paula Cristiane Pohl pelos conselhos, pelo incentivo e, principalmente, pela amizade.

À minha família pelo carinho e apoio; agradeço principalmente aos meus pais, por tudo o que já me ensinaram e apoiaram.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	10
1.2 Ciclo de vida.....	11
1.3 Métodos de controle	12
1.3.1 Controle químico	12
1.3.2 Controle biológico	13
1.3.3 Controle imunológico.....	15
1.4 A proteína glutationa-S-transferase.....	21
1.4.1 GSTs em vacinas	23
1.4.2 GSTs de carrapatos.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 RESULTADOS	28
4 DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
BmTIs	Inibidores de serinoproteases de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
BSA	Albumina sérica bovina
BYC	Pró-catepsina do ovo de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
cDNA	DNA complementar ao RNA
EC	Número da comissão de enzimas
ELISA	Ensaio imunoabsorvente de ligação enzimática
GSH	Glutaciona
GST	Glutaciona-S-transferase
GST-Bm	Glutaciona-S-transferase de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
GST-HI	Glutaciona-S-transferase de <i>Haemaphysalis longicornis</i>
GSTs	Glutaciona-S-transferases
IgG	Imunoglobulina G
MW	Massa molecular
NBT	Tetrazólio nitroazul
O.D.	Densidade optica
OPD	Orto-fenilenodiamino
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
rGST-Bm	Glutaciona-S-transferase recombinante de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
rGST-HI	Glutaciona-S-transferase recombinante de <i>Haemaphysalis longicornis</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecilsulfato de sódio
THAP	Aspártico proteinase ligadora de heme do carrapato
VTDCE	Cisteino endopeptidase degradadora de vitelina

RESUMO

Os carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Haemaphysalis longicornis* são ectoparasitas hematófagos que infestam bovinos. O uso de vacinas anti-carrapato tem mostrado ser uma estratégia alternativa promissora para o controle desses parasitos. As glutationa-S-transferases (GSTs) pertencem a uma família de enzimas multifuncionais presentes em organismos animais e vegetais, e, entre suas funções, pode-se destacar o transporte intracelular, a participação em processos digestivos, a síntese de prostaglandinas, a detoxificação de substâncias tóxicas e a proteção contra o estresse oxidativo. Em trabalhos anteriores, verificou-se em camundongos que a GST de *H. longicornis* (rGST-HI) é mais imunogênica que a GST de *R. microplus* (rGST-Bm). O objetivo do presente estudo foi investigar a proteção cruzada conferida pela imunização de bovinos com a rGST-HI frente a uma infestação de *R. microplus*. Por *Western blot*, verificou-se que os bovinos vacinados com a rGST-HI apresentaram um aumento nos níveis de anticorpos anti-rGST-HI, os quais foram capazes de reconhecer a GST-Bm nativa de extratos de larva, ovário e glândula salivar. Posteriormente, os bovinos foram infestados com 20.000 larvas de *R. microplus*. O percentual de proteção conferido foi calculado em função da variação entre os grupos tratados e controle, em relação ao número e peso de carrapatos que terminaram a alimentação, a capacidade de postura e a fertilidade dos ovos. O grupo dos bovinos vacinados com rGST-HI mostrou uma redução de 53% e 52% no número e no peso de teleóginas, respectivamente. A postura de ovos e a eclodibilidade apresentaram uma redução no grupo vacinado de 0,6% e 8%, respectivamente. A eficácia total contra a infestação de *R. microplus* foi de 57%, quando comparado ao grupo controle.

Palavras-chave: Vacina; *Rhipicephalus microplus*; *Haemaphysalis longicornis*; Vacinação; Glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18); Carrapato.

ABSTRACT

The ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemaphysalis longicornis* are hematophagous ectoparasites that infest bovines. Vaccine has been considered one of the most promising methods for the control of these parasites. Glutathione S-transferases (GSTs) enzymes are present in animal and vegetal organisms and are important in intracellular transport, digestive process, synthesis of prostaglandins, detoxification and protection against oxidative stress. In a previous study with mice we showed that *H. longicornis* GST (rGST-HI) is more immunogenic than *R. microplus* GST (rGST-Bm). The objective of the present study was to investigate the cross-protection against *R. microplus* infestation in bovine vaccinated with rGST-HI. By Western blot, the immunized bovines showed an increase in antibodies anti-rGST-HI. The native GST-Bm in larvae, ovary and salivary gland were recognized by sera of bovines immunized with rGST-HI, indicating that the antibodies induced by rGST-HI immunization recognize native *R. microplus* GSTs. The bovines were challenged with 20,000 larvae of *R. microplus*. Protection was calculated by variation in number and weight of fully engorged ticks, egg laying capacity and egg fertility. The bovines vaccinated with rGST-HI showed a reduction of 53% and 52% in number and weight of engorged ticks, respectively. Egg laying capacity and egg fertility of ticks from vaccinated bovines were respectively 0.6% and 8% lower, as compared to ticks from control animals. The overall efficacy ratio against *R. microplus* was 57.03%, as compared with the control group.

Keywords: Vaccine; *Rhipicephalus microplus*; *Haemaphysalis longicornis*; Vaccination; Glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18); Tick.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, anteriormente denominado como *Boophilus microplus*, foi reclassificado em 2003 (MURRELL & BARKER, 2003) com base em análises moleculares e morfológicas como pertencente ao gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*. Portanto, ao longo do texto, será utilizada a nomenclatura de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para esse carrapato.

O *R. microplus* pertence ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acarina, subordem Ixodida e família Ixodidae, conhecida como família dos carrapatos duros. Os membros da ordem Acarina, diferentemente de outros aracnídeos, não possuem o corpo segmentado, apresentam peças bucais modificadas e o estágio de larva tem três pares de patas, enquanto os estádios de ninfa e adulto têm quatro pares de patas (URQUHART *et al.*, 1998). O parasitismo desse carrapato é monoxênico, ou seja, a sua alimentação ocorre em apenas um hospedeiro em todo o seu ciclo de vida (SONENSHINE, 1991). O principal hospedeiro do *R. microplus* é o bovino, embora possa parasitar com menor eficiência outros animais, como os ovinos, os equídeos e os cervídeos (GONZALES, 1995).

O *R. microplus* é um dos principais parasitos que afetam economicamente a pecuária bovina (JONSSON, 2006), estando localizado entre os paralelos 32°N e 32°S, abrangendo os rebanhos da América, África, Ásia e Oceania (JOHNSTON *et al.*, 1986). O parasitismo por esse carrapato acarreta 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 da transmissão de protozoários do gênero *Babesia* e da riquetsia *Anaplasma marginale* (MCCOSKER,

1981; YOUNG & MORZARIA, 1986). Além disso, existem os prejuízos relacionados à mão-de-obra necessária para o controle desse parasito, despesas com instalações, compra de acaricidas e equipamentos adequados para a sua aplicação, entre outros (JAMROZ *et al.*, 2000). Em 2008, o Brasil possuía um rebanho de bovinos de aproximadamente 202 milhões de cabeças (o maior rebanho comercial do mundo) e produziu nesse mesmo ano cerca de 27 bilhões de litros de leite (IBGE, 2008). Estima-se que, anualmente, as perdas decorrentes da infestação pelo *R. microplus* superem a 1 bilhão de dólares americanos no Brasil (GRISI *et al.*, 2002).

1.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida do *R. microplus* está dividido em uma fase de vida livre e outra fase de vida parasitária. As fêmeas completamente ingurgitadas (teleóginas), ao terminarem a sua alimentação no hospedeiro, caem ao solo, dando início à fase de vida livre, que irá variar em duração dependendo das condições climáticas, como 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 (ROCHA, 1998), podendo se estender por muitos dias em épocas de frio. A ovoposição pode chegar a 3.000 ovos por teleógina, em temperatura de 27 °C e umidade superior a 70%, que são condições ideais para o desenvolvimento do *R. microplus* (GONZALES, 1995). Nessas 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 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). Na fase adulta, ocorre a cópula e as fêmeas passam a se alimentar de sangue, até alcançarem seu ingurgitamento total e caírem ao solo. Os machos (menores que as fêmeas) permanecem no hospedeiro procurando novas fêmeas, sendo capazes de sobreviver até duas vezes mais tempo que elas (ROBERTS, 1968).

1.3 Métodos de controle

1.3.1 Controle químico

Atualmente, o método de controle mais eficiente para o carrapato *R. microplus* é o controle químico através principalmente do uso de acaricidas. Os compostos químicos, se usados corretamente, são economicamente viáveis e eficazes; no entanto, com frequência não são usados corretamente, ocasionando a seleção de populações de carrapatos resistentes aos princípios ativos utilizados (WILLADSEN, 2006). Devido ao menor período de tempo entre as gerações, o *R. microplus* pode desenvolver resistência aos compostos químicos mais rapidamente que os outros carrapatos (KOCAN, 1995). Esse método de controle apresenta ainda outras desvantagens, como os problemas criados pela contaminação da carne, leite e do meio ambiente (DAVEY & GEORGE, 1998). Diferentes compostos já foram utilizados como pesticidas, como os arsenicais, os organoclorados, os organofosforados, os carbamatos, os fenilpirazóis, as formamidinas,

os piretróides, as lactonas macrocíclicas e as fenil uréias (GEORGE *et al.*, 2004). Os três grupos químicos mais utilizados recentemente no controle do carrapato que se encontram disponíveis hoje no mercado são as formamidinas, os piretróides, fenil uréias, fenilpirazóis e as avermectinas. Também os organofosforados e suas associações, especialmente com piretróides. LI *et al.* (2005) mostraram que o uso de ivermectina e moxidectina de forma subcutânea foi capaz de controlar uma infestação experimental de *R. microplus* em 94,8% e 91%, respectivamente.

Uma série de compostos como as avermectinas, que tiveram seu uso intensificado no Brasil a partir da década de 90 (MARTINS & FURLONG, 2001), o amitraz (DUCORNEZ *et al.*, 2005), os organofosforados (PRUETT & POUND, 2006) e os piretróides (RODRIGUEZ-VIVAS *et al.*, 2006) têm se mostrado já ineficientes contra populações isoladas de *R. microplus*. O inibidor de desenvolvimento fluazuron é ainda relativamente novo no mercado, e têm sido utilizados numa tentativa de evitar essa resistência (SABATINI *et al.*, 2001; GEORGE *et al.*, 2004).

1.3.2 Controle biológico

O controle biológico é uma estratégia que se utiliza das interações entre o carrapato e o meio onde ele se encontra, das interações entre o carrapato e seus predadores naturais, e da utilização de compostos naturais para seu controle. As principais formas de controle biológico estão apresentadas a seguir.

As condições climáticas como temperatura e umidade no campo desempenham papel importante no equilíbrio das populações de carrapatos, diminuindo os índices de infestação nos bovinos (GONZALES, 1995). SUTHERST & BOURNE (2006) demonstraram que ovos de *R. microplus* submetidos a baixas temperaturas e umidade

tiveram diminuídos os índices de fertilidade e, conseqüentemente, o número de larvas viáveis.

O tipo de vegetação é outro fator capaz 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. 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).

A seleção de raças bovinas menos sensíveis ao carrapato ou a presença de predadores naturais podem reduzir a infestação pelo *R. microplus*. A garça vaqueira *Egretta ibis* (ALVES-BRANCO *et al.*, 1983), o vira-bosta (*Molotrus bonariensis*), o quero-quero (*Vanellus chilensis*) e as formigas carnívoras (GONZALES, 1995) são exemplos de predadores naturais. Pode-se ainda recorrer à utilização de espécies parasitas como as bactérias *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans*, que são normalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato (BRUM, 1988), ou como os nematódeos, que têm se mostrado eficientes no controle biológico de insetos (SAMISH & GLAZER, 2001). Fungos, como o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, também têm sido estudados como ferramentas de controle de diferentes espécies de carrapato (ZHIOUA *et al.*, 1997; FRAZZON *et al.*, 2000; BASSO *et al.*, 2005). Outra estratégia envolvendo controle biológico seria a utilização de ferormônios (SONENSHINE, 2004).

1.3.3 Controle imunológico

Em consequência das desvantagens do uso dos pesticidas químicos, o controle do parasitismo do carrapato através de uma metodologia imunológica já é estudado há mais de 40 anos por diferentes grupos de pesquisa (ROBERTS, 1968; WAGLAND, 1975; MCGOWAN *et al.*, 1980; WILLADSEN & KEMP, 1988; DA SILVA, JR. *et al.*, 1998; WILLADSEN, 2001). Entre as vantagens do uso de vacinas estão a maior segurança contra o risco de contaminações, tanto para o aplicador como para o consumidor, e a ausência do período de carência após a aplicação, constituindo-se em fator de importância fundamental na pecuária de leite.

Os carrapatos necessitam, para completarem a sua alimentação sanguínea, permanecerem fixados desde poucos minutos até vários dias nos seus hospedeiros. Portanto, é provável que as diferentes estratégias de alimentação desses parasitas influenciem o tipo de resposta imune gerada pelos hospedeiros. Embora diferentes estratégias tenham evoluído nos hospedeiros, os carrapatos precisam contrapor o sistema imune inato (inflamação) durante a primeira infestação, e o sistema imune inato e adquirido durante as infestações subsequentes (FRANCISCHETTI *et al.*, 2009). A resistência adquirida mediada imunologicamente (ALLEN, 1989) pode ser aferida pela redução no número de carrapatos que se fixam ao hospedeiro, pela diminuição no peso das teleóginas e pela redução da produção de ovos e, conseqüentemente, de larvas (WIKEL & BERGMAN, 1997; FRANCISCHETTI *et al.*, 2009). Animais naturalmente resistentes conseguem rejeitar de 80% a 99% das larvas (TATCHELL, 1987; ALLEN, 1994). Essas observações constituem a base dos trabalhos para justificar o controle do carrapato por meio de vacinas.

As respostas imunológicas inata e adquirida são observadas em bovinos infestados pelo carrapato através da ação de anticorpos, pelo sistema complemento ou reações de hipersensibilidade (WIKEL, 1988; VALENZUELA, 2004) e envolvem linfócitos B e T, células apresentadoras de antígenos, citocinas e granulócitos, entre outras células e moléculas (WIKEL, 1996). ROBERTS & KERR (1976) demonstraram a possibilidade da transferência passiva de imunidade, apesar de limitada, 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 imune 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 elucidada qual a importância de cada tipo de resposta (celular ou humoral) para a proteção contra o carrapato (WIKEL & BERGMAN, 1997; WILLADSEN, 2004; RUIZ *et al.*, 2006).

Entre os mecanismos de contraposição às defesas imunológicas dos hospedeiros já identificados em diferentes espécies de carrapatos encontram-se os fatores de imunossupressão, inibidores do sistema complemento, da citotoxicidade e da resposta inflamatória e a competição antigênica (BARRIGA, 1999). Além disso, já foram encontradas na saliva dos carrapatos moléculas com atividades anti-hemostáticas, vasodilatadoras, antiinflamatórias e imunomoduladoras (RIBEIRO, 1989; NUTTALL & LABUDA, 2004). Esta eficiência em evitar os mecanismos de proteção dos hospedeiros desenvolveu-se gradualmente durante o longo tempo em que ocorreu a co-evolução dos parasitos e seus hospedeiros. A resposta imune do hospedeiro e os mecanismos de

escape do parasito estão em um equilíbrio extremamente refinado que permite à sobrevivência de ambas as espécies.

Um resultado importante para a demonstração da viabilidade do uso de uma vacina contra o carrapato foi a constatação de que anticorpos funcionais, presentes no sangue de bovinos imunizados, também são encontrados na hemolinfa dos carrapatos alimentados nesses bovinos (DA SILVA VAZ JR. *et al.*, 1996). Entretanto, para o desenvolvimento de uma vacina, a pesquisa de antígenos com potencial protetor ainda constitui um grande desafio (WILLADSEN & KEMP, 1988), sendo o objeto de estudo de vários grupos de pesquisa.

Dois tipos de antígenos candidatos para vacina são identificáveis: os antígenos naturalmente expostos ao sistema imune do hospedeiro durante a fase parasitária, como proteínas e peptídeos secretados pela glândula salivar, e os antígenos ocultos, também conhecidos como "*concealed antigens*", que não entram em contato com o sistema imune do hospedeiro (NUTTALL *et al.*, 2006). Por não entrarem em contato com o sistema imunológico do hospedeiro, os antígenos ocultos não induzem uma resposta imune durante o parasitismo. Entretanto, uma vez que o hospedeiro seja imunizado artificialmente com um destes antígenos, anticorpos e outros elementos do sistema imune, se ingeridos pelo parasito, poderão interagir com o antígeno oculto utilizado na imunização, podendo interferir nas funções deste. A vantagem estratégica do uso de vacinas com antígenos ocultos é a de evitar os principais mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, como inibidores do sistema complemento, da resposta inflamatória, da proliferação de linfócitos T e da produção de citocinas e histamina (BARRIGA, 1999). No entanto, uma implicação negativa do uso de antígenos ocultos é que a resposta imunológica dos animais tratados não é continuamente estimulada contra

essas proteínas através da infestação natural, necessitando a revacinação para manutenção da proteção (WILLADSEN, 2004).

No momento, existem duas vacinas disponíveis comercialmente que controlam parcialmente o *R. microplus*. Ambas são baseadas na proteína Bm86, identificada através de testes de vacinação e purificada a partir de extrato de intestino de fêmeas do carrapato. A eficácia das vacinas disponíveis, que usam a Bm86 recombinante produzida em bactérias e leveduras, varia entre 51% e 91%, dependendo das características da população de carrapato e da condição nutricional dos bovinos utilizados no teste (RODRIGUEZ *et al.*, 1995; PATARROYO *et al.*, 2002). Foi sugerido que a variação de eficácia observada entre diferentes regiões do mundo seja decorrente de variações na sequência da Bm86 entre diferentes cepas (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2000). Análises de populações de carrapatos da Argentina mostraram polimorfismos no gene da Bm86 que resultam em uma proteína solúvel, em vez da proteína de membrana detectada em carrapatos da Austrália e de Cuba, tornando estes carrapatos resistentes ao efeito da vacinação. Para contornar essa resistência, uma nova vacina recombinante foi produzida baseada no gene da Bm95 (homólogo ao da Bm86). Esta vacina mostrou-se eficaz para proteger os bovinos de infestações, tanto de carrapatos da Argentina como de Cuba (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2000). A partir de análise da Bm86 e da avaliação de algumas propriedades da proteína, como potencial hidrofóbico e hidrofílico, foram desenvolvidos peptídeos sintéticos derivados dessa glicoproteína. Estes peptídeos, usados como antígenos vacinais em bovinos, apresentaram uma eficácia entre 35% e 81% (PATARROYO *et al.*, 2002).

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, faz-se necessária a busca de novos antígenos

imunoprotetores para melhorar a eficiência do controle imunológico. Para o desenvolvimento racional de vacinas necessita-se de uma forma para ensaiar e priorizar a escolha de antígenos dentro de uma pletora de candidatos. Uma seleção racional de antígenos poderá ser obtida através do estudo de aspectos metabólicos do carrapato, de como este carrapato sobrevive ao estresse oxidativo gerado pela ingestão de grandes quantidades de sangue, do processo de digestão do sangue ingerido e dos mecanismos que o carrapato possui para se contrapor às defesas hemostáticas do hospedeiro e de suas defesas imunológicas. Portanto, a pesquisa de moléculas com funções importantes nestas vias é uma estratégia interessante para identificar potenciais candidatos para compor uma vacina.

Além dos antígenos que compõem as vacinas comercialmente disponíveis, outras proteínas que também conferem algum grau de proteção ou induzem a produção de anticorpos que interferem no sucesso reprodutivo do carrapato têm sido descritas. A inoculação de bovinos com a BYC (*Boophilus Yolk pro-Cathepsin*), uma aspártico-protease isolada de ovos embrionados do *R. microplus* (LOGULLO *et al.*, 1998), foi capaz de induzir uma resposta imune protetora contra infestações de *R. microplus* (DA SILVA VAZ JR. *et al.*, 1998). Os efeitos protetores foram observados pela redução no número de teleóginas, capacidade de postura e fertilidade dos ovos, com eficácia variando entre 14% e 36%. Também se observou que a imunização de bovinos com a BYC recombinante apresentou um grau de proteção semelhante ao da proteína nativa e aparentemente os níveis de anticorpos específicos parecem ter relação ao grau de proteção (LEAL *et al.*, 2006).

A VTDCE é uma cisteíno-endopeptidase degradadora de vitelina, purificada e caracterizada a partir de ovos de *R. microplus* (SEIXAS *et al.*, 2003). Experimentos de imunização de bovinos com a VTDCE demonstraram a imunogenicidade dessa

proteína. A produção de anticorpos específicos pelos animais aumentou gradualmente em resposta às imunizações com VTDCE purificada de ovos. Esses bovinos foram desafiados com larvas de *R. microplus* e apresentaram um índice de proteção global de 21%, ocorrendo uma redução de 18% no peso e na fertilidade dos ovos de fêmeas alimentadas nos bovinos imunizados com a VTDCE (SEIXAS *et al.*, 2008). Da mesma forma que a BYC, o envolvimento durante a embriogênese associado à capacidade imunogênica faz da VTDCE um antígeno em potencial para compor uma vacina contra o *R. microplus* (SEIXAS *et al.*, 2003).

Boophilus microplus trypsin inhibitors (BmTIs) foram detectados em diferentes fases de desenvolvimento do *R. microplus*, indicando um possível papel na interação parasito-hospedeiro. Os BmTIs foram usados como antígenos em uma emulsão utilizando-se o adjuvante completo de Freund, para a imunização de bovinos que foram posteriormente desafiados com larvas do carrapato *R. microplus*. Os níveis de IgG tiveram seu pico 40 dias após a primeira imunização e apresentaram diminuição após a infestação. Os bovinos apresentaram redução de 68% no número total de carrapatos, 71% no peso total dos ovos e 69% no peso total das fêmeas ingurgitadas, quando comparados aos bovinos controles. A eficácia total da vacinação foi de 73% (ANDREOTTI *et al.*, 2002).

Muitas moléculas já caracterizadas estão envolvidas em diferentes funções fisiológicas do carrapato e são importantes para a compreensão da interação do carrapato com o seu hospedeiro. Entre elas podemos citar a vitelina, a principal proteína de reserva do ovo (TELLAM *et al.*, 2002); a THAP (Tick Heme-binding Aspartic proteinase), uma proteinase capaz de ligar-se a grupamentos heme e ter a sua atividade regulada por essas moléculas (SORGINE *et al.*, 2000); a microfilina, um inibidor de trombina (CIPRANDI *et al.*, 2006); a BmC11, uma cisteino-proteinase possivelmente

envolvida na degradação de hemoglobina no intestino do carrapato (RENARD *et al.*, 2000; RENARD *et al.*, 2002); a calreticulina, proteína ligadora de cálcio e ligadora de C1q, molécula do complemento plasmático (FERREIRA *et al.*, 2002a); a paramiosina, proteína muscular (FERREIRA *et al.*, 2002b); e a BooKase, proteína com atividade de cininase (BASTIANI *et al.*, 2002).

1.4 A proteína glutathiona-S-transferase

As glutathiona-S-transferases (GSTs) formam uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da glutathiona a várias outras moléculas, estando presentes em organismos aeróbicos. Entre suas funções, pode-se destacar o transporte intracelular, a participação em processos digestivos, a síntese de prostaglandinas e, principalmente, a detoxificação de substâncias tóxicas e a proteção contra o estresse oxidativo (LEE *et al.*, 2002). As GSTs podem ser microsômicas ou citosólicas, havendo ainda um terceiro grupo de GSTs, estruturalmente distintas das demais e que estão presentes em mitocôndrias e peroxissomos. Atualmente, estão subdivididas em pelo menos 11 diferentes classes: cinco citosólicas presentes em mamíferos - alfa, mu, pi, teta e sigma (MANNERVIK & WIDERSTEN, 1995); duas classes citosólicas presentes em várias espécies – ômega e zeta (BOARD *et al.*, 1997; SHEEHAN *et al.*, 2001; HAYES *et al.*, 2005); uma classe, épsilon, presente apenas em insetos (DING *et al.*, 2003); uma classe, kapa, presente em mitocôndrias de mamíferos; e finalmente duas classes presentes em plantas, fi e tau (DIXON *et al.*, 2002).

As GSTs possuem uma massa molecular de aproximadamente 25 kDa e são encontradas na forma de homo e heterodímeros devido aos múltiplos genes e hibridização dos monômeros. A dimerização ocorre apenas entre subunidades da mesma classe e não entre subunidades de classes diferentes indicando haver um

reconhecimento molecular classe-específico na interface das subunidades (DIRR *et al.*, 1994). Cada dímero tem dois sítios ativos, que são independentes um do outro (DANIELSON & MANNERVIK, 1985). Cada sítio ativo consiste em pelo menos duas regiões ligadoras: o sítio de ligação a GSH (sítio G) que é muito específico, e o sítio de ligação hidrofóbico para substratos eletrofilicos (sítio H), que é menos específico, permitindo que a GSH reaja com uma ampla variedade de agentes tóxicos.

Um ponto importante a ressaltar é o papel das GSTs de artrópodes na detoxificação de vários tipos de compostos químicos usados em produtos comerciais (YU, 2002). Em mosquitos (KETTERMAN *et al.*, 2001) e moscas (WEI *et al.*, 2001) uma alta atividade de GST tem sido relacionada à resistência a pesticidas. Em outro díptero, *Chironomus tentans*, RAKOTONDRAVELO *et al.* (2006) também mostraram altos níveis de atividade de GST em resposta a diferentes pesticidas. LE GOFF *et al.* (2006) mostraram que xenobióticos causam um aumento na expressão de genes de GSTs em *Drosophila melanogaster*. Embora não se tenha ainda dados concretos sobre o papel das GSTs na resistência a piretróides, alguns autores apontam para um papel de sequestro das moléculas de inseticida ou de metabolização de produtos de peroxidação de lipídios resultantes da atividade dos inseticidas, em especial organoclorados e organofosforados (VONTAS *et al.*, 2002). Sendo assim, uma vacina capaz de induzir uma neutralização das GSTs teria o potencial de tornar os parasitos mais vulneráveis aos acaricidas. Em parasitos, KAWALEK *et al.* (1984) demonstraram que a atividade de GST de *Haemonchus contortus* resistentes a cambendazol é 1,5 a 1,8 vez maior, quando comparada com linhagens suscetíveis. Em *Fasciola hepática*, foi encontrada uma correlação negativa entre o nível de atividade de GST e a eficiência da droga salicilanilida utilizada no controle da fasciolose. Nesse estudo, se observou que a diminuição na atividade da GST estava associada a um aumento na resistência às drogas

(MILLER *et al.*, 1994).

1.4.1 GSTs em vacinas

A potencialidade do uso de uma GST em uma vacina contra parasitos vem sendo estudado há mais de 20 anos. SEXTON *et al.* (1990) testaram a capacidade da *F. hepatica* infestar ovinos inoculados com uma GST purificada deste parasito. Em ovinos naturalmente infectados com esse trematódeo, a presença de anticorpos anti-GST é quase nula. Entretanto, a inoculação de GST induziu uma alta produção de anticorpos contra essa proteína. Os animais inoculados com GST apresentaram um quadro clínico de ausência de anemia, redução do dano do fígado e redução do número de ovos fecais, comparando-se ao grupo controle, sugerindo uma diminuição da infecção por esse parasita. O número desses parasitos encontrados nos ovinos apresentou uma redução de 78% no grupo de animais inoculados com GST, relativo ao grupo de animais controle. Esse trabalho demonstrou o potencial da GST em proteger ovinos contra a infecção por *F. hepatica*.

Utilizando oito diferentes formulações de adjuvantes, MORRISON *et al.* (1996) testaram a GST de *F. hepática* como um imunógeno em uma vacina contra a infestação de *F. hepática* em bovinos, resultando em uma proteção que variou de 19% a 69%, dependendo do adjuvante utilizado. Duas das vacinações com as formulações de adjuvantes testados mostraram uma proteção estatisticamente significativa contra esse parasito, demonstrando que a GST pode compor uma vacina para bovinos contra a *F. hepatica*.

A proteção conferida contra o trematódeo *Schistosoma bovis* pela vacinação de bovinos (BUSHARA *et al.*, 1993) e ovinos (BOULANGER *et al.*, 1999) com a GST de *S. bovis* foi avaliada. No caso dos bovinos inoculados com a GST, houve uma redução

no número de ovos do parasito contado nas fezes do ruminante. No experimento de vacinação dos ovinos, a infestação de *S. bovis* resultou em uma redução no número de parasitos e melhores sinais clínicos nos ovinos inoculados com a GST quando comparados ao grupo de animais não tratados.

Em primatas, a proteção conferida com a vacinação com GST contra um trematódeo foi avaliada (BOULANGER *et al.*, 1998). Nesse estudo, testou-se a proteção contra a infestação do trematódeo *Schistosoma haematobium* em macacos (*Erythrocebus patas*) vacinados com a GST de *S. haematobium*. Os números totais de ovos do parasito excretados pelos macacos reduziram de 60% a 77%, dependendo do adjuvante utilizado.

RAO *et al.* (2003) realizaram a expressão de uma GST de *Schistosoma mansoni* na superfície de fagos filamentosos. Esse fago recombinante foi denominado de pdGST. Tal pesquisa avaliou se a imunização com a pdGST poderia ser imunogênica e conferir proteção a camundongos contra um desafio com cercarias de *S. mansoni*. Uma redução de 30% no número de cercarias após a vacinação com pdGST foi verificada.

A eficácia de uma vacina contendo GSTs heterólogas de helmintos vem sendo testada em roedores. RATHAUR *et al.* (2008) demonstraram que a vacinação de roedores com a GST de *Setaria cervi* resulta em um significativo aumento do grau de proteção contra a infestação do parasita *Brugia malayi*, através da redução do número de nematódeo adultos nos animais vacinados. Em outro estudo, a GST recombinante de *Fasciola gigantica* foi usada como o antígeno em uma vacina para avaliar a indução de uma resposta imune e a proteção contra a infecção de *F. gigantica* e *S. mansoni* em camundongos. Essa vacina resultou em taxas de proteção que variaram de 77% a 84% para *F. gigantica* e de 55% para *S. mansoni* (PREYAVICHYAPUGDEE *et al.*, 2008).

1.4.2 GSTs de carrapatos

No carrapato *R. microplus*, já foram descritas a clonagem e a caracterização de duas GSTs, uma de larva (HE *et al.*, 1999) e outra de glândula salivar de fêmeas semi-ingurgitadas (ROSA DE LIMA *et al.*, 2002), sendo essa última denominada de BmGST. Análises feitas por RT-PCR demonstraram que o mRNA da BmGST é sintetizado em glândulas salivares e singânglios de fêmeas adultas semi-ingurgitadas e ingurgitadas (DE FREITAS *et al.*, 2008). Nesse mesmo estudo, verificou-se que essa GST é expressa nas glândulas salivares, singânglio e ovário. DA SILVA VAZ JR. *et al.* (2004a) demonstraram *in vitro* que a rBmGST pode ter sua atividade inibida ou aumentada por diferentes moléculas presentes em acaricidas. Adicionalmente, uma GST presente na larva do carrapato *H. longicornis* foi descrita (DA SILVA VAZ JR. *et al.*, 2004b), apresentando uma similaridade de respectivamente 88% e 42% com as GSTs anteriormente citadas de larva e glândula salivar do *R. microplus*.

Estando a GST presente em vários tecidos do *R. microplus*, essa proteína torna-se um alvo interessante para um antígeno vacinal, pois a resposta imunológica desenvolvida contra a GST poderia atuar em diferentes momentos do ciclo de vida e interferir em diferentes processos fisiológicos do carrapato. Dados recentes indicam que a GST de *H. longicornis* é mais imunogênica que a GST de *R. microplus* em camundongos (UTIUMI, 2008). Nesse estudo, camundongos foram imunizados com GSTs de *H. longicornis* ou de *R. microplus* com ou sem a presença de adjuvante oleoso. Por ELISA se analisou a cinética da produção de anticorpos e o título dos soros, observando-se que os camundongos inoculados com a GST de *R. microplus* apresentaram um nível de produção de anticorpos muito baixo em relação aos camundongos inoculados com a GST de *H. longicornis*. Esses resultados levantaram a hipótese da possível utilização da GST de *H. longicornis* em uma vacina para bovinos

contra a infestação de *R. microplus*. Adicionalmente, foi observada uma reatividade cruzada do soro de coelho inoculado com uma GST recombinante de *R. microplus* contra GSTs recombinantes dos carrapatos *H. longicornis* e *R. appendiculatus* (DA SILVA VAZ JR. *et al.*, 2004b), demonstrando, assim, que anticorpos gerados contra uma GST de carrapato reconhecem GSTs de outros carrapatos. A análise da capacidade de proteção de uma vacina contendo uma GST recombinante de *H. longicornis* contra a infestação de *R. microplus* em bovinos poderá permitir o desenvolvimento de um método de controle mais eficaz contra esses ectoparasitas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral foi testar, em bovinos, a capacidade de uma proteína glutathione S-transferase de *H. longicornis* de induzir uma resposta imunoprotetora contra o carrapato *R. microplus*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Expressar e purificar a GST recombinante de *H. longicornis* (rGST-HI);
- b) Determinar a imunogenicidade da rGST-HI em bovinos;
- c) Determinar a capacidade da rGST-HI de proteger bovinos contra a infestação de *R. microplus*.

3 RESULTADOS

Este capítulo da dissertação apresenta as etapas concluídas do trabalho, que foram escritas na forma de um manuscrito completo submetido a revista *Experimental Parasitology*. O artigo contém introdução, materiais e métodos, descrição dos resultados, discussão e a bibliografia utilizada. A formatação foi adaptada para facilitar a leitura.

Cross immunity with Haemaphysalis longicornis glutathione S-transferase reduces an experimental Rhipicephalus (Boophilus) microplus infestation.

Luís Fernando Parizi, Kiyoko Uemura Utiumi, Saiki Imamura, Misao Onuma, Kazuhiko Ohashi, Aoi Masuda e Itabajara da Silva Vaz Junior

Colaboração dos autores para o trabalho:

Luís Fernando Parizi: Expressão e purificação da rGST-HI, imunização de bovinos, infestação de bovinos com *R. microplus*, testes sorológicos por Western blot, caracterização do grau de imunoproteção conferida pela rGST-HI.

Kiyoko Uemura Utiumi: Expressão e purificação da rGST-Bm e da rGST-HI, imunização de camundongos e testes sorológicos por ELISA.

Saiki Imamura: Clonagem do gene GST-Bm e da GST-HI.

Itabajara da Silva Vaz Junior: Clonagem do gene GST-Bm e da GST-HI.

Orientação na execução dos experimentos.

Misao Onuma, Kazuhiko Ohashi e Aoi Masuda: Orientação na execução dos experimentos.

Title: Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation

Authors: Luís Fernando Parizi¹, Kiyoko Uemura Utiumi¹, Saiki Imamura⁴, Misao Onuma⁴, Kazuhiko Ohashi⁴, Aoi Masuda^{1,2}, Itabajara da Silva Vaz Junior^{1,3*}

1- Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil.

2- Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

3- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

4- Department of Infectious Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

* Corresponding author: Tel +55 51 3308 6078; Fax: +55-51-3308-7309.

E-mail address: itabajara.vaz@ufrgs.br (I. da Silva Vaz Jr).

Abstract

Recombinant Glutathione S-transferases (GSTs) of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (rGST-Bm) and of *Haemaphysalis longicornis* (rGST-Hl) were expressed in *Escherichia coli*, purified by affinity chromatography and used in the immunization of bovines and mice. ELISA and Western blot demonstrated an increase in antibody levels in sera of mice and bovine immunized with rGST-Hl. The tests also showed that immunized bovine sera recognize native *R. microplus* proteins in different tissue extracts. Furthermore, the vaccine potential of rGST-Hl was investigated against infestation of Hereford cattle by *R. microplus*. Vaccination of cattle with rGST-Hl conferred partial cross-protection immunity against *R. microplus*. The overall efficacy ratio against *R. microplus* infestation was of 57.03%, as compared with control group.

Keywords: Vaccine; Control; *Rhipicephalus microplus*; *Haemaphysalis longicornis*; Vaccination; Glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18); Tick

1. Introduction

The ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemaphysalis longicornis* are responsible for expressive economic losses in livestock production (Mulenga et al., 1999; Guerrero et al., 2006) and cause a variety of adverse effects, such as reduced growth, decreased milk production and transmission of various tick-borne diseases (Fujisaki et al., 1994; Cafrune et al., 1995; Yin et al., 1997; Jonsson, 2006). Current control strategies against these bovine ticks rely on the use of chemicals (George et al., 2004); however, parasite resistance is rapidly becoming a global problem. In addition, chemical residues in food and environmental pollution have become a major concern. To overcome these problems, alternative non-chemical methods to control bovine ticks are in progress, including the development of vaccines (Jongejan, 1998; Willadsen, 2006; Sonenshine et al., 2006). In this sense, a vaccine against ticks would become an important tool and open new perspectives as a cost-effective control strategy against the parasite (Mulenga et al., 2000; de la Fuente et al., 2007). Furthermore, effective cattle immunization strategies could significantly reduce the incidence of transmission of tick-borne parasites (de la Fuente et al., 2007; Imamura et al., 2008). For this purpose, a number of different tick proteins have been evaluated as potential tick control vaccine candidates (de la Fuente et al., 1999; Leal et al., 2006; de la Fuente and Kocan, 2006; Seixas et al., 2008; Parizi et al., 2009). However, animals bred in different countries are exposed to different tick species. In this scenario, a universal vaccine consisting of common proteins present in more than one tick species would become part of tick control approaches (Fragoso et al., 1998). Limited and manageable antigenic differences would create the opportunity for the development of a universal vaccine that would thus respond to more than one tick species.

Glutathione S-transferases (GSTs) are a family of biotransformation enzymes involved in the metabolic detoxification of xenobiotics and endogenous compounds (Agianian et al., 2003). Found in practically all organisms and present in a variety of tissues, GSTs catalyze the reaction of a wide variety of compounds, in the presence of glutathione (GSH). From the biological standpoint, this reaction results in less harmful compounds, which are also more water soluble and therefore easier to remove from the cell (Sheehan et al., 2001). The activity of GSTs in acaricide/insecticide detoxification in arthropods (Vontas et al., 2000; Wei et al., 2001; Ketterman et al., 2001), as well as the effect of several acaricides on the enzyme activity of recombinant GST of *R. microplus* (da Silva Vaz et al., 2004b) supports the use of this enzyme as a candidate target for an anti-parasite vaccine (Sharp et al., 1991; Vibanco-Perez et al., 1999; Scott and McManus, 2000; Zhan et al., 2005).

The characterization and molecular cloning of two *R. microplus* GST genes from partially engorged female salivary glands (Rosa de Lima et al., 2002; da Silva Vaz et al., 2004) and larvae (He et al., 1999), and one GST gene from larvae of *H. longicornis* (da Silva Vaz et al., 2004a) have been reported. Also, a cross-reactivity against *H. longicornis* and *R. appendiculatus* recombinant GSTs from rabbit serum generated against a recombinant GST of *R. microplus* has been observed (da Silva Vaz et al., 2004a). These observations suggested that the tick GSTs could become a constituent of a universal vaccine against more than one tick species. In the present study, we demonstrate the antigenicity and immunogenicity in mice and bovines of recombinant GST-HI and GST-Bm, expressed in *Escherichia coli*. A decrease in the number of *R. microplus* ticks engorged in the immunized bovines with rGST-HI is also described.

2. Materials and methods

2.1. Sequence analyses

Analyses of deduced amino acid sequences and alignment of sequences were carried out using the Clustal W algorithm of the BioEdit version 5.0.6 software program (Hall, 1999). The search for conserved patterns was performed by InterProScan tool (Zdobnov and Apweiler, 2001).

The antigenic index analysis of GST-HI and GST-Bm was performed with the Jameson-Wolf algorithm in the software LASERGENE version 7.0.0 to predict potential antigenic determinants by combining existing methods for protein structural predictions (Jameson and Wolf, 1988).

2.2. Production of recombinant GSTs

The rGST-HI (da Silva Vaz et al., 2004a), and rGST-Bm (da Silva Vaz et al., 2004b), were expressed and purified as previously described. Briefly, the GST-HI cDNA was subcloned into vector pET43a (Novagen) and the GST-Bm cDNA was subcloned into vector pET5b (Novagen), and both constructions were expressed in *E. coli* strain AD494 (Novagen). The soluble forms of recombinant GSTs were purified through affinity chromatography using GSTrap FF column (GE Healthcare). The eluted samples were then dialyzed against PBS (NaCl 150mM, NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7.5) and the protein concentrations were determined according to the Bradford method (Bradford, 1976) and Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with bovine serum albumin as standard. Protein purity was monitored by SDS-PAGE and Western blot probed with anti-GST-Bm (da Silva Vaz et al., 2004b) and anti-GST-HI (da Silva Vaz et al., 2004a) rabbit serum.

2.3. Animals

R. microplus were maintained on experimentally infested Hereford (*Bos taurus taurus*) cattle and engorged adult female ticks were kept in Petri dishes at 28°C and 85% relative humidity until completion of oviposition. Hereford cattle were acquired from a tick-free area, housed in individual tick-proof pens on slatted floors and maintained at the Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil. BALB/c mice used for immunizations were maintained at the Animal Facility of Centro de Biotecnologia, UFRGS. Animal care was in accordance with institutional guidelines.

2.4. Immunization of mice

The mice were divided in groups of two animals and 25 µg of the recombinant GST-Bm or GST-HI proteins was inoculated with Montanide (Seppic) 888/Marcol 52 (Exxon Mobil Corporation) or saponin (Sigma) adjuvants, or without adjuvant. The mice were immunized subcutaneously with three doses on days 0, 14 and 28. The groups inoculated with rGST-Bm protein received an additional 50-µg protein dose 21 days after the third dose. The control groups were inoculated with *E. coli* extract or adjuvant alone.

2.5. Immunization of bovine and challenge infestation

The bovines were divided into two groups: the control group (bovines 1, 2 and 3) and the treatment group (bovines 4, 5, 6 and 7). The control group received emulsion composed of 0.5 ml PBS plus 0.5 ml of oil adjuvant (Montanide 888 and Marcol 52) per dose. The treatment group animals received emulsion of 0.5 ml of rGST-HI solution in PBS (1st/2nd/3rd/4th dose = 200 µg; 5th/6th dose = 400 µg) plus 0.5 ml adjuvant, at 15-day

intervals. In both groups, 1 mg of saponin was added to the 5th and 6th doses. The bovines were immunized intramuscularly and were challenged with 20,000 10-day-old larvae of *R. microplus* (Porto Alegre strain), *Babesia* spp. and *Anaplasma* spp. free, fifteen days after the last inoculation.

2.6. Serum collection

Blood samples were collected from bovines and mice fifteen and seven days following immunizations, respectively, and left at room temperature for 1 h (mouse) or at 4°C for 16 h (bovines). Serum was separated by centrifuging the samples at 10,000 × g for 5 min at 4°C and aliquots were stored frozen at -20°C for further use.

2.7. Tissue extracts preparation

Fully engorged female ticks were washed with PBS. The dorsal surface was dissected with a scalped blade. Ovary and salivary gland were separated with fine-tipped forceps and washed in PBS. Ten-day-old larvae were disrupted and homogenized using a mortar and pestle on ice bath with PBS. The homogenate was centrifuged at 16,000 x g for 15 min at 4°C to remove the insoluble material, and the soluble supernatant fraction was collected. The protein extracts were prepared according to the method previously described (Rosa de Lima et al., 2002). The protein concentrations of the extracts were measured according to the method described by Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard. For Western blot analysis, native GSTs-Bm of tissue extracts was purified with Glutathione Sepharose 4B resin (Amersham Biosciences). The tissue extracts were incubated for 20 min with 10 µl of resin and centrifuged at 1,500 x g for 2 min, whereupon supernatants were removed. After three

washes with PBS, the sample buffer was added in the resin and the supernatant fractions were submitted to 14% SDS-PAGE.

2.8. Serological analyses

The ELISA was realized to verify the kinetic of antibody production of immunized mice. The plates were coated with 100 ng/well of rGST-HI, rGST-Bm or *E. coli* extract in carbonate-bicarbonate buffer 0.05 M, pH 9.6 for 16 h at 4°C. The antigens were probed with sera diluted 1:200 of mice immunized and detected with goat anti-IgG and anti-IgM mice peroxidase conjugate (Sigma) diluted to 1:2,000. Development was performed with 10 ml of phosphate-citrate buffer 0.1 M, pH 5.0, containing 5 µl of H₂O₂ and 3.2 mg of OPD (Sigma). After 15 min, the reaction was stopped by the addition of H₂SO₄ 12.5% and the absorbance was measured at 492 nm. Sera were considered positive in ELISA when an OD value higher than the mean plus 2 SD of the OD showed by pre-immunization sera (control sera) was obtained.

The humoral response of immunized bovines was verified by Western blot analyses. The rGST-HI and the native GST-Bm (purified from larvae, ovary and salivary gland extracts) were separated by SDS-PAGE 14% (Laemmli, 1970) and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membranes were probed with sera from rGST-HI-immunized and control bovines. After sera were incubated, the anti-IgG alkaline phosphatase (Sigma) conjugates were used as secondary antibodies and revelations were performed with NBT (Fermentas) and BCIP (Fermentas).

2.9. Tick analysis

From the 17th post-challenge day until the end of the infestation period, ticks that detached spontaneously were collected once a day. Then, ticks and eggs were classified and incubated as previously described (da Silva Vaz et al., 1998). Protection was calculated considering the variation in number of fully engorged ticks, egg laying capacity and egg fertility. The individual and overall protections were calculated by the interaction of these parameters using the formula (da Silva Vaz et al., 1998): $= 100 \times [1 - (NFE \times WE \times WL)]$, where NFE is the number of fully engorged ticks from vaccinated bovines/control bovines, WE is the egg laying capacity of ticks from vaccinated bovines/control bovines and WL is the egg fertility of ticks from vaccinated bovines/control bovines.

2.10. Statistical analysis

The statistical significance of the results shown in Table 1 was tested using the t-test and ANOVA, as previously described (da Silva Vaz et al., 1998).

3. Results

3.1. GST-HI and GST-Bm epitopes

The Jameson-Wolf algorithm to predict antigenic index was used to compare the regions in the protein sequence of GST-HI and GST-Bm that might be antigenic. The analysis predicted several potential antigenic sites in the tree proteins (Fig. 1) and identified regions whose antigenic profiles are similarly conserved across proteins. Moreover, the antigenic regions coincide with the regions showing high similarity between the proteins and Mu-class GST signatures.

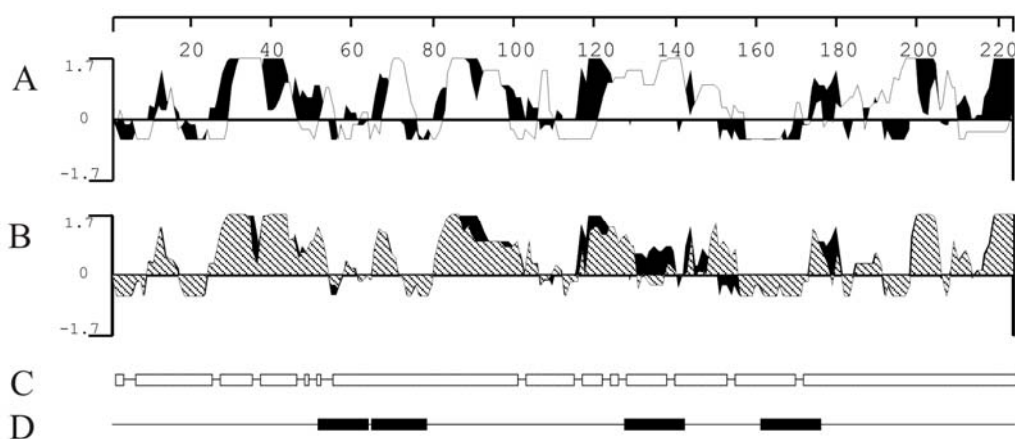


Figure 1 – Comparative antigenicity analyses of one *Haemaphysalis longicornis* and two *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* GSTs. (A and B) Antigenic index plots predicted using the Jameson–Wolf algorithm, where an increased positivity is predictive of antigenic sites. In (A) the GST-HI sequence plot is drawn in black, overlapped by the GST-Bm (GenBank AAL99403) in white. In (B) the GST-HI sequence plot is also drawn in black, overlapped by GST-Bm (GenBank AAD15991) in shaded pattern. (C) White boxes indicate regions of similarity in the three sequences (higher than 80%). (D) Black boxes indicate the four Mu-class GST signature motifs.

3.2 Immunogenicity of rGSTs in mice

To determine the efficacy of the different adjuvants and rGSTs to induce a humoral response in mice, the rGSTs antibody responses were measured during the course of the experiment. Sera of mice were used in ELISA analyses to detect IgG and IgM antibodies against the recombinant GSTs. This assay demonstrated a gradual increase in antibody titers of IgG in mice inoculated with rGST-HI plus Montanide 888/Marcol 52 adjuvant (Fig. 2), though mice inoculated with rGST-HI plus saponin or in absence of adjuvant did not show antibody titers. Likewise, mice inoculated with rGST-Bm in the presence or absence of adjuvants and non-inoculated mice did not show antibody titers (data not shown).

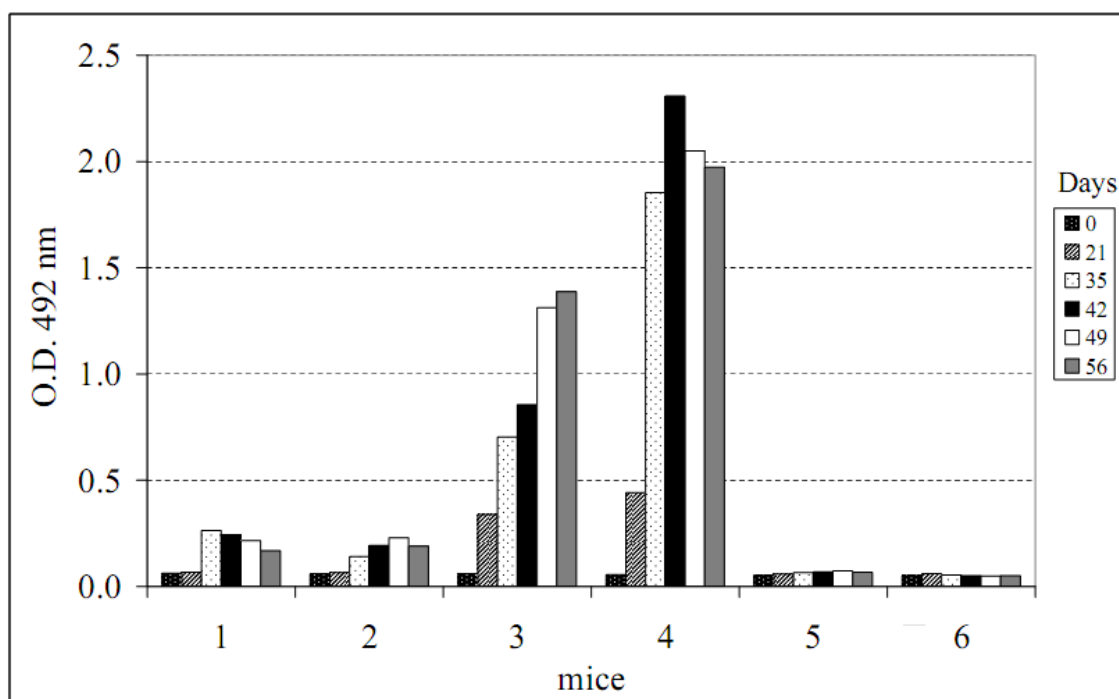


Figure 2 – Temporal pattern of antibody production of each mouse inoculated with rGST-HI in presence or absence of adjuvants tested against rGST-HI coated plates by indirect ELISA (sera diluted 1:200). Mice were inoculated on days 0, 14 and 28 and the bars show sera collected on days 0, 21, 35, 42, 49 or 56. (1-2) mice inoculated with rGST-HI plus saponin; (3-4) mice inoculated with rGST-HI plus Montanide 888/Marcol 52; (5-6) mice inoculated only with rGST-HI.

3.3. Bovines antibody response against rGST-HI

One group of four bovines was immunized with rGST-HI in the presence of adjuvant. The inoculation of PBS plus adjuvant was used as a negative control. Six immunizations were given at 15-day intervals. Blood samples were collected on the same day that immunization or tick challenge were conducted, and anti-rGST-HI antibodies were examined by Western blot using rGST-HI as the target antigen. Analysis of antibodies in control and immunized bovines by immunoblotting showed a significant difference in response between both groups (Fig. 3). Immunoblotting results also showed positive reaction between rGST-HI and anti-GST-HI antibodies before and after larvae challenge. The control sera failed to bind with rGST-HI and no antibody was observed in control bovines after challenge infection (Fig. 3).

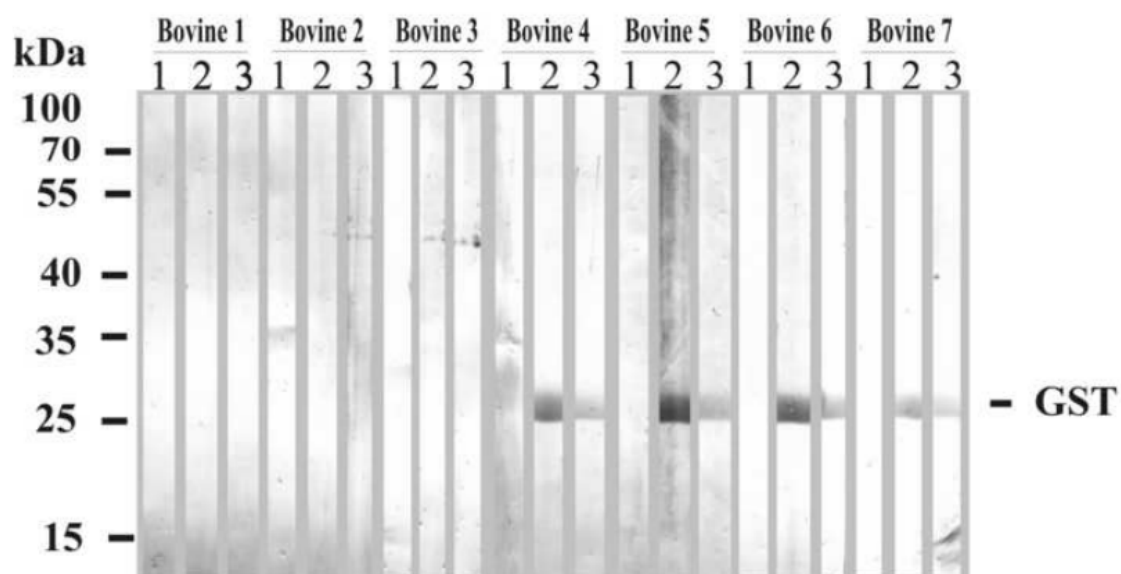


Figure 3 – Western blot with rGST-HI. Sera from control group (bovines 1–3) and rGST-HI vaccinated group (bovines 4–7). Lanes 1, pre-immune sera; lanes 2, pre-infestation sera; lanes 3, pos-infestation sera. MW marker $\times 10^3$.

3.4. Recognition of native GST-Bm by bovine sera

The specificity of the anti-GST antibodies induced by rGST-HI immunization was assessed by Western blot of purified GSTs from *R. microplus* protein extracts with sera from immunized bovines collected before challenge infestation. The native GST-Bm (apparent molecular mass of 26 kDa), in larvae, ovary and salivary gland were recognized by sera of the bovines immunized with rGST-HI (Fig. 4), indicating that the antibodies induced by rGST-HI immunization recognize native *R. microplus* GSTs. The pre-immune sera of the bovines immunized with rGST-HI did not recognize the native GST-Bm in tissues (Fig. 4).

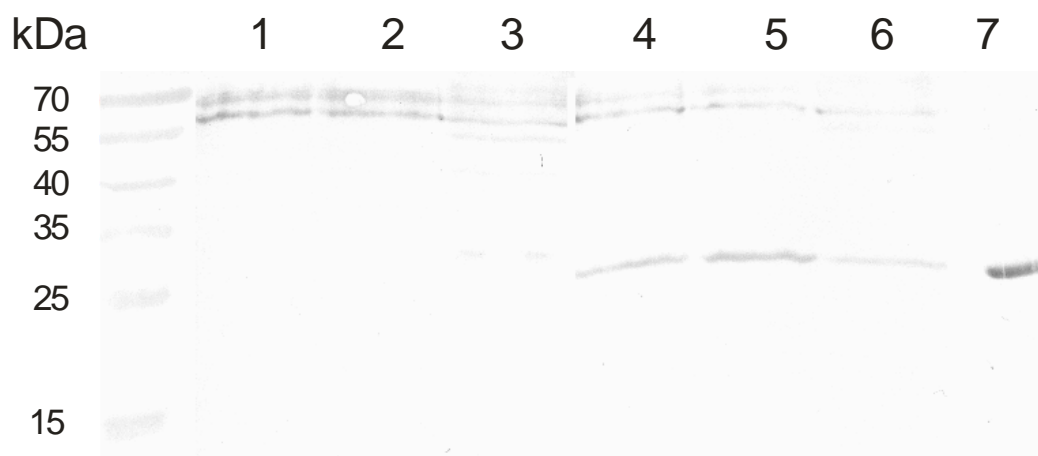


Figure 4 – Western blot analysis of larvae (line 1 and 4), ovary (line 2 and 5) and salivary gland (line 3 and 6) extracts and rGST-HI (line 7) probed with bovine sera. Lanes 1-3, pre-immune bovine serum; lanes 4-7, rGST-HI-immunized bovine serum. MW marker $\times 10^3$.

3.5. Parasite challenge

To determine whether GST-specific immune response observed in the vaccinated animals is protective; bovines were infested with *R. microplus* larvae. The mean results for each biological parameter and the differences between groups are presented in table 1 and figure 5. The full engorged tick number was significantly lower ($p < 0.05$) in immunized group during the heavy-infestation period when compared to control group

(figure 5). Therefore, the dynamic of infestation in the immunized bovines was different from that observed in the control group of bovines. The total number and weight of engorged ticks was lower in the rGST-HI vaccinated group, showed a reduction of 53.08% and 52.34%, respectively. However, due to considerable variation in individual animal responses, the differences between the vaccinated and the control group were nearly statistically significant ($p < 0.069$ and $p < 0.065$, respectively; Table 1). Egg laying capacity and egg fertility of ticks from vaccinated bovines were respectively 0.6% and 7.99% lower, as compared to the values obtained for ticks from control animals. Statistically, these parameters were identical between the bovine groups. In this experiment, the overall efficacy ratio against *R. microplus* was 57.03%, as compared with the control group.

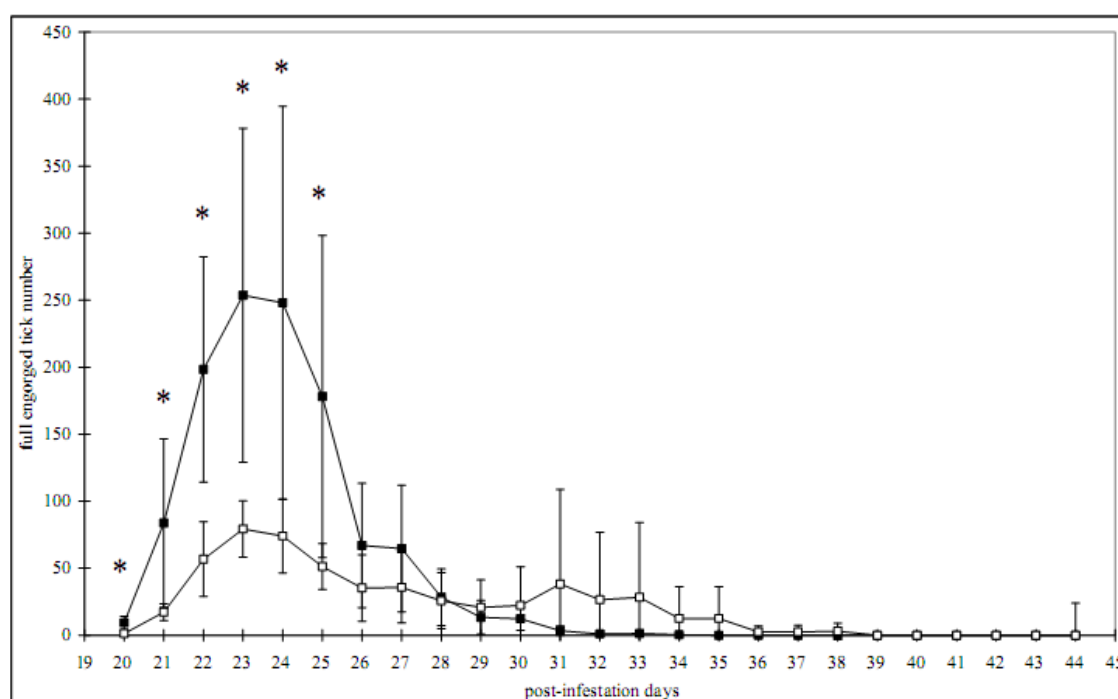


Figure 5 – Dynamics of number (mean \pm S.D.) of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* engorged female tick recovery in rGST-HI-immunized bovines ($-\square-$) and in control group bovines ($-\blacksquare-$). Ticks that detached spontaneously were collected once a day. Significance level was measure using t-test. $*p \leq 0.05$ was considered as significant.

Table 1: Biological parameters of detached *R. microplus* from cattle immunized with rGST-HI and control group

Group	Bovine	Fully engorged ^a		Index	
		Number	Weight (g)	Egg laying Capacity ^b	Egg Fertility ^c
Control	1	1712	411	0.443	0.393
	2	1305	326	0.452	0.351
	3	471	128	0.471	0.305
	Total	3488	866	1.366	1.049
	Mean	1163	289	0.455	0.350
	S.D.	633	145	0.014	0.044
GST	4	340	85	0.462	0.297
	5	464	122	0.441	0.370
	6	406	91	0.454	0.304
	7	972	251	0.453	0.317
	Total	2182	550	1.81	1.287
	Mean	546	137	0.453	0.322
	S.D.	289	78	0.01	0.033
	Difference ^d	53.08	52.34	0.60	7.99

^a Collected during 20 days in the course of the infestation period.

^b The weight of eggs laid by samples of fully engorged ticks, collected daily during 20 days in the course of the infestation period, was used to calculate the proportion of the weight of ticks that was converted into eggs.

^c Proportion between weight of fertile eggs and weight of eggs laid.

^d Difference (%) = 100 X (1 – mean value of vaccinated group/control group).

4. Discussion

Proteins present in different tick species and the capacity of these proteins to induce cross-protection may be seen as valuable tools in the development of potential vaccine candidates in control strategies against infestation with various tick species. In experiments of tick infestations in bovines, the Bm86 vaccine proved to be considerably more effective against a heterologous species than against the tick species from which it was derived (Fragoso et al., 1998; Pipano et al., 2003). Canales et al. (2009) demonstrated the efficacy of recombinant Ba86 in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* and *R. microplus* infestations in cattle. In another study, a stronger cross-protection in vaccine effectiveness was observed even against a different genus (*Hyalomma*) of hard ticks (De Vos et al., 2001). In calves, TickGARD vaccination resulted in reduction in the number of engorging adult *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* females, decreased cumulative tick weights and lowered cumulative egg weights (Odongo et al., 2007). In addition, the immune response induced by Bm86 was able to control *Dermanyssus gallinae* infestation in poultry (Harrington et al., 2009). A cement protein of *R. appendiculatus* induced protective humoral and cell-mediated immune responses that offered cross-protection against adults and affected nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* and *Ixodes ricinus* ticks (Trimnell et al., 2005).

The effect of reduction in parasitism obtained in the present work was similar to that obtained with GST vaccination against other parasites, such as the *Taenia solium* (Vibanco-Perez et al., 1999), *S. mansoni* (Scott and McManus, 2000), *Ancylostoma caninum* (Zhan et al., 2005) and *Necator americanus* (Zhan et al., 2005). In these experiments, both recombinant and native GST proteins have been used in vaccination. Moreover, the current literature reports the potential of heterologous GSTs to induce

cross-protection immunity against helminths. In a study on the vaccination of jirds (*Meriones unguiculatus*) with *Setaria cervi* GST, Rathaur et al. (2008) demonstrated that GST elicited a very significant level of cross-protection against filarial parasite *Brugia malayi* infection, with reduction in adult worm burden. In another study, the recombinant *Fasciola gigantica* GST was used as a vaccine to evaluate the induction of immune responses and protection against *F. gigantica* and *Schistosoma mansoni* infection in mice, resulting in high protection against *F. gigantica* and some cross-protection against *S. mansoni* (Preyavichyapugdee et al., 2008). These series of experiments suggested the potential of tick GST in tick control vaccine strategies. In the present work, we have studied the potential of the recombinant *H. longicornis* GST as candidate for one vaccine against tick infestation. We have determined the immunological response induced by this protein in bovines followed by challenge-exposure with *R. microplus* ticks. Since rGST-HI had higher immunogenicity than rGST-Bm in mouse, we chose this protein for bovine immunization with the aim to induce a better protective immune response against tick infestation. Moreover, the *in silico* analyses showed that the proteins have various antigenic regions in common areas. This suggests that immunization with the protein of one tick species may induce cross-reactive antibody responses capable of protecting against infestations by other tick species.

First, immunological responses of mice inoculated with rGST-Bm or rGST-HI in the presence or absence of adjuvants were compared. Considering immunizations, the choice of adjuvant is important to develop an adequate immune response. So, we tested the effect of the two rGSTs in the presence of oil or saponin adjuvants as a previous bovine immunization experiment. In the mouse inoculation experiment, a higher level of IgG was observed in ELISA, but only in mice immunized with rGST-HI in the

presence of Montanide 888/Marcol 52 adjuvant. In bovine vaccination, the immunization was started with Marcol-Montanide, since this is commonly used in veterinary vaccines. However, after the 4th inoculation, saponin was added to enhance the immune response for rGST-HI, due to a synergistic effect between saponin and oil emulsion (Raman et al., 2004; Song et al., 2009). After the last dose, the immunization elicited a remarkable immune response. This formulation enhanced the immune response in foot-and-mouth disease vaccinated pigs and cattle (Smitsaart et al., 2004). IgG levels remained relatively constant until the end of challenge experiment, which suggests the possibility to induce an immunologic memory against the rGST-HI.

The Western blot analyses showed that antibodies raised against rGST-HI recognized the native GST-Bm proteins present in larvae, ovary and salivary gland of *R. microplus*. Moreover, GST gene transcription and the presence of GST in various tissues (gut, salivary gland, synganglion, ovary and larvae) have already been demonstrated for the *H. longicornis* and *R. microplus* ticks (He et al., 1999; Rosa de Lima et al., 2002; da Silva Vaz et al., 2004a; de Freitas et al., 2008). This result demonstrates that there is a cross-antigenicity induced by the rGST-HI immunization. This observation is important when the use of recombinant protein is considered in a cross-protective vaccine. The areas identified in the Jameson-Wolf analyses probably are responsible for the cross-reactivity observed in the immunologic analyses of the immunized bovines.

Immunization with the rGST-HI induced a partial protective immune response in bovines, as shown by the decrease in the number of female ticks that survived in the rGST-HI-vaccinated animals, when compared with control animals. Interestingly, the analysis of *R. microplus* GST complementary DNAs by RNA interference in *R. microplus* showed that GST gene knockdown affected tick attachment but had no effect

on *R. microplus* mortality and oviposition (Almazán, 2009). When the daily number of engorged tick recovered from the bovines is considered, the dynamic during the heavy infestation period in the immunized bovines was statistically different from that observed in the control group of bovines. In spite of the differences in dynamic of infestation between the groups, the total number of engorged ticks collected during 42 days did not present statistical significance compared to the control group; this fact could be a consequence of the small group size and the variability between individual bovine responses. In other vaccination experiments in bovines (Andreotti, 2007; Piercy et al., 2007), the individual variability was also observed. However, the overall efficacy ratio and considerable reduction in number and weight of engorged female ticks are an encouraging result for the development of a vaccine against the tick. Other studies have shown that vaccination with single tick proteins offered at least some degree of protection, when tested in vaccination trials. However, the combination of proteins expressed in a single tissue or the use of proteins expressed in different stages of the parasite may result in one more effective vaccine protection. The fact that GSTs are expressed in different tissues of the parasite could be an advantage in the development of vaccination strategies and the successful control of parasite.

The protection conferred by rGST-H1 immunization is not robust enough to support the use of this protein in a single-antigen vaccine. However, our findings suggest that the recombinant GST-H1 could be considered as potential antigen to become part of a cocktail vaccine against *R. microplus*, together with other characterized antigens, like Bm86 (de la Fuente et al., 1999), BYC (Leal et al., 2006) and VTDCE (Seixas et al., 2008). The immune response against GST affected the development of the adults and its use together with other antigen like BYC, which affects reproductive capacity, may improve the efficacy of the vaccine by blocking the

development of the parasite. These results demonstrate a potential protective capacity of rGST-H1 against *R. microplus* infestation.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq-Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Entomologia Molecular, HHMI, FINEP, CAPES, CNPq, FAPERJ and FAPERGS (Brazil) and Ministry of Science, Culture and Education and JSPS (Japan).

References

- Agianian, B., Tucker, P.A., Schouten, A., Leonard, K., Bullard, B., Gros, P., 2003. Structure of a *Drosophila* sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *Journal of Molecular Biology* 326, 151-165.
- Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Rosario-Cruz, R., Jongejan, F., de la Fuente, J., 2009. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology Research* [Epub ahead of print].
- Andreotti, R., 2007. A synthetic Bmti n-terminal as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. *Experimental Parasitology* 116, 66-70.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Cafrune, M.M., Aguirre, D.H., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 1995. Experimental studies of the rate of infection of *Boophilus microplus* eggs with *Babesia bovis*. *Research in Veterinary Science* 58, 284-285.
- Canales, M., Almazan, C., Naranjo, V., Jongejan, F., de la Fuente, J., 2009. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnology* 9.

- da Silva Vaz, I. Jr., Imamura, S., Ohashi, K., Onuma, M., 2004a. Cloning, expression and partial characterization of a *Haemaphysalis longicornis* and a *Rhipicephalus appendiculatus* glutathione S-transferase. *Insect Molecular Biology* 13, 329-335.
- da Silva Vaz, I. Jr., Torino, L.T., Michelon, A., Sanchez Ferreira, C.A., Joaquim de Freitas, D.R., Termignoni, C., Masuda, A., 2004b. Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*. 119, 237-245.
- da Silva Vaz, I. Jr., Logullo, C., Sorgine, M., Velloso, F.F., Rosa de Lima, M.F., Gonzales, J.C., Masuda, H., Oliveira, P.L., Masuda, A., 1998. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66, 331-341.
- de Freitas, D.R.J., Vaz, I.D., Masuda, A., 2008. Expression and enzymatic activity of glutathione s-transferase in tissues of *Boophilus microplus* females. *Brazilian journal of veterinary parasitology* 17, 99-104.
- de la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J.M., Kocan, KM, Willadsen, P., 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews* 8, 23-28
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology* 28, 275-283.
- de la Fuente, J., Rodriguez, M., Montero, C., Redondo, M., Garcia-Garcia, J.C., Mendez, L., Serrano, E., Valdes, M., Enriquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boue, O., Machado, H., Lleonart, R., 1999. Vaccination against ticks (*Boophilus*

- spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac (TM). *Genetic Analysis* 15, 143-148.
- De Vos, S., Zeinstra, L., Taoufik, A., Willadsen, P., Jongejan, F., 2001. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Experimental and Applied Acarology* 25, 245-261.
- Fragoso, H., Rad, P.H., Ortiz, M., Rodriguez, M., Redondo, M., Herrera, L., de la Fuente, J., 1998. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *Vaccine* 16, 1990-1992.
- Fujisaki, K., Kawazu, S., Kamio, T., 1994. The Taxonomy of the Bovine *Theileria* Spp. *Parasitology Today* 10, 31-33.
- George, J.E., Pound, J.M., Davey, R.B., 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology* 129, S353-S366.
- Guerrero, F.D., Nene, V.M., George, J.E., Barker, S.C., Willadsen, P., 2006. Sequencing a new target genome: The *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae) genome project. *Journal of Medical Entomology* 43, 9-16.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Harrington, D., Canales, M., la Fuente, J., de Luna, C., Robinson, K., Guy, J., Sparagano, O., 2009. Immunisation with recombinant proteins subolesin and

- Bm86 for the control of *Dermanyssus gallinae* in poultry. *Vaccine* 27, 4056-4063.
- He, H., Chen, A.C., Davey, R.B., Ivie, G.W., George, J.E., 1999. Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 737-743.
- Imamura, S., Konnai, S., Junior, I.D.V., Yamada, S., Nakajima, C., Ito, Y., Tajima, T., Yasuda, J., Simuunza, M., Onuma, M., Ohashi, K., 2008. Effects of anti-tick cocktail vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. *Japanese Journal Veterinary Research* 56, 85-98.
- Jameson, B.A., Wolf, H., 1988. The antigenic index - A novel algorithm for predicting antigenic determinants. *CABIOS* 4, 181-186.
- Jongejan, F., 1998. Integrated control of ticks and tick-borne diseases (ICTTD). *Parasitology Today* 14, 173-176.
- Jonsson, N.N., 2006. 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.
- Ketterman, A.J., Prommeenate, P., Boonchaay, C., Chanama, U., Leetachewa, S., Promtet, N., Prapanthadara, L., 2001. Single amino acid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 65-74.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leal, A.T., Seixas, A., Pohl, P.C., Ferreira, C.A.S., Logullo, C., Oliveira, P.L., Farias, S.E., Termignoni, C., Vaz, I.D., Masuda, A., 2006. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114, 341-345.
- Mulenga, A., Sugimoto, C., Onuma, M., 2000. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and Infection* 2, 1353-1361.
- Mulenga, A., Sugimoto, C., Sako, Y., Ohashi, K., Musoke, A., Shubash, M., Onuma, M., 1999. 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.
- Odongo, D., Kamau, L., Skilton, R., Mwaura, S., Nitsch, C., Musoke, A., Taracha, E., Daubenberger, C., Bishop, R., 2007. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. *Vaccine* 25, 1287-1296.
- Parizi, L.F., Pohl, P.C., Masuda, A., Da Silva Vaz, I., 2009. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 18, 1-7.
- Piercy J., Werling D., Coffey T.J., 2007. Differential responses of bovine macrophages to infection with bovine-specific and non bovine specific mycobacteria. *Tuberculosis* 87, 415–420.

- Pipano, E., Alekceev, E., Galker, F., Fish, L., Samish, M., Shkap, V., 2003. Immunity against *Boophilus annulatus* induced by the Bm86 (Tick-GARD) vaccine. *Experimental and Applied Acarology* 29, 141-149.
- Preyavichyapugdee, N., Sahaphong, S., Riengrojpitak, S., Grams, R., Viyanant, V., Sobhon, P., 2008. *Fasciola gigantica* and *Schistosoma mansoni*: Vaccine potential of recombinant glutathione S-transferase (rFgGST26) against infections in mice. *Experimental Parasitology* 119, 229-237.
- Raman, M., Ramadass, P., Rajavelu., 2004. Evaluation of Saponin and Montanide ISA 50 adjuvants for their immunopotency and effect on humoral immune response of calves to purified midgut antigen of *Boophilus microplus*. *Veterinarski Arhiv* 74 (2), 129-140.
- Rathaur, S., Yadav, M., Gupta, S., Anandharaman, V., Reddy, M.V., 2008. Filarial glutathione-S-transferase: A potential vaccine candidate against lymphatic filariasis. *Vaccine* 26, 4094-4100.
- Rosa de Lima, M.F., Sanchez Ferreira, C.A., Joaquim de Freitas, D.R., Valenzuela, J.G., Masuda, A., 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 747-754.
- Scott, J.C., McManus, D.P., 2000. Molecular cloning and enzymatic expression of the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma japonicum*: Evidence for sequence variation but lack of consistent vaccine efficacy in the murine host. *Parasitology International* 49, 289-300.

- Seixas, A., Leal, A.T., Nascimento-Silva, M.C.L., Masuda, A., Termignoni, C., Vaz, I.D., 2008. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCe). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 124, 332-340.
- Sharp, P.J., Smith, D.R.J., Bach, W., Wagland, B.M., Cobon, G.S., 1991. Purified glutathione S-transferases from parasites as candidate protective antigens. *International Journal for Parasitology* 21, 839-846.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 360, 1-16.
- Smitsaert, E., Espinoza, A.M., Sanguinetti, R., Filippi, J., Ham, A., Bellinzoni, R., 2004. Addition of saponin to double oil emulsion FMD vaccines enhances specific antibody responses in cattle and pigs. Report of the Session of the FAO Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease 344-351.
- Sonenshine, D.E., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2006. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends in Parasitology* 22, 550-551.
- Song, X.M., Bao, S.J., Wu, L.H., Hu, S.H., 2009. Ginseng stem-leaf saponins (GSLs) and mineral oil act synergistically to enhance the immune responses to vaccination against foot-and-mouth disease in mice. *Vaccine* 27, 51-55.
- Trimnell, A.R., Davies, G.M., Lissina, O., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 2005. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine* 23, 4329-4341.

- Vibanco-Perez, N., Jimenez, L., Merchant, M.T., Landa, A., 1999. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *Journal of Parasitology* 85, 448-453.
- Vontas, J.G., Enayati, A.A., Small, G.J., Hemingway, J., 2000. A simple biochemical assay for glutathione S-transferase activity and its possible field application for screening glutathione S-transferase-based insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 68, 184-192.
- Wei, S.H., Clark, A.G., Syvanen, M., 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 1145-1153.
- Willadsen, P., 2006. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology* 138, 161-168.
- Yin, H., Lu, W., Luo, J., 1997. Babesiosis in China. *Tropical Animal Health and Production* 29, 11S-15S.
- Zdobnov, E.M., Apweiler, R., 2001. InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* 17, 847-848.
- Zhan, B., Liu, S., Perally, S., Xue, J., Fujiwara, R., Brophy, P., Xiao, S.H., Liu, Y.Y., Feng, J.J., Williamson, A., Wang, Y., Bueno, L.L., Mendez, S., Goud, G., Bethony, J.M., Hawdon, J.M., Loukas, A., Jones, K., Hotez, P.J., 2005. Biochemical characterization and vaccine potential of a heme-binding glutathione transferase from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. *Infection and Immunity* 73, 6903-6911.

4 DISCUSSÃO

A infestação de bovinos pelo carrapato *R. microplus* constitui um dos maiores problemas para a atividade da pecuária nas áreas tropicais e sub-tropicais do mundo. A aplicação do método tradicional de controle do carrapato através do uso de acaricidas apresenta uma série de desvantagens, como a deposição de resíduos tóxicos nos produtos animais (carne, leite e derivados) e no meio ambiente, e a seleção de linhagens de carrapatos resistentes a esses acaricidas (NOLAN *et al.*, 1989; DAVEY & GEORGE, 1998). Um dos métodos alternativos para o combate ao carrapato é o uso de vacinas. Para o desenvolvimento desse controle, várias moléculas têm sido identificadas e caracterizadas quanto ao seu potencial como antígenos protetores. Além disso, uma vacina constituída de proteínas presentes em espécies diferentes de carrapatos que conferissem proteção cruzada poderia ser útil para o controle de mais de uma espécie de carrapato (FRAGOSO *et al.*, 1998). Análises *in silico* realizadas nesse trabalho mostraram que as GSTs de *R. microplus* e *H. longicornis* possuem vários sítios antigênicos em áreas comuns, sugerindo que a inoculação de uma GST de um destes carrapatos poderia produzir anticorpos com reatividade cruzada para a outra GST, condição importante para uma possível proteção de bovinos contra a infestação do carrapato da outra espécie.

Experimentos demonstram a capacidade de indução de proteção cruzada de proteínas pertencentes a carrapatos quando essas são utilizadas como antígenos vacinais. FRAGOSO *et al.* (1998) demonstraram o uso da proteína Bm86, derivada do *R. microplus*, no controle da infestação de *R. annulatus*. O desafio com larvas de *R. annulatus* em bovinos vacinados com a Bm86 resultou em um índice de proteção de 99%, comparando-se ao grupo controle. Em outro experimento de vacinação de bovinos utilizando-se a Bm86 (PIPANO *et al.*, 2003), nenhum *R. annulatus* nos estádios de

ninfa e adulto foi recuperado nos animais imunizados. No grupo controle (bovinos não imunizados), a infestação resultou em números de teleóginas que variaram de 1380 a 4653. Observou-se também nesse experimento que os bovinos infestados com progênie das fêmeas de *R. annulatus* infectadas com *Babesia bigemina* não foram infectados por esse hemoparasita. Desde que a *B. bigemina* é transmitida exclusivamente por estádios de ninfa do *R. annulatus*, esses resultados suportam a observação que a imunidade induzida pela vacinação com a Bm86 afeta a fisiologia das larvas e/ou das ninfas. CANALES *et al.* (2009) demonstraram que a Ba86 (proteína ortóloga da Bm86 de *R. annulatus*) é eficaz tanto no controle da infestação de *R. annulatus* como de *R. microplus*. No caso dos bovinos infestados com *R. microplus*, levando-se em conta os parâmetros biológicos de número de teleóginas, oviposição e fertilidade dos ovos, a eficácia total da vacinação com a Ba86 foi de 71%. Em outro estudo (DE VOS *et al.*, 2001), bovinos vacinados com a Bm86 foram testados frente a infestações com diferentes espécies de carrapatos. Para infestações com *R. microplus* e *R. decoloratus*, a capacidade reprodutiva foi reduzida em 74% e 70%, respectivamente. Ninfas de *Hyalomma anatolicum anatolicum* tiveram seu peso de ingurgitamento reduzido em 50%. Quando os bovinos foram infestados com *Hyalomma dromedarii*, houve uma redução de 95% no número de ninfas ingurgitadas e uma posterior redução de 55% no peso dos carrapatos que finalizaram o engurgitamento. ODONGO *et al.* (2007) demonstraram que anticorpos gerados através da vacinação de bovinos com a Bm86 possuem reatividade cruzada com a homóloga da Bm86 de *R. decoloratus*. Quando esse carrapato alimentou-se nos bovinos vacinados, houve uma diminuição estatisticamente significativa do peso médio das teleóginas e do peso médio dos ovos postos. Em outro experimento de proteção cruzada (TRIMNELL *et al.*, 2005), cobaios foram imunizados com uma proteína do cemento do carrapato *R. appendiculatus* e desafiados com ninfas e

adultos de *R. sanguineus* and *Ixodes ricinus*. Os cobaios imunizados desenvolveram uma resposta imune protetora do tipo humoral e celular, aparentemente contra o intestino e a glândula salivar dos carrapatos infestados.

Estudos comprovam o potencial de uma vacina contendo uma GST heteróloga na indução de uma proteção cruzada contra helmintos (RATHAUR *et al.*, 2008; PREYAVICHYAPUGDEE *et al.*, 2008). Apesar disso, as GSTs de carrapatos ainda não tinham sido testadas como imunógeno em um ensaio vacinal. Embasados nesses e em outros experimentos de vacinação que demonstram o potencial da GST como indutora de uma resposta imune protetora nos hospedeiros contra diversos parasitas (SEXTON *et al.*, 1990; MORRISON *et al.*, 1996; BUSHARA *et al.*, 1993; BOULANGER *et al.*, 1999; BOULANGER *et al.*, 1998; RAO *et al.*, 2003), testou-se o potencial da GST recombinante do carrapato *H. longicornis* no controle da infestação pelo carrapato *R. microplus* em bovinos. A escolha pela GST de *H. longicornis* em detrimento a GST de *R. microplus* deveu-se a testes de imunogenicidade em camundongos (UTIUMI, 2008). Esse estudo revelou que a inoculação de camundongos com a rGST de *R. microplus* não induz a produção de anticorpos contra essa proteína, não sendo, portanto, imunogênica nas condições testadas. Diferentemente, camundongos inoculados com a rGST de *H. longicornis* produziram anticorpos anti-rGST-HI, demonstrando a maior imunogenicidade da GST heteróloga nesses animais. Devido a sua maior imunogenicidade em camundongos, a rGST-HI foi escolhida para a imunização de bovinos, a fim de induzir uma maior produção de anticorpos pelo sistema imunológico desses animais.

No início do experimento de vacinação dos bovinos com a rGST-HI, as inoculações continham o adjuvante Marcol-Montanide, devido ao fato de que em testes de imunização de camundongos (UTIUMI, 2008), o uso desse adjuvante resultou em

uma maior produção de anticorpos, além deste ser o adjuvante de uso comercial em bovinos. Contudo, após a quarta inoculação, saponina foi adicionada aos inóculos para aumentar a resposta imune contra a rGST-HI, devido ao efeito sinérgico entre a saponina e o adjuvante (RAMAN *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2009). O uso de saponina conjuntamente com outros adjuvantes potencializa a resposta imune, como demonstrado em suínos e bovinos vacinados para a febre aftosa (SMITSAART *et al.*, 2004). Os níveis de anticorpos aumentaram quando os animais foram inoculados com formulações vacinais contendo saponina.

A análise por Western blot do soro dos bovinos imunizados com a rGST-HI e dos bovinos controles (inoculados com PBS) revelou uma diferença entre os grupos nos níveis de anticorpos que reagem contra a rGST-HI. O Western blot também revelou a presença de anticorpos anti-rGST-HI antes e após o período de infestação. Nenhum sinal anti-rGST-HI foi detectado nos soros dos bovinos do grupo controle. A presença de anticorpos anti-rGST-HI é detectável até o final da fase de infestação, o que sugere que a imunização resultou no desenvolvimento de uma resposta imune de memória contra a proteína recombinante.

A transcrição do gene da GST e a presença da GST em vários tecidos (intestino, glândula salivar, singânglio, ovário e larva) já foram demonstradas para os carrapatos *H. longicornis* e *R. microplus* (HE *et al.*, 1999; ROSA DE LIMA *et al.*, 2002; DA SILVA VAZ JR. *et al.*, 2004b; DE FREITAS *et al.*, 2008). O soro dos bovinos inoculados com a rGST-HI reconhece, por Western blot, a GST-Bm nativa em tecidos de larva, ovário e glândula salivar. O soro pré-imune destes animais não reconhece a GST-Bm nativa em nenhum dos tecidos analisados. Esse resultado demonstra uma antigenicidade cruzada induzida pela inoculação da rGST-HI entre as GSTs nativas de *R. microplus* e a GST recombinante de *H. longicornis*. As áreas identificadas na análise *in silico*

provavelmente são responsáveis pela reatividade cruzada observada nas análises imunológicas. A capacidade de indução de uma imunidade cruzada é importante quando uma proteína recombinante de uma espécie de carrapato é candidata a antígeno no desenvolvimento de uma vacina para o controle de várias espécies de carrapato. Ainda, a combinação de proteínas expressadas em diferentes tecidos ou em diferentes fases do ciclo de vida do parasita pode resultar em uma vacina com uma proteção mais efetiva, pois diferentes estádios e/ou tecidos do carrapato estariam sendo afetados. Portanto, a expressão de GST em diferentes tecidos do carrapato pode constituir em uma vantagem estratégica no desenvolvimento de uma vacina contendo esse imunógeno.

Os bovinos vacinados com a rGST-HI mostraram uma redução de 53% e 52% no número e no peso de teleóginas, respectivamente. A postura de ovos e a eclodibilidade apresentaram uma redução de 0,6% e 8%, respectivamente. A eficácia total contra a infestação por esse carrapato foi de 57%. Entretanto, podemos constatar uma diferença estatisticamente significativa (teste-t, $p < 0,05$) entre os grupos controle e imunizado quando comparados a média do número de teleóginas coletadas diariamente durante o período de maior infestação do carrapato. Durante os dias de menor infestação, não houve diferença estatística entre os grupos, referente a média do número de teleóginas desprendidas diariamente. Ainda, em um dos bovinos do grupo vacinado, ocorreu uma disparidade na dinâmica de fêmeas que terminaram a alimentação. Nesse bovino, houve um aumento no número total de dias em que os carrapatos permaneceram se alimentando, além desses carrapatos demonstrarem uma dinâmica de infestação atípica, ocorrendo um segundo pico, bem menor, de queda de teleóginas após o número diário de teleóginas coletadas já estar diminuindo. Esses resultados demonstram que a inoculação de rGST-HI pode induzir uma imunidade protetora parcial nos bovinos.

Em relação aos parâmetros biológicos afetados no carrapato, resultados semelhantes foram obtidos em um experimento de vacinação de bovinos inoculados com a proteína subolesina com a posterior infestação por *R. microplus* (ALMAZÁN, 2009). Nesse teste, os parâmetros biológicos do carrapato foram estatisticamente afetados apenas no número total de teleóginas (redução de 43%), não apresentando diferenças significativas no peso médio das teleóginas, na oviposição e na taxa de eclodibilidade, quando comparados ao grupo controle. No presente estudo com a GST, apesar da diferença considerável entre os parâmetros biológicos calculados nos carrapatos que infestaram bovinos inoculados com a rGST-HI, essas diferenças não foram estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle. Esse resultado pode ser em consequência do pequeno número de bovinos utilizados por grupo e também da variabilidade da resposta individual entre os bovinos, como observado em outros experimentos de vacinação (ANDREOTTI, 2007; PIERCY *et al.*, 2007). A taxa de proteção conferida pela inoculação de rGST-HI observada nesse trabalho é similar a experimentos de vacinação com GSTs contra outros parasitas, tais como a *Taenia solium* (VIBANCO-PEREZ *et al.*, 1999), o *S. mansoni* (SCOTT & MCMANUS, 2000), o *Ancylostoma caninum* (ZHAN *et al.*, 2005) e o *Necatur americano* (ZHAN *et al.*, 2005). Nesses experimentos, tanto GSTs nativas quanto GSTs recombinantes foram usadas para os testes de vacinação.

O nível de proteção conferido pela inoculação de rGST-HI em bovinos não foi suficiente para indicar o uso dessa proteína recombinante em uma vacina constituída apenas por esse antígeno. Contudo, a rGST-HI pode ser considerada como um antígeno em potencial para se tornar parte de uma vacina multiantigênica contra o carrapato *R. microplus*, conjuntamente com outros antígenos já caracterizados, como a Bm86 (DE LA FUENTE *et al.*, 1999), a BYC (LEAL *et al.*, 2006) e a VTDCE (SEIXAS *et al.*,

2008). Como a resposta imune conferida pela imunização de bovinos com a GST-HI resultou na redução do desenvolvimento de carrapatos adultos, o uso dessa proteína em uma vacina conjuntamente com, por exemplo, a BYC, que afeta a capacidade reprodutiva do carrapato, pode potencializar a capacidade de proteção dessa vacina.

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, conclui-se que: bovinos imunizados com a rGST-HI desenvolvem uma resposta humoral para esta proteína recombinante, indicando que a rGST-HI é imunogênica para bovinos; a GST-Bm nativa de larva, ovário e glândula salivar foi reconhecida pelo soro de bovinos imunizados com a rGST-HI, indicando que os anticorpos gerados pela imunização com rGST-HI reconhecem GSTs nativas do *R. microplus*; a vacinação de bovinos com a rGST-HI conferiu uma imunidade protetora parcial contra o *R. microplus*, resultando na redução de 53,08% e 52,43% no número total de teleóginas e no peso total de teleóginas, respectivamente. A eficácia total da vacinação contra o *R. microplus* foi de 57,03%.

Como perspectivas, estamos planejando um teste da imunização de bovinos com uma combinação de rGST-HI, rBYC e rVTDCE visando-se o desenvolvimento de uma vacina para controlar a infestação do carrapato *R. microplus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, J. R. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. *Experimental and Applied Acarology*, 7(1): 5-13, 1989.
- ALLEN, J. R. Host-Resistance to ectoparasites. *Revue scientifique et technique de l'Office international des épizooties*, 13(4): 1287-1303, 1994.
- ALMAZÁN, C.; LAGUNES, R.; VILLAR, M.; CANALES, M.; ROSARIO-CRUZ, R.; JONGEJAN, F. & DE LA FUENTE, J. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology Research* (no prelo).
- 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. M. & TANAKA, A. S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International Immunopharmacology*, 2(4): 557-563, 2002.
- ANDREOTTI, R. A synthetic bmti n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. *Experimental Parasitology*, 116(1): 66-70, 2007.
- BARRIGA, O. O. Evidence and mechanisms of immunosuppression in tick infestations. *Genetic Analysis-Biomolecular Engineering*, 15(3-5): 139-142, 1999.
- BASTIANI, M.; HILLEBRAND, S.; HORN, F.; KIST, T. B. L.; GUIMARAES, J. A. & TERMIGNONI, C. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(11): 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: 595-600, 2005.
- BOARD, P. G.; BAKER, R. T.; CHELVANAYAGAM, G. & JERMIIN, L. S. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochemical Journal*, 328: 929-935, 1997.
- BOULANGER, D.; WARTER, A.; SELLIN, B.; LINDNER, V.; PIERCE, R. J.; CHIPPAUX, J. P. & CAPRON, A. Vaccine potential of a recombinant glutathione S-transferase cloned from *Schistosoma haematobium* in primates experimentally infected with an homologous challenge. *Vaccine*, 17(4): 319-326, 1998.
- BOULANGER, D.; SCHNEIDER, D.; CHIPPAUX, J. P.; SELLIN, B. & CAPRON, A. *Schistosoma bovis*: vaccine effects of a recombinant homologous glutathione S-transferase in sheep. *International Journal for Parasitology*, 29(3): 415-418, 1999.
- BRUM J. G. W. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* Grimont *et al.*, 1981: etiopatogenia e sazonalidade. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1988.
- BUSHARA, H. O.; BASHIR, M. E. N.; MALIK, K. H. E.; MUKHTAR, M. M.; TROTTEIN, F.; CAPRON, A. & TAYLOR, M. G. Suppression of *Schistosoma bovis* egg-production in cattle by vaccination with either glutathione-S-transferase or keyhole limpet hemocyanin. *Parasite Immunology*, 15(7): 383-390, 1993.
- CANALES, M.; ALMAZAN, C.; NARANJO, V.; JONGEJAN, F. & DE LA FUENTE, J. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86,

- protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *Bmc Biotechnology*, 9, 2009.
- 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(1): 40-46, 2006.
- CORDOVÉS, C. O. *Carrapato: controle ou erradicação*. Alegrete: Gralha, 1996.
- DA SILVA VAZ JR., I.; MARTINEZ, R. H.; OLIVEIRA, A.; HECK, A.; LOGULLO, C.; GONZALES, J. C.; DEWES, H. & MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Veterinary Parasitology*, 62(1-2): 155-160, 1996.
- DA SILVA VAZ JR., I.; LOGULLO, C.; 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(3-4): 331-341, 1998.
- DA SILVA VAZ JR., I.; TORINO, L. T.; MICHELON, A.; SANCHEZ FERREIRA, C. A.; JOAQUIM DE FREITAS, D. R.; TERMIGNONI, C. & MASUDA, A. Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*, 119(2-3): 237-245, 2004a.
- DA SILVA VAZ JR., I.; IMAMURA, S.; OHASHI, K. & ONUMA, M. Cloning, expression and partial characterization of a *Haemaphysalis longicornis* and a *Rhipicephalus appendiculatus* glutathione S-transferase. *Insect Molecular Biology*, 13(3): 329-335, 2004b.

- DANIELSON, U. H. & MANNERVIK, B. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. *Biochemical Journal*, 231(2): 263-267, 1985.
- DAVEY, R. B. & GEORGE, J. E. *In vitro* and *in vivo* evaluations of a strain of *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae) selected for resistance to permethrin. *Journal of Medical Entomology*, 35(6): 1013-1019, 1998.
- DE FREITAS, D. R. J.; VAZ, I. D. & MASUDA, A. Expression and enzymatic activity of glutathione s-transferase in tissues of *Boophilus microplus* females. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 17(2): 99-104, 2008.
- DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ, M.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; GARCIA-GARCIA, J. C.; MENDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDES, M.; ENRIQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUE, O.; MACHADO, H. & LLEONART, R. Vaccination against ticks (*Boophilus spp.*): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac (TM). *Genetic Analysis-Biomolecular Engineering*, 15(3-5): 143-148, 1999.
- DE VOS, S.; ZEINSTRA, L.; TAOUFIK, A.; WILLADSEN, P. & JONGEJAN, F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Experimental and Applied Acarology*, 25(3): 245-261, 2001.
- DING, Y. C.; ORTELLI, F.; ROSSITER, L. C.; HEMINGWAY, J. & RANSON, H. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *Bmc Genomics*, 4, 2003.
- DIRR, H.; REINEMER, P. & HUBER, R. Refined crystal-structure of porcine class-pi glutathione-S-transferase (Pgst P1-1) at 2-center-dot-1 a-angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology*, 243(1): 72-92, 1994.

- DIXON, D. P.; LAPHORN, A. & EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3: REVIEWS3004, 2002.
- DUCORNEZ, S.; BARRE, N.; MILLER, R. J. & DE GARINE-WICHATITSKY, M. Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test. *Veterinary Parasitology*, 130(3-4): 285-292, 2005.
- 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(5): 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.
- FERREIRA, C. A. S.; VAZ, I. D.; 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(1): 25-34, 2002a.
- FERREIRA, C. A. S.; BARBOSA, M. C.; SILVEIRA, T. C. L.; VALENZUELA, J. G.; VAZ, I. D. & MASUDA, A. cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. *Parasitology*, 125: 265-274, 2002b.
- FRAGOSO, H.; RAD, P. H.; ORTIZ, M.; RODRIGUEZ, M.; REDONDO, M.; HERRERA, L. & DE LA FUENTE, J. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle, vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *Vaccine*, 16(20): 1990-1992, 1998.
- FRANCISCHETTI, I. M. B.; SA-NUNES, A.; MANS, B. J.; SANTOS, I. M. & RIBEIRO, J. M. C. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience*, 14: 2051-2088, 2009.

- FRAZZON, A. P. G.; VAZ, I. D.; MASUDA, A.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94(1-2): 117-125, 2000.
- GARCIA-GARCIA, J. C.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; VARGAS, M.; CANALES, M.; BOUE, O.; RODRIGUEZ, M.; JOGLAR, M.; MACHADO, H.; GONZALEZ, I. L.; VALDES, M.; MENDEZ, L. & DE LA FUENTE, J. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*, 18(21): 2275-2287, 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.
- GONZALES, J.C. *O controle do carrapato do boi*. 2ed. Porto Alegre, Edição do autor, 1995.
- GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA BORJA, G. E. & PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, 21(125): 8-10, 2002.
- HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U. & JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 45: 51-88, 2005.
- HE, H. Q.; CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W. & GEORGE, J. E. Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(8): 737-743, 1999.

- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Pecuária Municipal- 2007- 2008. [online] Disponível na internet via WWW. URL: <http://www.ibge.gov.br>. Arquivo capturado em 16 de dezembro de 2009.
- JAMROZ, R. C.; GUERRERO, F. D.; PRUETT, J. H.; OEHLER, D. D. & MILLER, R. J. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Journal of Insect Physiology*, 46(5): 685-695, 2000.
- JOHNSTON, L. A. Y.; KEMP, D. H. & PEARSON, R. D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks - effects of induced immunity on tick populations. *International Journal for Parasitology*, 16(1): 27-34, 1986.
- 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(1-2): 79-92, 2000.
- 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(1-2): 1-10, 2006.
- KAWALEK, J. C.; REW, R. S. & HEAVNER, J. Glutathione-S-transferase, a possible drug-metabolizing enzyme, in *Haemonchus contortus* - comparative activity of a cambendazole-resistant and a susceptible strain. *International Journal for Parasitology*, 14(2): 173-175, 1984.
- KETTERMAN, A. J.; PROMMEENATE, P.; BOONCHAUY, C.; CHANAMA, U.; LEETACHEWA, S.; PROMTET, N. & PRAPANTHADARA, L. Single amino acid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(1): 65-74, 2001.

- KOCAN, K. M. Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. *Veterinary Parasitology*, 57(1-3): 121-151, 1995.
- LE GOFF, G.; HILLIOU, F.; SIEGFRIED, B. D.; BOUNDY, S.; WAJNBERG, E.; SOFER, L.; AUDANT, P.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. & FEYEREISEN, R. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: Sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(8): 674-682, 2006.
- LEAL, A. T.; SEIXAS, A.; POHL, P. C.; FERREIRA, C. A. S.; LOGULLO, C.; OLIVEIRA, P. L.; FARIAS, S. E.; TERMIGNONI, C.; VAZ, I. D. & MASUDA, A. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(3-4): 341-345, 2006.
- LEE, A. J.; HUNTLEY, J.; VAN DEN BROEK, A.; COATES, D. & ISAAC, R. E. Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*, 105(1): 49-63, 2002.
- LI, A. Y.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J. & GEORGE, J. E. Mode of inheritance of amitraz resistance in a Brazilian strain of the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 37(3-4): 183-198, 2005.
- LOGULLO, C.; VAZ, I. S.; SORGINE, M. H.; PAIVA-SILVA, G. O.; FARIA, F. S.; ZINGALI, R. B.; DE LIMA, M. F.; 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(6): 525-532, 1998.

- MANERVICK, B. & WIDERSTEN, M. Human glutathione transferases: tissue distribution, structure and functional properties. *Advances in Drug Metabolism in Man. G. Pacific, and Fracchia* (Eds). EUR 15439, ECDGX11-E4, 408-459, 1995.
- MARTINS, J. R. & FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *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.
- MCGOWAN, M. J.; HOMER, J. T.; ODELL, G. V.; MCNEW, R. W. & BARKER, R. W. Performance of ticks fed on rabbits inoculated with extracts derived from homogenized ticks *Amblyomma maculatum* koch (Acarina, Ixodidae). *Journal of Parasitology*, 66(1): 42-48, 1980.
- MILLER, C. M. D.; HOWELL, M. J. & BORAY, J. C. Glutathione S-transferases as markers of salicylanilide resistance in isolates of *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology*, 24(4): 533-542, 1994.
- MORRISON, C. A.; COLIN, T.; SEXTON, J. L.; BOWEN, F.; WICKER, J.; FRIEDEL, T. & SPITHILL, T. W. Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine*, 14(17-18): 1603-1612, 1996.
- MURRELL, A. & BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari : Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56(3): 169-172, 2003.
- NOLAN, J.; WILSON, J. T.; GREEN, P. E. & BIRD, P. E. Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Australian Veterinary Journal*, 66(6): 179-182, 1989.

- 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(2): 489-505, 1983.
- NUTTALL, P. A. & LABUDA, M. Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface. *Flaviviruses: Pathogenesis and Immunity*, 60: 233-272, 2004.
- NUTTALL, P. A.; TRIMNELL, A. R.; KAZIMIROVA, M. & LABUDA, M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*, 28(4): 155-163, 2006.
- ODONGO, D.; KAMAU, L.; SKILTON, R.; MWAURA, S.; NITSCH, C.; MUSOKE, A.; TARACHA, E.; DAUBENBERGER, C. & BISHOP, R. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. *Vaccine*, 25(7): 1287-1296, 2007.
- PATARROYO, J. H.; PORTELA, R. W.; DE CASTRO, R. O.; PIMENTEL, J. C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; VARGAS, M. I.; PRATES, A. A. & MENDES, M. A. D. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88(3-4): 163-172, 2002.
- PIERCY, J.; WERLING, D. & COFFEY, T. J. Differential responses of bovine macrophages to infection with bovine-specific and non bovine specific mycobacteria. *Tuberculosis*, 87: 415-420, 2007.
- PIPANO, E.; ALEKCEEV, E.; GALKER, F.; FISH, L.; SAMISH, M. & SHKAP, V. Immunity against *Boophilus annulatus* induced by the Bm86 (Tick-GARD) vaccine. *Experimental and Applied Acarology*, 29(1-2): 141-149, 2003.

- PREYAVICHYAPUGDEE, N.; SAHAPHONG, S.; RIENGROJPITAK, S.; GRAMS, R.; VIYANANT, V. & SOBHON, P. *Fasciola gigantica* and *Schistosoma mansoni*: Vaccine potential of recombinant glutathione S-transferase (rFgGST26) against infections in mice. *Experimental Parasitology*, 119(2): 229-237, 2008.
- PRUETT, J. H. & POUND, J. M. Biochemical diagnosis of organophosphate-insensitivity with neural acetylcholinesterase extracted by sonication from the adult tick synganglion. *Veterinary Parasitology*, 135(3-4): 355-363, 2006.
- RAKOTONDRAVELO, M. L.; ANDERSON, T. D.; CHARLTON, R. E. & ZHU, K. Y. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(3): 360-366, 2006.
- RAMAN, M.; RAMADASS, P. & RAJAVELU G. Evaluation of Saponin and Montanide ISA 50 adjuvants for their immunopotency and effect on humoral immune response of calves to purified midgut antigen of *Boophilus microplus*. *Veterinarski Arhiv* 74 (2), 129-140, 2004.
- RAO, K. V. N.; HE, Y. X. & KALYANASUNDARAM, R. Expression of a 28-kilodalton glutathione S-transferase antigen of *Schistosoma mansoni* on the surface of filamentous phages and evaluation of its vaccine potential. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(4): 536-541, 2003.
- RATHAUR, S.; YADAV, M.; GUPTA, S.; ANANDHARAMAN, V. & REDDY, M. V. Filarial glutathione-S-transferase: A potential vaccine candidate against lymphatic filariasis. *Vaccine*, 26(32): 4094-4100, 2008.
- RENARD, G.; GARCIA, J. F.; CARDOSO, F. C.; RICHTER, M. F.; SAKANARI, J. A.; OZAKI, L. S.; TERMIGNONI, C. & MASUDA, A. Cloning and functional

- expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(11): 1017-1026, 2000.
- RENARD, G.; LARA, F. A.; DE CARDOSO, F. C.; MIGUENS, F. C.; NSAPETRETSKI, M.; TERMIGNONI, C. & MASUDA, A. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Molecular Biology*, 11(4): 325-328, 2002.
- RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in tick host interactions. *Experimental & Applied Acarology*, 7(1): 15-20, 1989.
- ROBERTS, J. A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini) .2. Stages of life cycle of parasite against which resistance is manifest. *Journal of Parasitology*, 54(4): 667-673, 1968.
- ROBERTS, J. A. & KERR, J. D. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. *Journal of Parasitology*, 62(3): 485-488, 1976.
- ROCHA, C. M. B. M. Aspectos relevantes da biologia do *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887). Lavras: UFLA, 1997. *Boletim técnico: série Extensão da Universidade Federal de Lavras*, ano VII, 1998.
- RODRIGUEZ, M.; MASSARD, C. L.; DA FONSECA, A. H.; RAMOS, N. F.; MACHADO, H.; LABARTA, V. & DE LAFUENTE, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross bred cattle in Brazil. *Vaccine*, 13(18): 1804-1808, 1995.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; ONSO-DIAZ, M. A.; RODRIGUEZ-AREVALO, F.; FRAGOSO-SANCHEZ, H.; SANTAMARIA, V. & ROSARIO-CRUZ, R. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance

- in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 136(3-4): 335-342, 2006.
- ROSA DE LIMA, M. F.; SANCHEZ FERREIRA, C. A.; JOAQUIM DE FREITAS, D. R.; VALENZUELA, J. G. & MASUDA, A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(7): 747-754, 2002.
- RUIZ, L. M.; ARMENGOL, G.; HABEYCH, 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(4): 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(1): 53-62, 2001.
- SAMISH, M. & GLAZER, I. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends in Parasitology*, 17(8): 368-371, 2001.
- SCOTT, J. C. & MCMANUS, D. P. Molecular cloning and enzymatic expression of the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma japonicum*: Evidence for sequence variation but lack of consistent vaccine efficacy in the murine host. *Parasitology International*, 49(4): 289-300, 2000.
- SEIFERT, G. W.; SPRINGEL, P. H. & TATCHELL, R. J. Radioactive studies on feeding of larvae nymphs and adults of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*, 58: 415-430, 1968.
- SEIXAS, A.; DOS SANTOS, P. C.; VELLOSO, F. F.; VAZ, I. D.; MASUDA, A.; HORN, F. & TERMIGNONI, C. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*, 126: 155-163, 2003.

- SEIXAS, A.; LEAL, A. T.; NASCIMENTO-SILVA, M. C. L.; MASUDA, A.; TERMIGNONI, C. & VAZ, I. D. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124(3-4): 332-340, 2008.
- SEXTON, J. L.; MILNER, A. R.; PANACCIO, M.; WADDINGTON, J.; WIJFFELS, G.; CHANDLER, D.; THOMPSON, C.; WILSON, L.; SPITHILL, T. W.; MITCHELL, G. F. & CAMPBELL, N. J. Glutathione-S-transferase - Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Journal of Immunology*, 145(11): 3905-3910, 1990.
- SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M. & DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360: 1-16, 2001.
- SMITSAART, E.; ESPINOZA, A. M.; SANGUINETTI, R.; FILIPPI, J.; HAM, A. & BELLINZONI, R. Addition of saponin to double oil emulsion FMD vaccines enhances specific antibody responses in cattle and pigs. *Report of the Session of the FAO Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease*, 344-351, 2004.
- SONENSHINE, D. E. Biology of Ticks. Oxford, UK, *Oxford University Press*, 1991.
- SONENSHINE, D. E. Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. *Parasitology*, 129: S405-S425, 2004.
- SONG, X. M.; BAO, S. J.; WU, L. H. & HU, S. H. Ginseng stem-leaf saponins (GSLs) and mineral oil act synergistically to enhance the immune responses to vaccination against foot-and-mouth disease in mice. *Vaccine*, 27(1): 51-55, 2009.

- SORGINE, M. H. F.; LOGULLO, C.; ZINGALI, R. B.; PAIVA-SILVA, G. O.; JULIANO, L. & OLIVEIRA, P. L. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37): 28659-28665, 2000.
- SUTHERST, R. W.; JONES, R. J. & SCHNITZERLING, H. J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. *Nature*, 295(5847): 320-321, 1982.
- SUTHERST, R. W.; MAYWALD, G. F.; KERR, J. D. & STEGEMAN, D. A. The effect of cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* X *Bos taurus* Steers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34(3): 317-327, 1983.
- 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(2): 193-200, 2006.
- TATCHELL, R. J. Interactions between ticks and their hosts. *International Journal for Parasitology*, 17(2): 597-606, 1987.
- 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(1-2): 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(34): 4329-4341, 2005.
- URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M. & JENNINGS, F.W. *Parasitologia Veterinária*. 2a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998.

- UTIUMI, K. U. Avaliação da resposta imune humoral em camundongos para a proteína Glutathione S-transferase de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (GST-Bm), e de *Haemaphysalis longicornis* (GST-HI). Dissertação de Mestrado. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- VALENZUELA, J. G. Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. *Parasitology*, 129: S83-S94, 2004.
- VIBANCO-PEREZ, N.; JIMENEZ, L.; MERCHANT, M. T. & LANDA, A. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *Journal of Parasitology*, 85(3): 448-453, 1999.
- VONTAS, J. G.; SMALL, G. J.; NIKOU, D. C.; RANSON, H. & HEMINGWAY, J. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal*, 362: 329-337, 2002.
- WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle .1. Responses of previously unexposed cattle to 4 infestations with 20,000 larvae. *Australian Journal of Agricultural Research*, 26(6): 1073-1080, 1975.
- WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. 3. Growth on previously unexposed animals. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29(2): 401-409, 1978.
- WEI, S. H.; CLARK, A. G. & SYVANEN, M. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(12): 1145-1153, 2001.

- WIKEL, S. K. & ALLEN, J. R. Acquired resistance to ticks .1. Passive transfer of resistance. *Immunology*, 30(3): 311-316, 1976.
- WIKEL, S. K. Immunological control of hematophagous arthropod vectors - Utilization of novel antigens. *Veterinary Parasitology*, 29(2-3): 235-264, 1988.
- WIKEL, S. K. Tick modulation of host cytokines. *Experimental Parasitology*, 84(2): 304-309, 1996.
- WIKEL, S. K. & BERGMAN, D. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*, 13(10): 383-389, 1997.
- WILLADSEN, P. & KEMP, D. H. Vaccination with concealed antigens for tick control. *Parasitology Today*, 4(7): 196-198, 1988.
- WILLADSEN, P.; SMITH, D.; COBON, G. & MCKENNA, R. V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunology*, 18(5): 241-246, 1996.
- WILLADSEN, P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary Parasitology*, 101(3-4): 353-367, 2001.
- 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.
- YOUNG, A. S. & MORZARIA, S. P. Biology of *Babesia*. *Parasitology Today*, 2: 211-219, 1986.
- YU, S. J. Biochemical characteristics of microsomal and cytosolic glutathione S-transferases in larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72(2): 100-110, 2002.

- ZHAN, B.; LIU, S.; PERALLY, S.; XUE, J.; FUJIWARA, R.; BROPHY, P.; XIAO, S. H.; LIU, Y. Y.; FENG, J. J.; WILLIAMSON, A.; WANG, Y.; BUENO, L. L.; MENDEZ, S.; GOUD, G.; BETHONY, J. M.; HAWDON, J. M.; LOUKAS, A.; JONES, K. & HOTEZ, P. J. Biochemical characterization and vaccine potential of a heme-binding glutathione transferase from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. *Infection and Immunity*, 73(10): 6903-6911, 2005.
- 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 of Parasitology*, 83(5): 815-818, 1997.

ANEXOS

ANEXO A

Artigo publicado no periódico *Veterinary Parasitology*, 164: 282-290, 2009.

**Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* calreticulins**

Luís Fernando Parizi, Herbert Rech, Carlos Alexandre Sanchez Ferreira, Saiki Imamura,
Kazuhiko Ohashi, Misao Onuma, Aoi Masuda e Itabajara da Silva Vaz Jr.

Trabalho realizado entre 2005 e 2007.

Colaboração dos autores para o trabalho:

Luís Fernando Parizi: Clonagem do gene da HICRT, expressão e purificação da HICRT recombinante. Preparação do extrato de larva. Imunização de bovinos e camundongos com a rHICRT. Análises por ELISA, SDS-PAGE e Western blot.

Herbert Rech: Clonagem do gene da BmCRT. Expressão e purificação da BmCRT recombinante. Preparação do extrato de larva. Imunização de bovinos e camundongos com a rBmCRT. Análises por ELISA, SDS-PAGE e Western blot.

Carlos Alexandre Sanchez Ferreira: Clonagem do gene da BmCRT. Imunização de bovinos com saliva e extrato de glândula salivar.

Saiki Imamura: Clonagem do gene das HICRT e BmCRT.

Itabajara da Silva Vaz Junior: Clonagem dos gene das HICRT e BmCRT. Análise filogenética e da antigenicidade da HICRT e BmCRT. Orientação na execução dos experimentos.

Misao Onuma, Kazuhiko Ohashi e Aoi Masuda: Orientação na execução dos experimentos.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* calreticulins

Luís Fernando Parizi^{a,b}, Herbert Rech^{a,b}, Carlos Alexandre Sanchez Ferreira^{a,e}, Saiki Imamura^d, Kazuhiko Ohashi^d, Misao Onuma^d, Aoi Masuda^{a,c}, Itabajara da Silva Vaz Jr^{a,b,*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil

^b Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Department of Infectious Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan

^e Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 December 2008

Received in revised form 7 April 2009

Accepted 22 May 2009

Keywords:

Vaccine

Control

*Rhipicephalus microplus**Haemaphysalis longicornis*

Vaccination

Calreticulin

ABSTRACT

The ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemaphysalis longicornis* are blood-sucking ectoparasites of bovines, causing serious damages to the livestock production. The main control method for these ticks is based on acaricides. However, the use of vaccines has been studied as a promising control strategy. Calreticulin (CRT) is a multifunctional, predominantly intracellular 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 *H. longicornis* (rHICRT) were expressed in *Escherichia coli* and purified by ion exchange chromatography and used for the immunization of bovines and mouse. ELISA demonstrated that both rCRTs are recognized by the sera of immunized bovines. *In silico*, despite the difference in amino acid sequences, antigenic index analysis of HICRT and BmCRT using the Jameson–Wolf algorithm indicated that both proteins were very similar in antigenicity index, although six different epitopes between the tick CRTs have been inferred. These data were corroborated by competitive ELISA analyses, which suggest the presence of different epitopes within the proteins. Western blot analyses showed that anti-rBmCRT and anti-rHICRT bovine sera also recognized the native proteins in larvae extracts and, moreover, sera of bovines immunized with saliva and extract of salivary glands recognized both recombinant CRTs. Thus, mouse and bovine immune system recognized rCRTs, resulting in the production of antibodies with similar specificity for both recombinant proteins, although different epitopes could be distinguished between rBmCRT and rHICRT.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemaphysalis longicornis* are blood-sucking ectoparasites of bovines, causing serious damages to the livestock production. The tick *H. longicornis* is distributed mainly in East Asia and Australia, where it transmits a wide range of pathogens, including *Theileria* spp., *Babesia ovata*, *Babesia gibsoni* and *Rickettsia japonica* (Fujisaki et al., 1994;

* Corresponding author at: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Porto Alegre 91501-970, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 6078; fax: +55 51 3308 7309.

E-mail address: Itabajara.vaz@ufrgs.br (I. da Silva Vaz Jr).

Jongejan and Uilenberg, 2004). *R. microplus* is a one-host tick that usually infests cattle and is responsible for economic losses that range over hundreds of millions of dollars per year (Guerrero et al., 2006). However, despite the importance of ticks as parasites and vectors of diseases, very little is known about these parasitic relationships and their basic biology. Also, the mechanisms by which cellular and humoral immune responses of the hosts damage ticks are not fully understood. This knowledge is important for the determination of host–pathogen interactions that allows parasite survival and facilitate or limit disease transmission (Jaworski et al., 1995; Willadsen, 2006a; Gao et al., 2007). Host immune responses to ixodidae ticks are acquired through either tick infestation or artificial immunization with tick antigens. These immune responses affect feeding, reproduction, and survival of the ticks (Szabo et al., 1995; Szabo and Bechara, 1997; Kotsyfakis et al., 2007). In the development of host resistance, antibody responses have been shown to be important in this mechanism (Kashino et al., 2005; Willadsen, 2006a; Wikel and Allen, 1976). An anti-tick vaccine is probably the most promising method to control the parasite, but the success of this strategy is dependent on the characterization of the roles of essential tick molecules in the arthropod physiology. Due to the importance of saliva in blood feeding, host immunity and pathogen transmission, the characterization of saliva molecules may improve our knowledge on the mechanisms involved in tick–host interaction and the way through which these mechanisms could be inhibited, and therefore configure potential vaccine candidates. Salivary secretions are well recognized to perform such modulatory events in the tick–host relationship (Ribeiro, 1989; Wikel, 1999; Ciprandi et al., 2003; Steen et al., 2006), but the purification and further characterization of these activities are often unfeasible, due to the small amounts of saliva that are available from ticks. An alternative approach is the identification of tick salivary genes in bacterial expression systems and the search for their biological functions using recombinant proteins. Calreticulin (CRT) is a calcium-binding protein present in almost all cells of animals and known to perform several functions in mammals (Michalak et al., 1992, 1999; Gold et al., 2006). CRT is also secreted by ticks into their hosts (Jaworski et al., 1995; Ferreira et al., 2002). The presence of calreticulin in tick saliva (Jaworski et al., 1995; Ferreira et al., 2002) and other parasite secretions (Kasper et al., 2001; Suchitra and Joshi, 2005; Cabezon et al., 2008) suggests a role for this protein in feeding, host immunosuppression and antihemostasis. As CRTs show a high degree of conservation, we hypothesized that CRT of *H. longicornis* (HICRT) could stimulate a humoral response that would also be able to recognize the CRT of *R. microplus* (BmCRT), and vice versa. This cross-species immunity could be useful for the development of a vaccine against multi-species tick infestations. The characterization of the recombinant forms of BmCRT (rBmCRT) and HICRT (rHICRT), like the studies of immunogenic potential of these proteins in bovines, could provide insights into the potential of CRTs as multi-species protective antigen. In this work, we report the isolation and characterization of the *H. longicornis*

cDNA sequence, as well as the cloning, expression and purification of the calreticulins from *H. longicornis* and *R. microplus*, and the analyses of the immunogenic potential of the recombinant proteins as multi-species cross-reactive antigen candidates.

2. Materials and methods

2.1. Cloning of HICRT and BmCRT

The HICRT coding region was amplified by PCR from a *H. longicornis* cDNA library (Mulenga et al., 1999) and cloned into the pGEM-T vector (Promega). The primers used in the process (sense, aaaaacatattggatcccaactgttacttcaa; antisense, aaaaaagcttttagtggtggtggtggtggtgcaactcttcgtgcttgg) were based on conserved regions of the *R. microplus* calreticulin gene (accession number AF420211). The amplified cDNA product was separated by agarose gel electrophoresis and purified by Glassmilk DNA purification kit (BIO 101 Systems). The HICRT cDNA was ligated into the pGEM-T vector, and transformed into DH5 α strain of *Escherichia coli*. The plasmids were purified and the nucleotide sequences of the inserts were determined on an 8-capillary Beckman CEQ2000 automated sequencer. The *H. longicornis* calreticulin sequence was deposited into GenBank (accession number FJ536258).

The coding sequence of mature HICRT was then cloned into pET-43a expression vector (Novagen). PCR was performed using pGEM/HICRT and primers containing restriction sites of NdeI and HindIII (sense, aaaaacatattggatcccaactgttacttcaa; antisense, aaaaaagcttttagtggtggtggtggtgcaactcttcgtgcttgg). Following cleavage and precipitation, amplicon and vector were ligated with T4 DNA ligase (Invitrogen) to give pET-43a/HICRT plasmid.

The BmCRT gene was isolated previously (Ferreira et al., 2002) and cloned in the pBluescript II (Stratagene) plasmid. This plasmid was used to amplify the coding sequence of mature BmCRT by PCR using primers containing restriction sites of NdeI and HindIII (sense, aaaaacatattggatcccaactgttacttcaa; antisense, aaaaaagcttttagtggtggtggtggtgcaactcttcgtgcttgg). Following cleavage and precipitation, amplicon and vector were ligated with T4 DNA ligase (Invitrogen) to give pET-5b/BmCRT plasmid.

The resulting plasmids were transformed by electroporation into XL1 Blue *E. coli* cells (Novagen) and selected in SOC medium containing ampicillin (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$), chloramphenicol (34 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and kanamycin (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$). The pET-43a/HICRT and pET-5b/BmCRT integrities were confirmed by DNA sequencing.

2.2. Phylogenetic analysis

Calreticulin sequences were aligned with the BmCRT and HICRT deduced protein sequences using BioEdit version 5.0.6 software program (Hall, 1999). An unrooted neighbor-joining phylogenetic tree was created using the MEGA version 4 (Tamura et al., 2007). Bootstrap support was assessed using 1000 replicates. The GenBank accession numbers for the species used in analysis were as follow: *H. longicornis*, FJ536258; *Homo sapiens*, AAH025; *Macaca mulatta*, XP001110174; *Mus musculus*, AAH03453;

Rattus norvegicus, AAH62395; *Bos taurus*, BAB86913; *Oryctolagus cuniculus*, AAB20096; *Gallus gallus*, AAS49610; *Amblyomma americanum*, AAR29932; *Dermacentor variabilis*, AAR29944; *R. microplus*, AAN03709; *Rhipicephalus sanguineus*, AAR29961; *Amblyomma scutum*, AAR29938; *H. leporispalustris*, AAR29947; *Ixodes parvicinus*, AAR29956; *I. ricinus*, AAR29958; *I. scapularis*, AAQ18696; *Necator americanus*, CAA07254 and *Haemonchus contortus*, AAR99585.

2.3. Jameson–Wolf analysis

The antigenic index analysis of HICRT and BmCRT was performed with the Jameson–Wolf algorithm by software LASERGENE version 8.0.2 to predict potential antigenic determinants by combining existing methods for protein structural predictions (Jameson and Wolf, 1988).

2.4. Expression of recombinant HICRT and BmCRT proteins

The recombinant plasmids pET-5b/BmCRT and pET-43a/HICRT were transformed into *E. coli* AD494 (DES) pLysS strain (Novagen). Recombinant *E. coli* were induced to grow in SOB medium containing ampicillin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$). Recombinant protein expression was induced with 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (at OD = 0.6) for 16 h at 23 °C (rHICRT) and 30 °C (rBmCRT). After, cells were harvested by centrifugation at $10,000 \times g$ for 10 min at 4 °C and resuspended in 50 ml of phosphate lysis buffer (10 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, pH 6.5). For cell lysis, the suspension was frozen, thawed out three times and sonicated five times for 30 s at 40 MHz on ice. The soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation at $10,000 \times g$ for 10 min at 4 °C and the soluble fractions were stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ prior to use.

2.5. Purification of rHICRT and rBmCRT

The soluble fractions containing the rBmCRT or rHICRT were purified by HiTrap Mono Q ion-exchange column chromatography following the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences). Briefly, the soluble fractions were filtered in 0.45- μm filters (Millipore) and then applied onto the columns previously equilibrated with phosphate lysis buffer. Proteins of interest were eluted with phosphate buffer with two concentrations of NaCl (10 mM sodium phosphate, 400 or 500 mM NaCl, pH 6.5) at room temperature with a flow rate of 0.5 ml/min. The purified protein fractions were dialyzed against phosphate buffer (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.2). Eluted fractions were concentrated (Centricon YM10–10,000 MW cut-off, Millipore) and analyzed following 12% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) stained with Coomassie blue G-250.

2.6. Animals

Hereford (*Bos taurus taurus*) cattle were acquired from a tick-free area, housed in individual tick-proof pens on slatted floors and maintained at the Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil. BALB/c mice used for immunizations were maintained at the

Animal Facility of Centro de Biotecnologia, UFRGS. Animal care was in accordance with institutional guidelines.

2.7. Larvae extract preparation

R. microplus were maintained on experimentally infested Hereford cattle and engorged adult female ticks were kept in Petri dishes at 28 °C and 85% relative humidity until completion of oviposition and, then, eggs were collected and incubated under the same conditions. Twenty-day-old larvae were disrupted and homogenized using a mortar and pestle on ice bath with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2. The homogenate was centrifuged at $16,000 \times g$ for 15 min at 4 °C to remove the insoluble material and the soluble supernatant fraction was collected. The protein extracts were prepared according to the method previously described (de Lima et al., 2002). The protein concentrations of the extracts were measured using the modified Bradford method with bovine serum albumin as standard.

2.8. Immunization of bovines and mice with rBmCRT and rHICRT

Groups of two mice were immunized individually with rHICRT or rBmCRT eluted with phosphate buffer plus NaCl 500 mM or phosphate buffer plus NaCl 400 mM. Immunizations were performed intraperitoneally with three doses of 100 μg of protein emulsified in Freund's incomplete adjuvant at 14-day intervals. Fourteen days after the last booster sera were collected.

Three bovines were immunized subcutaneously: bovine 1 (control) received an emulsion composed of 1 ml PBS plus 1 ml of oil adjuvant (Montanide 888 and Marcol 52) per dose; bovines 2 and 3 received emulsions composed of 1 ml of rBmCRT or rHICRT (fractions eluted with phosphate buffer plus NaCl 500 mM) solution in PBS (100 $\mu\text{g}/\text{dose}$) plus 1 ml adjuvant, respectively. The bovines received three doses, at 14-day intervals and sera were collected 14 days after each inoculation. The antibody kinetics of the sera was estimated by ELISA and the sera after the last immunization were used in all subsequent experiments.

2.9. Immunization with saliva and extract of salivary glands

Salivary glands extracts were obtained from partially engorged female ticks according to Vaz et al. (1994). Briefly, the dorsal surface was dissected and salivary glands were separated and washed in PBS. The tissues were sonicated and solubilized in 0.5% sodium deoxycolate, 0.1% pepstatin A, 0.1% leupeptin and 0.1 mM TPCK in 10 mM Tris buffer (pH 8.2). The material was centrifuged and supernatants were stored at $-70 \text{ }^\circ\text{C}$.

One bovine was immunized with one dose of 200 μg of partially engorged extract of salivary glands in 0.5 ml of PBS and mixed with an equal volume of Freund's complete adjuvant, followed by 7 further immunizations of 300–400 μg of partially engorged extract of salivary glands in 0.5 ml of PBS mixed with an equal volume of Freund's incomplete adjuvant. One bovine was immunized with one dose of 400 μl of partially engorged pilocarpine induced saliva mixed with an equal volume of Freund's complete

adjuvant, followed by 6 further immunizations of 400–600 μ l of partially engorged or fully engorged pilocarpine induced saliva mixed with an equal volume of Freund's incomplete adjuvant. Sera were collected 15 days after the last booster.

2.10. Serological analysis by ELISA

The bovine and mouse humoral responses were verified by ELISA and Western blot using rBmCRT or rHICRT as antigen. All sera were incubated for 1 h with *E. coli* extract to allow the absorption of anti-*E. coli* protein antibodies (Ferreira et al., 2002). For IgG titration, by ELISA, microplates were coated with 100 ng/well of rBmCRT or rHICRT (fractions eluted with phosphate buffer plus NaCl 500 mM) for 16 h at 4 °C with 50 mM carbonate–bicarbonate buffer pH 9.6. The two antigens were probed with sera of bovines immunized with rBmCRT or rHICRT and detected with rabbit anti-IgG bovine peroxidase conjugate. Development was performed with 10 ml of phosphate–citrate buffer containing 5 μ l of H₂O₂ and 3.2 mg of OPD. After 20 min, the reaction was stopped by the addition of H₂SO₄ 12.5% and the absorbance was measured at 490 nm. Sera were considered positive in ELISA when an OD value higher than the mean plus 2 SD of the OD showed from pre-immunization sera (control sera) was obtained.

Bovine sera and rBmCRT or rHICRT were used in competition ELISA. Microplates were coated with rBmCRT or rHICRT as described above, and increasing rBmCRT or rHICRT quantities (from 50 to 800 ng) were added. Sera diluted at 1:200 were added and incubated for 1 h. Positive signals were detected with bovine anti-IgG peroxidase conjugate and development was performed as described above. Each analysis was performed twice in duplicate.

2.11. SDS-PAGE and Western blot analyses

For Western blot analyses, proteins were separated by SDS-PAGE 12% and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was then cut into 5-mm-wide strips. The strips containing recombinant proteins were probed with sera of bovine or mouse immunized with the recombinant proteins.

Strips containing *R. microplus* larval extract were incubated with sera from bovines immunized with rHICRT or rBmCRT in order to test the recognition of native CRT. Also, strips containing the recombinant proteins were probed with sera from bovines immunized with saliva or extract of salivary glands of *R. microplus*.

After the serum incubations, the anti-IgG species-specific alkaline phosphatase conjugates were used as secondary antibodies and revelations were performed with NBT (nitro blue tetrazolium) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (Sigma).

3. Results

3.1. Sequences and phylogenetic analyses of CRTs

Sequences from *R. microplus* and *H. longicornis* calreticulins have 88.1% identity in the coding region. The

identities comparing CRT sequences of the ticks *R. sanguineus* and *A. americanum* for HICRT were, respectively, 87.9% and 97.8%, and for BmCRT were 88.3% and 90.3%. Sequence comparisons between other highly divergent parasite species such as *N. americanus* and *H. contortus* show 62.9% and 59.2% sequence identity to HICRT and 62.1% and 57.5% to BmCRT. Also, confirming the high conservation between CRT sequences of various species the comparison between the sequences of HICRT or BmCRT and tick host species (mammalian CRTs: mouse, rat, human, rabbit and bovine) show similar identities (around 62%).

A neighbor-joining tree constructed with CRTs sequences is shown in Fig. 1. The branches of the tree regarding the sequences of CRTs of ticks showed high bootstrap values. The HICRT and BmCRT sequences group with other tick sequences, while the host tick sequences clearly group outside the tick sequences. Interestingly, tick sequences group primarily with mammalian than with other invertebrate sequences.

3.2. Cloning, expression and purification of rCRTs

The cloning of the coding sequences of mature CRTs from *H. longicornis* and *R. microplus* were performed in pET (Novagen) expression vectors. The apparent molecular masses of rHICRT and rBmCRT were of approximately 55–60 kDa in SDS-PAGE (Fig. 2a). The bands visualized in SDS-PAGE were confirmed as rHICRT and rBmCRT proteins by Western blot with bovine anti-rHICRT serum (Fig. 2b).

The purifications of the rHICRT or rBmCRT were carried out by ion-exchange chromatography. Both proteins were eluted with phosphate buffer 10 mM containing 400 or 500 mM of NaCl. However, rHICRT or rBmCRT eluted with phosphate buffer plus NaCl 500 mM were shown to present a smaller number of bacterial protein bands in SDS-PAGE 12% stained with Coomassie Blue G-250, under denaturing conditions (data not shown). The recombinant proteins were further purified by gel filtration chromatography.

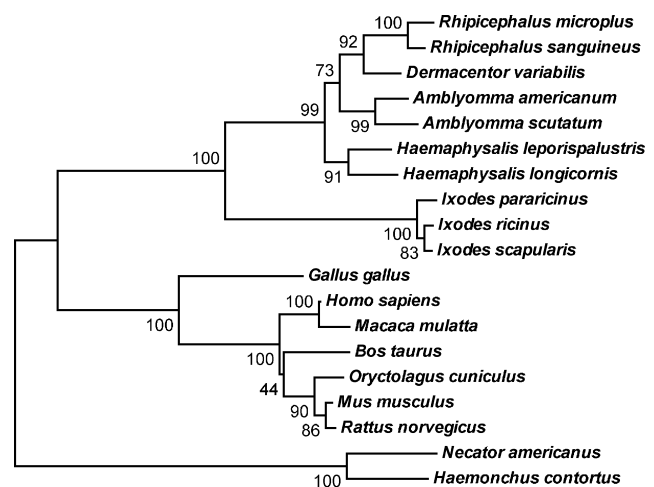


Fig. 1. Dendrogram based on CRT of *H. longicornis*, *R. microplus* and other selected eukaryotes. The tree is based on amino acid divergences between the full-length protein sequences. GenBank accession numbers for the sequences are in material and methods. Bootstrap values of 1000 simulations are shown at the branches.

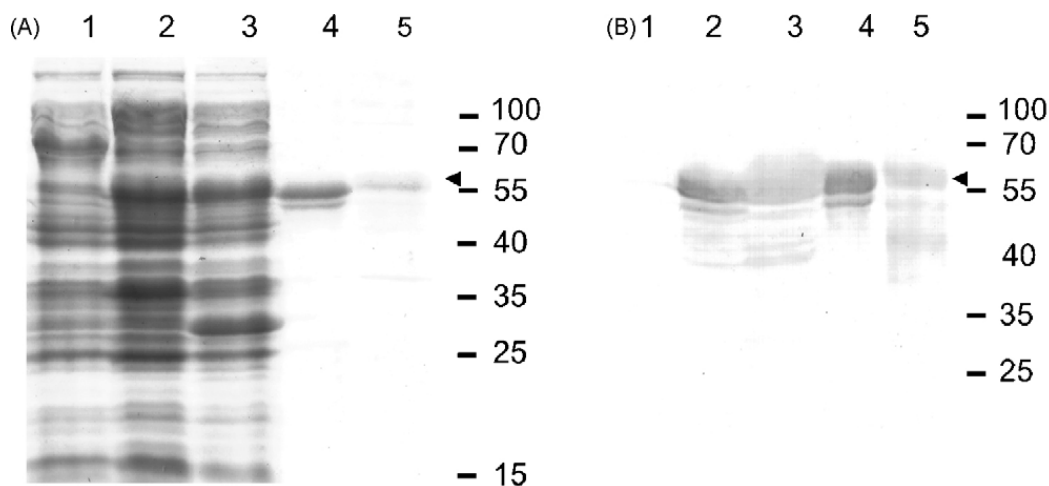


Fig. 2. SDS-PAGE 12% stained with Coomassie blue G-250 (A) and Western blot (B) of recombinant HICRT and BmCRT in bacterial extract and purified form. Lane 1, supernatant of pET-43a bacterial extract; lane 2, supernatant of pET-43a/HICRT bacterial extract; lane 3, supernatant of pET-5b/BmCRT bacterial extract; lane 4, purified rHICRT; lane 5, purified rBmCRT. Western blot probed with bovine rHICRT antiserum. Arrow indicates the 55–60 kDa bands representative of rHICRT and rBmCRT. Molecular mass standards are expressed in kDa.

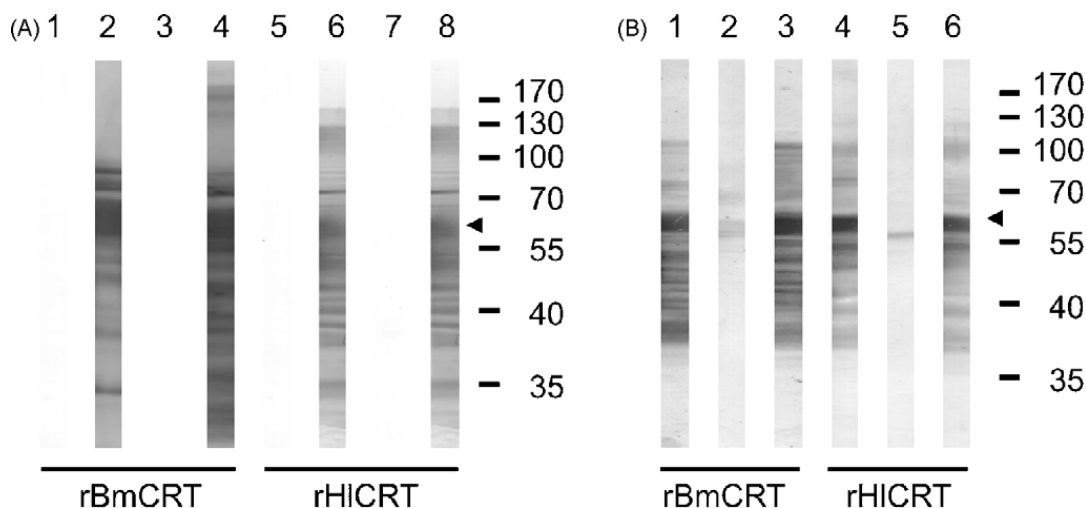


Fig. 3. Western blot analysis using sera from mice (A) and bovines (B) immunized with rBmCRT or rHICRT. (A) 1, mouse 1 pre-immune serum; 2, serum of mouse 1 immunized with rBmCRT eluted with 400 mM NaCl; 3, mouse 2 pre-immune serum; 4, serum of mouse 2 immunized with rBmCRT eluted with NaCl 500 mM; 5, mouse 3 pre-immune serum; 6, serum of mouse 3 immunized with rHICRT eluted with NaCl 400 mM; 7, mouse 4 pre-immune serum; 8, serum of mouse 4 immunized with rHICRT eluted with NaCl 500 mM. (B) 1 and 4, sera of bovines immunized with rHICRT; 2 and 5, sera of bovines inoculated with PBS; 3 and 6, sera of bovines immunized with rBmCRT. Molecular mass standards are expressed in kDa.

graphy and the collected fractions were analyzed by SDS-PAGE 12% (Fig. 2a) and Western blot using bovine anti-rHICRT serum (Fig. 2b), demonstrating the presence of molecules with compatible molecular masses for rHICRT and rBmCRT.

3.3. Immunogenicity of rHICRT and rBmCRT in mice and bovines

Sera of mice and bovines immunized with rHICRT or rBmCRT were used in Western blot analyses. Both NaCl-eluted (400 mM and 500 mM) fractions of both CRT proteins were recognized by sera from immunized bovines or mice (Fig. 3). In addition, sera from bovines immunized with rHICRT or rBmCRT also recognized BmCRT in extract of larvae of *R. microplus* (Fig. 4), which confirms that antibodies directed to recombinant proteins also recognize the native BmCRT.

A comparative recognition analysis was performed by ELISA, as can be seen in Fig. 5. The sera of bovines vaccinated with rHICRT or rBmCRT recognized both recombinant proteins. The titer of the bovine immunized with rBmCRT was 1500 for both proteins, while titers of 6000 and 1500 were obtained for the bovine immunized with rHICRT and tested against rHICRT and rBmCRT, respectively. The sera from the bovine inoculated with PBS during the immunization period did not recognize rBmCRT or rHICRT (data not shown).

3.4. HICRT and BmCRT display different epitopes

In silico analysis of HICRT and BmCRT by Jameson–Wolf index demonstrated various common areas and six different areas with antigenic index larger than 1 between the proteins HICRT and BmCRT (Fig. 6a). These data indicate that the two proteins present similar immuno-

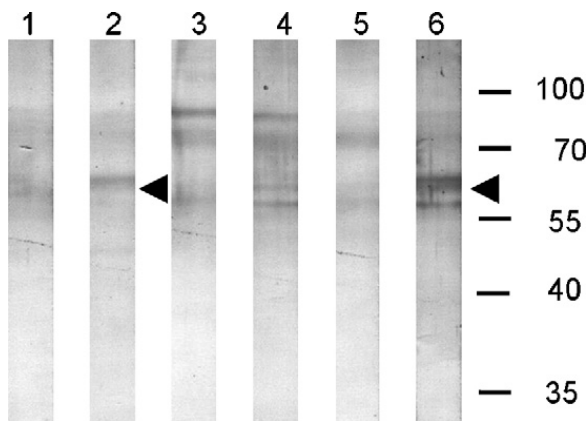


Fig. 4. Western blot analysis using sera of bovines immunized with rHICRT or rBmCRT against 20 days old larvae extract. (1) Pre-immune serum of bovine immunized with rHICRT; (2) serum of bovine immunized with rHICRT; (3) pre-immune serum of bovine mock immunized; (4) serum of bovine mock immunized; (5) pre-immune serum of bovine immunized with rBmCRT; (6) serum of bovine immunized with rBmCRT. Arrow indicates the 55–60 kDa bands representative of rHICRT and rBmCRT. Molecular mass standards are expressed in kDa.

genic potentials, but may also show different epitopes, which is corroborated by competition ELISA analysis, as seen in Fig. 6b. The competition of rBmCRT incubated with the serum of the bovine immunized with rHICRT occurs with less intensity than that of rHICRT incubated with the serum of the bovine immunized with rBmCRT, indicating the presence of different epitopes within the proteins (Fig. 6b).

3.5. Immunogenicity of native BmCRT

Extract of salivary glands and saliva of *R. microplus* were used to immunize bovines. The sera of the immunized bovines used in Western blot analyses, showed that the

immunizations of native and secreted BmCRT in the presence of adjuvant are able to induce the production of antibodies. Therefore, antibodies raised against native proteins recognize epitopes present in the recombinant forms (Fig. 7). On the other hand, sera from bovines naturally infested with *R. microplus* did not recognize the native or recombinant CRTs (data not shown).

4. Discussion

New tick control strategies have been widely promoted in response to concerns triggered by the emergence and spread of worldwide acaricide resistance. Experimental protection against tick infestation has been demonstrated in several host species; however, a limited immunity against tick infestation has been achieved with commercial vaccines (Imamura et al., 2005; Seixas et al., 2008). Notwithstanding, vaccination is one of the most promising methods of tick control (Willadsen, 2006b, 2008). Still, the success of this strategy depends on the identification and characterization of essential tick molecules whose impairment could be accomplished by antibody responses. Some tick saliva components are responsible for the inhibition and/or inactivation of specific functions of the host immune system (Lawrie et al., 2005) and homeostasis (Imamura et al., 2005; Ciprandi et al., 2006). In this context, it has been proposed that the secretion of CRT into the hosts may perform functions enabling the feed of blood-sucking parasites. The secreted CRT may prevent blood clotting by binding to Ca^{2+} and clotting factors (Suchitra and Joshi, 2005; Suchitra et al., 2008), and Ca^{2+} and its associated proteins are suggested to play important roles in the bovine anti-tick naturally acquired resistance (Bagnall et al., 2009). Data obtained indicate that some parasite CRTs bind to C1q (Kasper et al., 2001; Suchitra and Joshi, 2005), modulating the host's immune response and

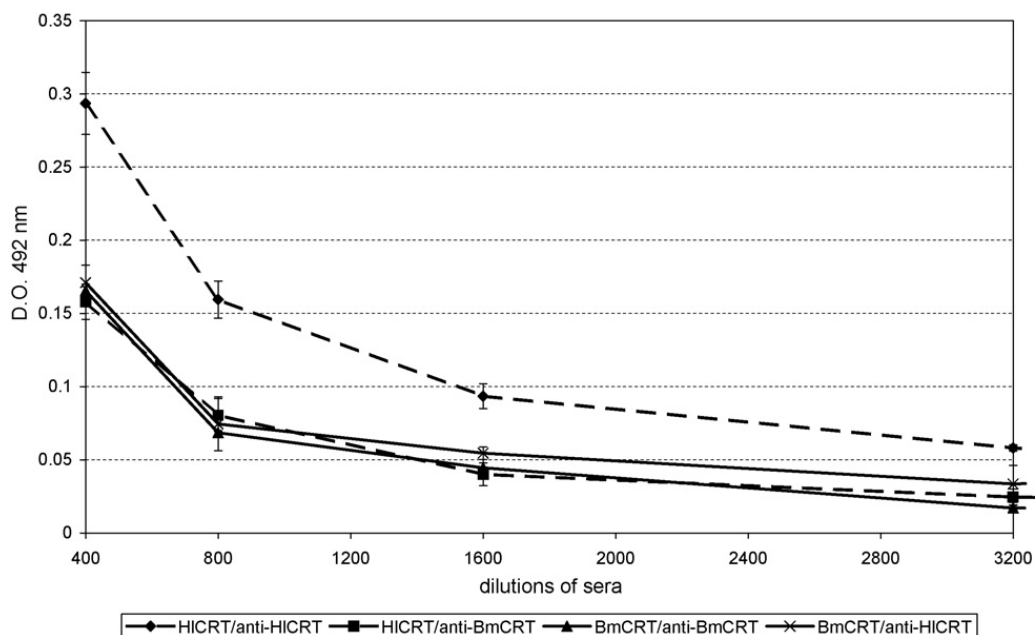


Fig. 5. Sera titration of immunized bovine with rHICRT or rBmCRT tested against rHICRT or rBmCRT coated plates by indirect ELISA (antigen coated in the plate/antiserum tested). The means of negative serum plus 2 SD were used as cut off. The bovine inoculated with PBS showed similar values of pre-immune serum (data not shown). The results were expressed as means of two experiments. Error bars represent the mean \pm SD.

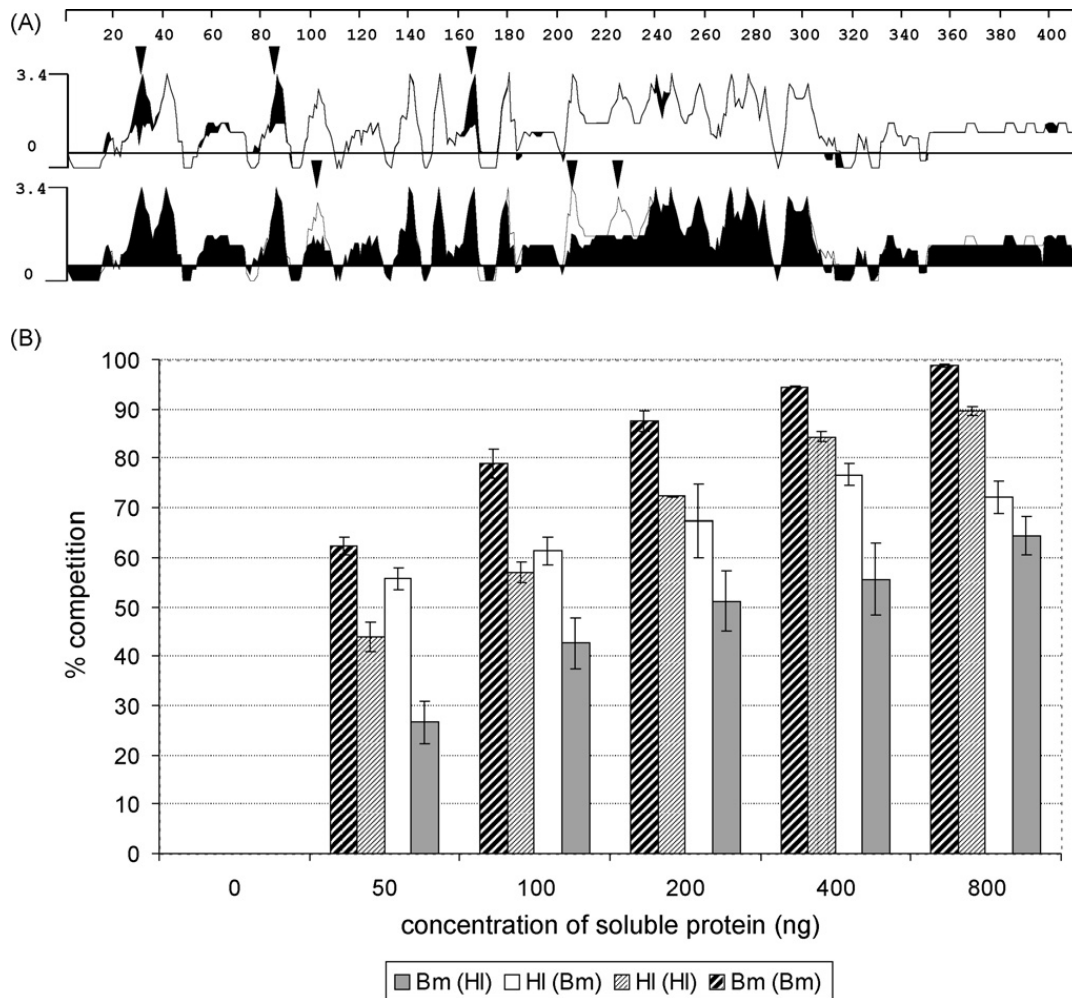


Fig. 6. (A) Antigenic index plot of *H. longicornis* and *R. microplus* CRTs predicted using the Jameson–Wolf algorithm. Increased positivity based on scalar number on left side of plot is predictive of antigenic site. The plot 1 is HICRT (black) sequence overlapped by BmCRT (white) sequence overlapped by HICRT (black) sequence. The arrows indicated regions with difference in immunogenic potential. (B) Competition ELISA of rHICRT or rBmCRT with sera from bovines immunized with rHICRT or rBmCRT. The abbreviations Bm and HI out of parenthesis indicate the immunized bovines sera and the same abbreviations within parenthesis indicate the soluble proteins incubated for competition. Abscissa axis indicates the concentration of soluble antigen and orderly axis indicates percentage of competition. The results were expressed as means of two experiments. Error bars represent the mean \pm SD.

facilitating parasite's survival. It was demonstrated that vaccination of sheep with *Haemaphysalis qinghaiensis* recombinant CRT (Gao et al., 2007) and rabbit with *A. americanum* recombinant CRT (Jaworski et al., 1995), conferred a moderate protective immunity against these ticks.

The phylogenetic tree of 18 selected species shown in Fig. 1 indicates that tick CRT genes are monophyletic. Tick sequences grouped closer to host sequences when compared to CRT sequences of other parasite species, as already described (Ferreira et al., 2002; Gao et al., 2008).

The coding region of HICRT and BmCRT genes were cloned and expressed in *E. coli*. The migrations of rHICRT and rBmCRT in SDS-PAGE are consistent with molecular masses of approximately 55 kDa (Fig. 2a), although the predicted molecular weights lie around 46 kDa, which is derived from the highly acidic C-domain (Coppolino and Dedhar, 1998).

Humoral immune responses were induced after the immunization with both recombinant proteins. The *in*

silico (Fig. 6a) and *in vitro* (Figs. 3a and 6b) analyses showed the presence of similar epitopes in both proteins. The bovines immunized with rHICRT or rBmCRT developed antibodies that react against both rCRTs (Fig. 2b). The immunogenicity of rCRTs observed in this work are different from immunogenicity previously described (Ferreira et al., 2002), which revealed, using a different not fully mature recombinant protein and a different immunization protocol, the absence of humoral immune response in a bovine immunized with the recombinant form of CRT from *R. microplus*. Differences in methodology, as antigen production and adjuvant, as well as genetic differences, may explain the discrepancy in the results of these two CRT immunizations. In this sense, Rodriguez et al. (1995) demonstrated that 6% of bovines, in a group of 98 animals, did not develop immune response against the recombinant protein Bm86. Bak et al. (2008) demonstrated that the presence of additional exogenous adjuvant is essential for CRT-associated peptides to be accessed from antigen-presenting cells and elicit a CTL response. On the

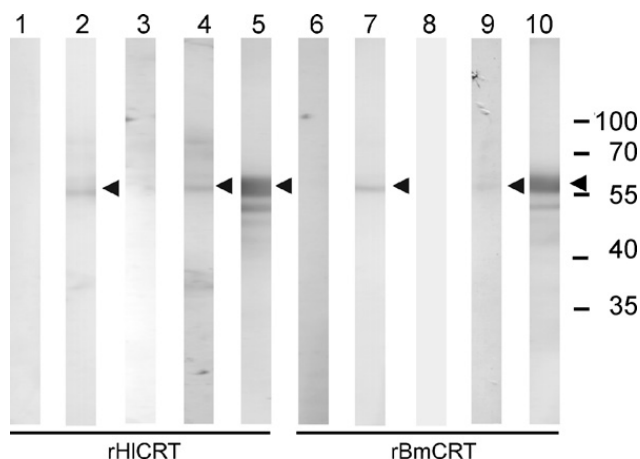


Fig. 7. Western blot analysis of sera from bovines immunized with protein extract of salivary glands or saliva against rHICRT or rBmCRT. 1 and 6, pre-immune serum from bovines immunized with protein extract of salivary glands; 2 and 7, serum from bovine immunized with protein extract of salivary glands; 3 and 8, pre-immune serum from bovine immunized with saliva; 4 and 9, serum from bovine immunized with saliva; 5, serum from bovine immunized with rHICRT; 10, serum from bovine immunized with rBmCRT. Arrows indicate the 55–60 kDa bands representative of rHICRT and rBmCRT. Molecular mass standards are expressed in kDa.

other hand, this work, as well as that by Ferreira et al. (2002), did not find anti-CRT antibodies in sera from naturally *R. microplus* infested bovines. This result was not expected, as other ticks (Ferreira et al., 2002; Alarcon-Chaidez et al., 2006) as well as other parasites (Ribeiro et al., 2009; Rzepecka et al., 2009) induce the synthesis of antibodies against secreted calreticulin in their hosts. The lack of specific antibodies anti-calreticulin in the bovine sera used in these analyses may indicate that the *R. microplus* calreticulin represents a silent antigen for bovines, as suggested for sialostatin L2 (Kotsyfakis et al., 2008). An alternative explanation is that the repertoire of antibodies present in the sera used could be influenced by the specific immune modulatory interplay between *R. microplus* and *Bos taurus taurus* bovines, similar to what was described by Cruz et al. (2008), as different levels of infestation influence the antigens recognized by bovines.

It is important to emphasize that the antibodies raised by bovines immunized with rHICRT or rBmCRT recognized, by Western blot, the native BmCRT (Fig. 4) in extract of 20-day-old larvae of *R. microplus*. This result demonstrates that the immunogenicity was maintained in the rHICRT and rBmCRT and this observation is important for the use of recombinant proteins in a vaccine. In similar manner, the calreticulin of *H. qinghaiensis* was detected using sera of sheep immunized with recombinant HqCRT (Gao et al., 2007). These results are corroborated by the recognition of rCRTs by the sera of bovines immunized with *R. microplus* saliva and salivary gland extracts, which has been shown to contain BmCRT (Ferreira et al., 2002).

At same time that the ELISA and *in silico* analyses suggest that HICRT and BmCRT display different epitopes despite their high conservation, the degree of cross-reactivity observed by immunological analyses suggested the presence of immunodominant epitopes conserved in both CRTs.

In conclusion, we found that bovines immunized with extract of salivary glands or saliva developed antibodies against rHICRT and rBmCRT (Fig. 7). The conservation of immunodominant epitopes during evolution in ticks, as well as its presence in saliva, makes calreticulin an interesting candidate for inclusion in an anti-tick vaccine, as already demonstrated (Gao et al., 2008), what could possibly become protective against multiple species, as already described for Bm86/Ba86 (Canales et al., 2009) and 64TRP proteins (Trimnell et al., 2005). Further studies are required to address the capacity of natural infestations to keep anti-BmCRT and HICRT antibody levels in animals previously immunized and to investigate the possibility that this circumstance abolish the need for repeated immunizations.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq-Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Entomologia Molecular, HHMI, FINEP, CAPES, CNPq, FAPERJ and FAPERGS (Brazil) and Ministry of Science, Culture and Education and JSPS (Japan).

References

- Alarcon-Chaidez, F., Ryan, R., Wikel, S., Dardick, K., Lawler, C., Foppa, I.M., Tomas, P., Cushman, A., Hsieh, A., Spielman, A., Bouchard, K.R., Dias, F., Aslanzadeh, J., Krause, P.J., 2006. Confirmation of tick bite by detection of antibody to Ixodes calreticulin salivary protein. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 1217–1222.
- Bagnall, N., Gough, J., Cadogan, L., Burns, B., Kongsuwan, K., 2009. Expression of intracellular calcium signalling genes in cattle skin during tick infestation. *Parasite Immunol.* 31, 177–187.
- Bak, S.P., Amiel, E., Walters, J.J., Berwin, B., 2008. Calreticulin requires an ancillary adjuvant for the induction of efficient cytotoxic T cell responses. *Mol. Immunol.* 45, 1414–1423.
- Canales, M., Almazan, C., Naranjo, V., Jongejan, F., de la Fuente, J., 2009. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestation. *BMC Biotechnol.* 9, 29.
- Cabezon, C., Cabrera, G., Paredes, R., Ferreira, A., Galanti, N., 2008. *Echinococcus granulosus* calreticulin: molecular characterization and hydatid cyst localization. *Mol. Immunol.* 45, 1431–1438.
- Ciprandi, A., de Oliveira, S.K., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C., 2006. *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Exp. Parasitol.* 114, 40–46.
- Ciprandi, A., Horn, F., Termignoni, C., 2003. Saliva of hematophagous animals: source of new anticoagulants. *Rev. Bras. Hematol. Hemot.* 25, 250–262.
- Coppolino, M.G., Dedhar, S., 1998. Calreticulin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 553–558.
- Cruz, A.P., Silva, S.S., Mattos, R.T., da Silva Jr., V.I., Masuda, A., Ferreira, C.A., 2008. Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines. *Vet. Parasitol.* 158, 152–158.
- de Lima, M.F.R., Ferreira, C.A.S., de Freitas, D.R.J., Valenzuela, J.G., Masuda, A., 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 747–754.
- Ferreira, C.A.S., Vaz, I.D., da Silva, S.S., Haag, K.L., Valenzuela, J.G., Masuda, A., 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Exp. Parasitol.* 101, 25–34.
- Fujisaki, K., Kawazu, S., Kamio, T., 1994. The taxonomy of the bovine *Theileria* spp. *Parasitol. Today* 10, 31–33.
- Gao, J.L., Luo, J.X., Li, Y.Q., Fan, R.Q., Zhao, H.P., Guan, G.Q., Liu, J.L., Wiske, B., Sugimoto, C., Yin, H., 2007. Cloning and characterization of a ribosomal protein L23a from *Haemaphysalis qinghaiensis* eggs by immuno screening of a cDNA expression library. *Exp. Appl. Acarol.* 41, 289–303.
- Gao, J., Luo, J., Fan, R., Fingerle, V., Guan, G., Liu, Z., Li, Y., Zhao, H., Ma, M., Liu, J., Liu, A., Ren, Q., Dang, Z., Sugimoto, C., Yin, H., 2008. Cloning and

- characterization of a cDNA clone encoding calreticulin from *Haemaphysalis qinghaiensis* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 102, 737–746.
- Gold, L.I., Rahman, M., Blechman, K.M., Greives, M.R., Churgin, S., Michaels, J., Callaghan, M.J., Cardwell, N.L., Pollins, A.C., Michalak, M., Siebert, J.W., Levine, J.P., Gurtner, G.C., Nanney, L.B., Galiano, R.D., Cadacio, C.L., 2006. Overview of the role for calreticulin in the enhancement of wound healing through multiple biological effects. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 11, 57–65.
- Guerrero, F.D., Nene, V.M., George, J.E., Barker, S.C., Willadsen, P., 2006. Sequencing a new target genome: the *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) genome project. *J. Med. Entomol.* 43, 9–16.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Imamura, S., Vaz, I.D., Sugino, M., Ohashi, K., Onuma, M., 2005. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine* 23, 1301–1311.
- Jameson, B.A., Wolf, H., 1988. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *CABIOS* 4, 181–186.
- Jaworski, D.C., Simmen, F.A., Lamoreaux, W., Coons, L.B., Muller, M.T., Needham, G.R., 1995. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *J. Insect Physiol.* 41, 369–375.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129, S3–S14.
- Kashino, S.S., Resende, J., Sacco, A.M., Rocha, C., Proenca, L., Carvalho, W.A., Firmino, A.A., Queiroz, R., Benavides, M., Gershwin, L.J., De Miranda Santos, I., 2005. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp. Parasitol.* 110, 12–21.
- Kasper, G., Brown, A., Eberl, M., Vallar, L., Kieffer, N., Berry, C., Girdwood, K., Eggleton, P., Quinnell, R., Pritchard, D.I., 2001. A calreticulin-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signalling domains of some integrins. *Parasite Immunol.* 23, 141–152.
- Kotsyfakis, M., Karim, S., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C., 2007. Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 282, 29256–29263.
- Kotsyfakis, M., Anderson, J.M., Andersen, J.F., Calvo, E., Francischetti, I.M., Mather, T.N., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M., 2008. Cutting edge: immunity against a “silent” salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *J. Immunol.* 181, 5209–5212.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lawrie, C.H., Sim, R.B., Nuttall, P.A., 2005. Investigation of the mechanisms of anti-complement activity in *Ixodes ricinus* ticks. *Mol. Immunol.* 42, 31–38.
- Michalak, M., Corbett, E.F., Mesaeli, N., Nakamura, K., Opas, M., 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem. J.* 344, 281–292.
- Michalak, M., Milner, R.E., Burns, K., Opas, M., 1992. Calreticulin. *Biochem. J.* 285, 681–692.
- Mulenga, A., Sugimoto, C., Sako, Y., Ohashi, K., Musoke, A., Shubash, M., Onuma, M., 1999. Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infect. Immun.* 67, 1652–1658.
- Ribeiro, C.H., López, N.C., Ramírez, G.A., Valck, C.E., Molina, M.C., Aguilar, L., Rodríguez, M., Maldonado, I., Martínez, R., González, C., Troncoso, R., Lavandero, S., Gingras, A.R., Schwaebler, W., Ferreira, A., 2009. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a possible role in Chagas' disease autoimmunity. *Mol. Immunol.* 46, 1092–1099.
- Ribeiro, J.M.C., 1989. Role of saliva in tick host interactions. *Exp. Appl. Acarol.* 7, 15–20.
- Rodríguez, M., Penichet, M.L., Mouris, A.E., Labarta, V., Luaces, L.L., Rubiera, R., Cordoves, C., Sanchez, P.A., Ramos, E., Soto, A., 1995. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet. Parasitol.* 57, 339–349.
- Rzepecka, J., Rausch, S., Klotz, C., Schnöller, C., Kornprobst, T., Hagen, J., Ignatius, R., Lucius, R., Hartmann, S., 2009. Calreticulin from the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* is a Th2-skewing protein and interacts with murine scavenger receptor-A. *Mol. Immunol.* 46, 1109–1119.
- Seixas, A., Leal, A.T., Nascimento-Silva, M.C.L., Masuda, A., Termignoni, C., Vaz, I.D., 2008. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDC). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124, 332–340.
- Steen, N.A., Barker, S.C., Alewood, P.F., 2006. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. *Toxicol.* 47, 1–20.
- Suchitra, S., Anbu, K.A., Rathore, D.K., Mahawar, M., Singh, B.P., Joshi, P., 2008. *Haemonchus contortus* calreticulin binds to C-reactive protein of its host, a novel survival strategy of the parasite. *Parasite Immunol.* 30, 371–374.
- Suchitra, S., Joshi, P., 2005. Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. *Biochim. Biophys. Acta* 1722, 293–303.
- Szabo, M.P.J., Bechara, G.H., 1997. Immunisation of dogs and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* ticks using gut extract. *Vet. Parasitol.* 68, 283–294.
- Szabo, M.P.J., Morelli, J., Bechara, G.H., 1995. Cutaneous hypersensitivity induced in dogs and guinea-pigs by extracts of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 19, 723–730.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Trimnell, A.R., Davies, G.M., Lissina, O., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 2005. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine* 23, 4329–4341.
- Vaz, I., Ozaki, L.S., Masuda, A., 1994. Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissues. *Vet. Parasitol.* 52, 71–78.
- Wikel, S.K., 1999. Modulation of the host immune system by ectoparasitic arthropods—blood-feeding and tissue-dwelling arthropods manipulate host defenses to their advantage. *Bioscience* 49, 311–320.
- Wikel, S.K., Allen, J.R., 1976. Acquired-resistance to ticks. 1. Passive transfer of resistance. *Immunology* 30, 311–316.
- Willadsen, P., 2006a. Tick control: thoughts on a research agenda. *Vet. Parasitol.* 138, 161–168.
- Willadsen, P., 2006b. Vaccination against ectoparasites. *Parasitology* 133, S9–S25.
- Willadsen, P., 2008. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? *Trend Parasitol.* 24, 164–167.

ANEXO B

Artigo publicado no periódico *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18: 1-7, 2009.

New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine

Luís Fernando Parizi, Paula Cristiane Pohl, Aoi Masuda e Itabajara da Silva Vaz Jr.

Trabalho realizado entre 2008 e 2009.

Colaboração dos autores para o trabalho:

Luís Fernando Parizi, Paula Cristiane Pohl, Aoi Masuda e Itabajara da Silva Vaz

Jr: Redação e revisão da literatura.

New approaches toward anti-*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* tick vaccine

Novas estratégias para o desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*

Luís Fernando Parizi¹; Paula Cristiane Pohl¹; Aoi Masuda^{1,2}; Itabajara da Silva Vaz Junior^{1,3*}

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

²Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

³Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Received December 1, 2008

Accepted January 30, 2009

Abstract

The tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (formerly *Boophilus microplus*) is the major ectoparasite affecting livestock in America, Asia, Africa, and Oceania. Conventional tick control is based on the use of acaricides but immunization of bovines with tick gut proteins induces only a partial protective immune response. Based on this information, distinct research groups have explored the possibility of protecting the animals by inducing an immune response against other tick proteins. However, the antigens so far described do not induce the necessary protection for suppressing the use of acaricides. Currently, several groups are engaged in identifying new tick proteins to be used as targets for the development of new vaccines. This approach focuses on the enhancement of the immunogenicity of antigens already tested by incorporating new adjuvants or formulations and by searching for new antigens. This paper reviews the work done by Brazilian researchers to develop a vaccine against this tick.

Keywords: *Boophilus microplus*, *Rhipicephalus microplus*, vaccine, tick, control.

Resumo

O carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (anteriormente *Boophilus microplus*) é o principal ectoparasita que afeta bovinos na América, Ásia, África e Oceania e o seu controle é tradicionalmente realizado através do uso de acaricidas. Experimentos de imunização com proteínas do carrapato mostram que a resposta imune desenvolvida pelos bovinos vacinados protege, em parte, os animais do parasitismo. Baseado nessas observações, vários grupos de pesquisa exploram a possibilidade de proteger os animais pela indução de uma resposta imune contra proteínas do carrapato. Entretanto, os antígenos já caracterizados não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas. Portanto, esses grupos de pesquisa estão engajados na tentativa de identificar novas proteínas que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de novas vacinas, as quais possam induzir maior imunogenicidade de que os antígenos já testados, através do uso de novas formulações e/ou pela incorporação de adjuvantes. O presente artigo apresenta uma revisão da literatura sobre os resultados obtidos por pesquisadores brasileiros no desenvolvimento de vacinas contra o carrapato.

Palavras-chave: *Boophilus microplus*, *Rhipicephalus microplus*, vacina, carrapato, controle.

Introduction

The tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (formerly *Boophilus microplus*) (MURRELL et al., 2003) is a blood-sucking parasite that transmits *Babesia* spp. and *Anaplasma* spp. to cattle (CAFRUNE et al., 1995). It causes significant economic losses in tropical and subtropical areas of world. The infestation of bovines by ticks is one of the main causes of low productivity of grazing cattle in Brazil. The economic impact caused by tick in-

festations is tens of billions of dollars per year, worldwide. These enormous economic losses could be minimized by the control of tick populations down to acceptable levels. Conventional tick control is based on the use of acaricides (MARTINS et al., 2002). However, the improper use of these molecules has increased the incidence of acaricide-resistant ticks (CRAMPTON et al., 1999; MARTINS et al., 2001; KLAFKE et al., 2006), besides increasing the occurrence of environmental and food contamination. Together, these problems generate a rising economic and social demand for new control methods.

*Corresponding author: Itabajara da Silva Vaz Júnior
 Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
 Av. Bento Gonçalves 9.500, Prédio 43421, CEP 91501-970 Porto Alegre - RS, Brazil
 Tel.: +55 (51) 3308-6078, Fax: +55 (51) 3308-7309; e-mail: ita@cbiot.ufrgs.br

Non-chemical alternative methods include the use of genetically resistant animals (GASPARIN et al., 2007), the management of pastures, as well as the adoption of both biological (FRAZZON et al., 2000; BENJAMIN et al., 2002; FERNANDES et al., 2004; BASSO et al., 2005; BAHIENSE et al., 2006; LEMON et al., 2008) and of immunologic control strategies. However, in these alternative methods, knowledge of bovine immunology, for instance the characterization of cutaneous hypersensitivity in tick susceptible/resistant bovines (BECHARA et al., 2000); of the modulation of immune responses by parasite components (KASHINO et al., 2005) or intensity of tick infestation (CRUZ et al., 2008); of the influence of host genotypic composition in the induction of an immune response (CARVALHO et al., 2008), as well as the dynamics of the tick populations (EVANS et al., 2000; MARTINS et al., 2002) that occur in each region, are all equally fundamental factors for the success of control programs. These studies underscore the importance of the characterization of host immune response for the development of new vaccines and are important in accelerating the process of bringing tick vaccines from the development stage to clinical use. Together, biological and immunological controls offer considerable potential for reduction in the use of chemicals in integrated control of ectoparasites.

Vaccines have been used in some countries, although without solving the problem completely. In this scenario, the use of acaricides is still necessary (PRUETT, 1999). Nevertheless, vaccines undoubtedly are suitable targets for research efforts aimed at the control of the parasite. Hence, knowledge of the biology of the parasite as well as of the interaction of the tick with the vertebrate are basic instruments for the formulation and application of this control method.

We carried out a literature review to characterize the production of Brazilian research groups in the development of a vaccine against *R. (B.) microplus*. The survey of scientific production in the period from 2001 to 2008 related to this tick reveals that efforts of Brazilian researchers represent approximately one fifth of the world's scientific output dedicated to the study of the bovine tick (indexed articles in ISI, using *Boophilus* as the key word).

Immune Response Against the Tick

The idea of controlling tick parasitism through immunological means has been studied for more than 40 years (ROBERTS, 1968; WAGLAND et al., 1985). These studies make clear that the existence of natural resistance to ticks in bovines is not only of innate origin, it is also acquired during successive infestations (ALLEN, 1994; BARRIGA et al., 1995) and resistant animals can reject 80 to 99% of the larvae (ALLEN, 1994). These observations are the basis for all the studies aiming at tick control by means of vaccines. Among the advantages of vaccines is the increased safety for the applicator as well as for the consumer, due to the fact that it is not necessary to observe a lag period after vaccine application, unlike the application of chemical products.

Mechanisms of parasite evasion from the immunological response already identified in different species of ticks include immunosuppressor factors, inhibitors of the complement sys-

tem, T cell cytotoxicity, inflammatory response, and interleukins (BARRIGA, 1999). Efficiency in preventing the hosts' protection mechanisms has gradually evolved throughout the long period of co-evolution of the parasite and its hosts. The host-immune response and the evasion mechanisms (BARRIGA, 1999; MULENGA et al., 2002) of the parasite are in an extremely fine balance that allows the survival of both species. Due to the lack of contact between the concealed antigens and the immune system of the bovine, the ticks have not had the chance to develop strategies to escape from the immune response against concealed antigens (WILLADSEN et al., 1988), therefore the immune response against this type of antigen would be, theoretically, more efficient than a natural immune response (WILLADSEN et al., 1988).

Anti-Tick Vaccines Currently Available

In development of an anti-tick vaccine, two sources of candidate vaccine antigens have been characterized: (a) the "exposed" antigens, that is, those present in tick saliva and inoculated in the bovine during the feeding process; and (b) "concealed" antigens, which are normally hidden from the bovine immune response (WILLADSEN et al., 1988). At the moment, there are two commercially available vaccines (in Australia and in Cuba) that partially control *R. (B.) microplus*. Both vaccines are based on the Bm86 protein. This protein was obtained, initially, through the purification of the protein by fractioning the whole tick using chromatographic methods (WILLADSEN et al., 1988). The Bm86 is a glycoprotein present in the membrane of gut cells and it plays a role in endocytosis (WILLADSEN et al., 1989). The effectiveness of the available vaccines that use a recombinant Bm86 protein produced in bacteria or yeast varies between 51 and 91%, according to the characteristics of each tick population and to the nutritional condition of the bovines used in the tests (KEMP et al., 1989; PENICHERET et al., 1994; RODRIGUEZ et al., 1995; PATARROYO et al., 2002). It was suggested that the variation in effectiveness observed between different regions of the world is due to variations in the sequence of the Bm86 between different tick populations (GARCIA-GARCIA et al., 2000). Indeed, analyses of tick populations from Argentina have shown polymorphisms in the gene of Bm86 that resulted in a soluble protein instead the membrane-bound protein detected in ticks from Australia and Cuba, which explains why Argentinean ticks are resistant to vaccination. To overcome this resistance, a new recombinant vaccine was produced based on the gene of Bm95 (allele of the Bm86 gene). This new antigen was efficient to protect bovines from infestations by ticks from Argentina and Cuba (GARCIA-GARCIA et al., 2000).

Another strategy employed to induce an immune response against Bm86 was the use of DNA vaccines containing the Bm86 gene. Sheep, mice, and bovines immunized with plasmids encoding for the Bm86 gene produced a humoral immune response, with production of immunoglobulins, especially IgG-class antibodies, for Bm86 antigen (DE ROSE et al., 1999; RUIZ et al., 2007). After vaccination, the sheep showed a partial protection against subsequent tick infestation (DE ROSE et al., 1999).

Additionally, bovines vaccinated with Bm86 showed variable levels of resistance against *R. (B.) microplus* (ANDREOTTI, 2006) and against closely related species challenges (FRAGOSO et al., 1998; DE VOS et al., 2001; ODONGO et al., 2007). These protection levels reflect the variation between *R. (B.) microplus* isolates, and also point to the phylogenetic relationships between tick species, indicating that immunologically important epitopes are partially conserved (SOSSAI et al., 2005; ODONGO et al., 2007; ANDREOTTI et al., 2008).

Through the analysis of Bm86 and the evaluation of some properties of this protein, such as its hydrophobic and hydrophilic potentials, synthetic peptides derived from this glycoprotein sequence have been developed. When used as vaccinal antigens in bovines, these peptides presented effectiveness between 36 and 81% (PATARROYO et al., 2002). One of these synthetic peptides (SBm7462) was used in an encapsulated form in polyester microspheres, and also emulsified in saponin. It was demonstrated that saponin was effective in inducing IgG antibodies (SALES-JUNIOR et al., 2005). As the amino acid sequence variability of SBm7462 epitope may affect the performance of immunization against ticks, the Bm86 gene coding region of SBm7462-epitope was sequenced from 20 tick isolates. The analyses indicated that the SBm7462 gene is conserved in South American tick populations. The SBm7462 conservation reported supports the use of this peptide as antigen in a vaccine against different tick populations (PECONICK et al., 2008).

Potential Candidates for New Vaccines

Knowledge of tick physiology and of bovine immunology are also limited. So, in order to provide conditions to support the development of new control strategies, the researcher is faced with the primary need to understand host-parasite interaction. Challenges associated with this objective include the understanding of tick physiology and bovine immunology. Various research groups are engaged in trying to identify new tick proteins as targets for the development of new vaccines, and also devote their efforts to the enhancement of immunogenicity of antigens already tested, by incorporating new adjuvants or formulations into the original research (IMAMURA et al., 2007).

1. Hemelipoproteins

The protection mechanisms against oxidative damage caused by the ingestion of great amounts of blood and the mechanisms to oppose the hemostatic defenses of the host are major elements of an attractive strategy directed to discover new molecules as potential candidates for the development of an effective vaccine.

Hemoglobin digestion in the tick's gut is intracellular (AKOV, 1982) and a cysteine-protease seems to be related to hemoglobin digestion (RENARD et al., 2002). It occurs exclusively inside large vesicles of the digestive cell of the intestinal tract (LARA et al., 2005), resulting in the production of high amounts of heme inside the cell. By testing the hypothesis of the existence of adaptations by the tick to the toxicity of heme, it was possible to show that the first defense of the intestine consists in sequestering

around 90% of the heme from the blood meal into an organelle dedicated to this function: the hemosome (LARA et al., 2003). It has been shown that the *R. (B.) microplus* does not synthesize heme, using part of the heme ingested in the diet (the remaining 10%) to mount its own hemeproteins (BRAZ et al., 1999). Moreover, *R. (B.) microplus* is the only animal proven to not synthesize heme. Clearly, this demonstrates that this parasite is unique in many aspects, and inferences based on the knowledge of other species cannot be made easily. The heme absorbed in the midgut is transferred to hemolymph and transported by a hemelipoprotein – HeLp to the tissues (MAYA-MONTEIRO et al., 2000). It has been shown that the lipoproteic particle of this protein plays an antioxidant role against heme-induced radical damage (MAYA-MONTEIRO et al., 2004). Additionally, the HeLp protein can be also implicated in the transport of lipids.

It has also been shown that hemoglobin digestion in the digestive tract produces antimicrobial peptides (FOGACA et al., 1999), revealing an association between the immune system and the digestive system. Other antimicrobial peptides present in tick hemolymph have been identified and suggested to play an essential role for survival and prevention of pathogen invasion throughout the tick's body (FOGACA et al., 2004, 2005).

2. Tick heme-binding aspartic proteinase – THAP

In the adult female tick, the main use of blood meal is the maintenance of the reproductive effort, represented by a massive production of eggs. Yolk accumulation (vitellogenesis) is a process in which extraovarian tissues produce proteins precursors that are transported to and accumulated inside the oocytes (GIORGI et al., 1985; RAIKHEL et al., 1992) in order that eggs, together with the genetic material, have all the substrates needed for a complete development of the new living being.

The study of egg protein constituents, the sites in which they are produced, the way they gather inside the oocyte, as well as the pathway through which they are mobilized during embryogenesis are aspects of a general strategy that will allow, in the long run, collection of information on the tick reproductive process and that will be helpful in finding new targets for vaccines or for drugs. In this sense, understanding of the steps involved in egg production and development, the characterization of the egg's fragilities, will equally be essential in developing alternative strategies for tick population control.

Another way to influence the reproductive process lies in controlling yolk consumption. Enzymes such as phosphatases, kinases, and proteases, generally acidic and of maternal origin, are accumulated in the oocytes during vitellogenesis (OLIVEIRA et al., 1989; RIBOLLA et al., 1993; FIALHO et al., 2005). They are responsible for yolk degradation (POHL et al., 2008) and are activated by acidification after the fertilization event (FAGOTTO, 1995). This entire enzyme repertory could be useful in finding new targets to develop an effective vaccine.

The embryo of *R. (B.) microplus* is of the long germinal band type (occupies the entire egg in the blastoderm stage), similarly to what is observed in diptera, although the morphogenetic movements are distinct in this group (CAMPOS et al., 2006). The

tick energetic metabolism has been investigated in the different embryogenesis phases. An interesting observation is that all proteases already characterized are proteinases that require an acidic pH to become activated (LOGULLO et al., 1998; SEIXAS et al., 2003; POHL et al., 2008). Indeed, it has been observed that eggs of *R. (B.) microplus* possess a proton ATPase of the vacuolar type, which is involved in the process of acidification and which would probably lead to the activation of these proteolytic enzymes in specific compartments (ABREU et al., 2004). Moreover, the presence of trypsin inhibitors (ANDREOTTI et al., 2002; AZZOLINI et al., 2003; SASAKI et al., 2004) and inhibitors of cysteine proteases (LIMA et al., 2006) suggests that these inhibitors play a role in the control of embryo metabolism.

The observation that eggs accumulate a great amount of heme after vitellin – VT processing/degradation (vitellin is the main protein of reserve of eggs) (LOGULLO et al., 2002) supports the hypothesis that the degradation of vitellin during the embryonic development is a source of oxidative stress. Therefore, a critical adaptation is necessary, which may prevent excessive reactive oxygen species production during several physiologic conditions. This finding supports the hypothesis that an egg VT degradation aspartic protease called Tick Heme-binding Aspartic Proteinase – THAP present in eggs has its activity inhibited by heme through a site that is distinct from the catalytic site (SORGINE et al., 2000; POHL et al., 2008). The increase in egg free heme content would generate a feedback inhibition in VT degradation. The idea that VT degradation is a process related to the regulation of redox balance and to the use of heme by the embryo was reinforced by the demonstration that VT is also a heme binding protein and that it inhibits lipid peroxidation induced by heme (LOGULLO et al., 2002).

3. *Boophilus* yolk pro-cathepsin and tick vitellin-degrading enzyme

The *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin – BYC seems to be associated with the mobilization of VT (LOGULLO et al., 1998). Also, the identification of a cysteine protease strongly associated with VT suggests the possibility that this protein is also involved in the degradation of VT, and characterizes the use of yolk as being a highly regulated process, involving a joint action of different enzymes (SEIXAS et al., 2003).

It was observed that total egg protein remains stable during embryogenesis (CAMPOS et al., 2006), while VT content suffers a variation (CANAL et al., 1995; LOGULLO et al., 2002). Thus, VT is used for the supply of the amino acids required to synthesize new proteins. In addition, at the end of embryogenesis the glucose is obtained from the amino acid catabolism. Surprisingly, in the eggs this process is accompanied by a significant glycogen re-synthesis (CAMPOS et al., 2006). These data suggest the existence of a rather complex system of control of energy metabolism in the embryogenesis of this tick.

Experiments directed at developing protocols to immunize bovines with proteins have been conducted. This idea is supported by the demonstration that functional antibodies are found in tick hemolymph when ticks take a meal in an immunized bovine

(DA SILVA VAZ Jr. et al., 1996). This finding opened the way to use proteins from other tick organs as targets for vaccines, and not just proteins from the digestive tract. Immunization of bovines with native (DA SILVA VAZ Jr. et al., 1998) or recombinant form (LEAL et al., 2006) of an egg-yolk aspartic endopeptidase – BYC could interfere with the reproductive process of the tick, with reduction in the number of engorged ticks, in egg-laying capacity, and in egg fertility. Immunization of bovines with native BYC induced an overall protection of around 30% (DA SILVA VAZ Jr. et al., 1998). In comparison, the immunization with the recombinant form of BYC induced an overall protection of around 25% (LEAL et al., 2006). Since BYC immunization interferes in functions related to the target protein, in this case those related to embryonic and egg development, it is possible to assume that vaccination with other embryo proteins can be efficient to intervene in tick embryonic and larval phases. Recently, it has been shown that immunization of bovines with a cysteine endopeptidase – VTDC, an enzyme also involved in the digestion of vitellin (SEIXAS et al., 2003), leads to a certain degree of immunoprotection (21% of overall protection rate) in vaccinated cattle (SEIXAS et al., 2008).

Similarly, significant protection (reduction of 69.7% in the total tick number) against tick infestations was obtained by immunizing bovines with a set of trypsin inhibitors present in *R. (B.) microplus* larvae. A trypsin inhibitor (BmTI-A) was purified from the set of trypsin inhibitors and then partially sequenced. So, a synthetic peptide based on the BmTI-A was used to immunize bovines. However, the efficacy was only of 18.4%, specifically in the reduction in the number of engorging ticks (ANDREOTTI, 2007). These results suggest that the larval feeding process is affected by the bovine immune response, leading to damage to ticks at the early stages of development (TANAKA et al., 1999; ANDREOTTI et al., 2002).

Other strategies to find novel proteins involved with the parasite-host relationship are large-scale analyses, which have the power to survey the entire genome and identify genes (and proteins) with potential use for vaccine development.

Expressed Sequence Tag – EST libraries have shown to be powerful tools for gene discovery (NAGARAJ et al., 2007). ESTs were generated by large-scale sequencing of clones from cDNA libraries constructed from mRNA isolated from ovaries, hemocytes, and salivary glands of *R. (B.) microplus* and 1,344 were deposited in sequence databases (SANTOS et al., 2006). The potential functions of many proteins were deduced based on their homologies to known proteins. Approximately 30% of these ESTs represented new proteins in this tick. Knowing these potential new proteins may shed light on the biology, taxonomy and phylogeny of the parasite while it represents a new way of performing biological studies.

One of these meta-analysis methods, namely the phage display technique, is an antibody-based proteomic approach that has great potential in identifying and characterizing antigens to be used in vaccines. The phage display technique permitted to identify, in a high-throughput manner, 66 tick proteins that showed potential for eliciting a host immune response after infestation. Simultaneously, bioinformatics analysis revealed protein features known to be important for antigen selection, which led to the identification of novel and potential vaccine candidates (PRUDENCIO et al., 2009).

Conclusion

Various approaches have established that immunizations with tick native or recombinant proteins or with synthetic peptides are useful to induce a partially protective immune response, and that these immunizations could be used together with acaricides for an efficient tick control. This review emphasizes the feasibility of the research work developed in Brazil, which aims to improve innovation in the development of the vaccine against ticks. The increasing Brazilian contribution in this field places our country as an international reference for acarologists. Clearly, the interaction between applied and basic research is characteristic of the Brazilian research work in this field. Indeed, this is indispensable to generate national knowledge and technology in the cattle-breeding sector.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq-Instituto Nacional de Entomologia Molecular, HHMI, FINEP, CAPES, CNPq, FAPERJ, and FAPERGS.

References

- ABREU, L. A. et al. Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 5, p. 443-449, 2004.
- AKOV, S. Blood digestion in ticks. In: OBENCHAIN, F.; GALUN, R. (ed.). **Physiology of Ticks**. Oxford: Pergamon Press, 1982. p. 197-211.
- ALLEN, J. R. Host resistance to ectoparasites. **Revue scientifique et technique**, v. 13, n. 4, p. 1287-1303, 1994.
- ANDREOTTI, R. A synthetic BmTI n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 66-70, 2007.
- ANDREOTTI, R. et al. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 4, p. 557-563, 2002.
- ANDREOTTI, R. et al. Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants Bm86 Campo Grande strain, Bm86 and Bm95 Comparação da previsão de ligação das variantes de proteína de intestino de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 cepa Campo Grande, Bm86 e Bm95. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 17, n. 2, p. 93-98, 2008.
- ANDREOTTI, R. Performance of two Bm86 antigen vaccine formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 3, p. 97-100, 2006.
- AZZOLINI, S. S. et al. *Rhipicephalus sanguineus* trypsin inhibitors present in the tick larvae: isolation, characterization, and partial primary structure determination. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, n. 2, p. 176-182, 2003.
- 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**, v. 141, n. 3-4, p. 319-324, 2006.
- BARRIGA, O. O. Evidence and mechanisms of immunosuppression in tick infestations. **Genetic Analysis-Biomolecular Engineering**, v. 15, n. 3-5, p. 139-142, 1999.
- BARRIGA, O. O.; DA SILVA, S. S.; AZEVEDO, J. S. Relationships and influences between *Boophilus microplus* characteristics in tick-naive or repeatedly infested cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 56, n. 1-3, p. 225-238, 1995.
- BASSO, L. M. D. et al. Control of *Boophilus microplus* larvae by *Metarhizium anisopliae* in artificially infested pastures. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 6, p. 595-600, 2005.
- BECHARA, G. H.; MORELLI, J.; SZABO, M. P. J. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. **Tropical Veterinary Diseases**, v. 916, p. 570-575, 2000.
- BENJAMIN, M. A.; ZHIOUA, E.; OSTFELD, R. S. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromyeetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 5, p. 723-728, 2002.
- BRAZ, G. R. et al. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Current Biology**, v. 9, n. 13, p. 703-706, 1999.
- CAFRUNE, M. M. et al. Experimental studies of the rate of infection of *Boophilus microplus* eggs with *Babesia bovis*. **Research in Veterinary Science**, v. 58, n. 3, p. 284-285, 1995.
- CAMPOS, E. et al. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 3-4, p. 349-357, 2006.
- CANAL, C. W. et al. Changing patterns of vitellin-related peptides during development of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental & Applied Acarology**, v. 19, n. 6, p. 325-336, 1995.
- CARVALHO, W. A. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, *Bos taurus* and *Bos indicus*. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 587-591, 2008.
- CRAMPTON, A. L.; BAXTER, C. D.; BARKER, S. C. A new family of cytochrome P450 genes (CYP41) from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 9, p. 829-834, 1999.
- CRUZ, A. P. et al. Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 1-2, p. 152-158, 2008.
- DA SILVA VAZ JR., I. et al. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 66, n. 3-4, p. 331-341, 1998.
- DA SILVA VAZ JR., I. et al. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 1-2, p. 155-160, 1996.
- DE ROSE, R. et al. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, n. 3-4, p. 151-160, 1999.

- DE VOS, S. et al. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. **Experimental & Applied Acarology**, v. 25, n. 3, p. 245-261, 2001.
- EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari, ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 453-470, 2000.
- FAGOTTO, F. Regulation of Yolk Degradation, Or How to Make Sleepy Lysosomes. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 3645-3647, 1995.
- FERNANDES, E. K. et al. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 270-274, 2004.
- FIALHO, E. et al. Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 436, n. 2, p. 246-253, 2005.
- FOGACA, A. C. et al. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, v. 27, n. 4, p. 667-674, 2005.
- FOGACA, A. C. et al. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 36, p. 25330-25334, 1999.
- FOGACA, A. C. et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, n. 3, p. 191-200, 2004.
- FRAGOSO, H. et al. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. **Vaccine**, v. 16, n. 20, p. 1990-1992, 1998.
- FRAZZON, A. P. G. et al. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 1-2, p. 117-125, 2000.
- GARCIA-GARCIA, J. C. et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 18, n. 21, p. 2275-2287, 2000.
- GASPARIN, G. et al. Mapping of quantitative trait loci controlling tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. **Animal Genetics**, v. 38, n. 5, p. 453-459, 2007.
- GIORGI, F.; POSTLETHWAIT, J. H. Yolk Polypeptide Secretion and Vitelline Membrane Deposition in A Female Sterile *Drosophila* Mutant. **Developmental Genetics**, v. 6, n. 2, p. 133-150, 1985.
- IMAMURA, S. et al. Recent topics of candidate antigens for immunological control of ixodid ticks. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 1, p. 1-16, 2007.
- KASHINO, S. S. et al. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 1, p. 12-21, 2005.
- KEMP, D. H. et al. Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. **Experimental & Applied Acarology**, v. 7, n. 1, p. 43-58, 1989.
- KLAFKE, G. M. et al. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 386-390, 2006.
- LARA, F. A. et al. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. Pt 16, p. 3093-3101, 2005.
- LARA, F. A. et al. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 10, p. 1707-1715, 2003.
- LEAL, A. T. et al. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, n. 341-355, 2006.
- LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 1, p. 40-49, 2008.
- LIMA, C. A.; SASAKI, S. D.; TANAKA, A. S. Bmeystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 347, n. 1, p. 44-50, 2006.
- LOGULLO, C. et al. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 12, p. 1805-1811, 2002.
- LOGULLO, C. et al. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 116, p. 525-532, 1998.
- MARTINS, J. R. et al. Partial strategic tick control within a herd of European breed cattle in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Experimental & Applied Acarology**, v. 27, n. 3, p. 241-251, 2002.
- MARTINS, J. R.; FURLONG, J. Ivermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **Veterinary Record**, v. 149, n. 2, p. 64, 2001.
- MAYA-MONTEIRO, C. M. et al. HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p. 81-87, 2004.
- MAYA-MONTEIRO, C. M. et al. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 36584-36589, 2000.
- MULENGA, A. et al. Blood meal acquisition by ticks; molecular advances and implications for vaccine development. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 4, p. 261-272, 2002.
- MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 169-172, 2003.
- NAGARAJ, S. H. et al. A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. **Briefings in Bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 6-21, 2007.
- ODONGO, D. et al. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. **Vaccine**, v. 25, n. 7, p. 1287-1296, 2007.
- OLIVEIRA, P. L.; PETRETSKI, D. D.; MASUDA, H. Vitellin Processing and Degradation During Embryogenesis in *Rhodnius-Prolixus*. **Insect Biochemistry**, v. 19, n. 5, p. 489, 1989.

- PATARROYO, J. H. et al. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, n. 3-4, p. 163-172, 2002.
- PECONICK, A. P. et al. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 37-43, 2008.
- PENICHER, M. et al. Detection of Bm86 antigen in different strains of *Boophilus microplus* and effectiveness of immunization with recombinant Bm86. **Parasite Immunology**, v. 16, n. 9, p. 493-500, 1994.
- POHL, P. C. et al. An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 151, n. 4, p. 392-399, 2008.
- PRUDENCIO, C. R. et al. In silico analysis for identification of tick phagotopes selected by phage-displayed libraries. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 45-47, 2009.
- PRUETT, J. H. Immunological control of arthropod ectoparasites - a review. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 25-32, 1999.
- RAIKHEL, A. S.; DHADIALLA, T. S. Accumulation of Yolk Proteins in Insect Oocytes. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 217-251, 1992.
- RENARD, G. et al. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. **Insect Molecular Biology**, v. 11, n. 4, p. 325-328, 2002.
- RIBOLLA, P. E. M.; DAFFRE, S.; DEBIANCHI, A. G. Cathepsin-B and Acid-Phosphatase Activities During *Musca-Domestica* Embryogenesis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 217-223, 1993.
- ROBERTS, J. A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). I. Development of ticks on *Bos taurus*. **Journal of Parasitology**, v. 54, n. 4, p. 663-666, 1968.
- RODRIGUEZ, M. et al. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine**, v. 13, n. 18, p. 1804-1808, 1995.
- RUIZ, L. M. et al. Immune response in mice and cattle after immunization with a *Boophilus microplus* DNA vaccine containing bm86 gene. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 138-145, 2007.
- SALES-JUNIOR, P. A. et al. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm7462. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 107, n. 3-4, p. 281-290, 2005.
- SANTOS, I. K. F. de M. et al. Gene discovery in *Boophilus microplus*, the cattle tick: the transcriptomes of ovaries, salivary glands, and hemocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1026, p. 242-246, 2006.
- SASAKI, S. D. et al. *Boophilus microplus* tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors. **Biochimie**, v. 86, n. 9-10, p. 643-649, 2004.
- SEIXAS, A. et al. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. **Parasitology**, v. 126, p. 155-163, 2003.
- SEIXAS, A. et al. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDC). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 124, n. 3-4, p. 332-340, 2008.
- SORGINE, M. H. et al. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28659-28665, 2000.
- SOSSAI, S. et al. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental & Applied Acarology**, v. 37, n. 3-4, p. 199-214, 2005.
- TANAKA, A. S. et al. A double headed serine proteinase inhibitor - human plasma kallikrein and elastase inhibitor - from *Boophilus microplus* larvae. **Immunopharmacology**, v. 45, n. 1-3, p. 171-177, 1999.
- WAGLAND, B. M.; SUTHERST, R. W.; ROBERTS, J. A. Relationship between the resistance of cattle to *Haemaphysalis longicornis* and to *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, n. 9, p. 308-310, 1985.
- WILLADSEN, P.; MCKENNA, R. V.; RIDING, G. A. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. **International Journal for Parasitology**, v. 18, n. 2, p. 183-189, 1988.
- WILLADSEN, P. et al. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, v. 143, n. 4, p. 1346-1351, 1989.

ANEXO C

Artigo publicado no periódico *Acta Scientiae Veterinariae*, 35: 285-294, 2007.

Modulação da resposta imune do hospedeiro pelos carrapatos

Luís Fernando Parizi, Aoi Masuda e Itabajara da Silva Vaz Jr.

Trabalho realizado em 2007.

Colaboração dos autores para o trabalho:

Luís Fernando Parizi: Redação e revisão da literatura.

Aoi Masuda e Itabajara da Silva Vaz Jr: Redação.



Modulação da resposta imune do hospedeiro pelos carrapatos*

Modulation of the host Immune system by *ticks*

Luís Fernando Parizi¹, Aoi Masuda¹ & Itabajara da Silva Vaz Junior^{1,2}

RESUMO

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos que acarretam grandes prejuízos à produção animal. Também causam danos na saúde humana e animal pela transmissão de agentes causadores de doenças. O principal método de controle desses parasitos é baseado no uso de acaricidas. O controle imunológico surge como um método alternativo promissor. Para o sucesso desse controle, moléculas fundamentais na fisiologia do carrapato devem ser identificadas. Carrapatos da família Ixodidae podem se alimentar sobre os hospedeiros por períodos de mais de duas semanas, ativando, assim, a imunidade inata e adaptativa, como também respostas hemostáticas desses animais parasitados. Contudo, durante o curso da infestação, os carrapatos são hábeis em evadir essas defesas naturais dos hospedeiros. A saliva dos carrapatos possui um efeito inibitório sobre a ativação do sistema complemento, a inflamação e a coagulação sanguínea. Porém, são relativamente recentes os estudos na caracterização de componentes da saliva dos carrapatos com funções anticomplemento e anticoagulantes. Nos últimos anos, diversas proteínas vêm sendo descritas com essas atividades na saliva dos carrapatos, revelando um papel fundamental dessas moléculas na sobrevivência desses parasitos. Essas proteínas constituem um alvo potencial para o combate aos carrapatos.

Descritores: carrapato, glândula salivar, anticomplemento, anticoagulação, evasão imunológica.

ABSTRACT

Parasitism by ticks, and infection by tick-borne pathogens, are significant medical and veterinary problems. In this moment, the main method of control is based on the acaricides. However, the use of vaccines has been studied as a promising control method. The key to the success in this strategy is the characterization of tick molecules that can be useful as antigens. Ixodid tick species feed on a host for long periods of two weeks or more, so the host can produce protection against the tick, which include haemostatic responses and activation of innate and adaptive immunity. However, ticks are able to evade the immune response during the normal course of an infestation. Inhibitory effects of saliva in the complement activation, inflammation and blood coagulation are observed in many tick species. Recently, novel salivary molecules involved in the host-parasite interaction and in tick evasion mechanism have been described and these molecules can be useful in studies geared to develop methods to control tick infestation.

Key words: tick, salivary gland, anticomplement, immune evasion, anticoagulation.

I. INTRODUÇÃO

II. MOLÉCULAS DA GLÂNDULA SALIVAR QUE MODULAM A FISIOLOGIA DO HOSPEDEIRO

1. Modulação da resposta imune adquirida

2. Modulação do sistema complemento

3. Modulação da coagulação sanguínea

III. DISCUSSÃO

I. INTRODUÇÃO

Para realizarem seu comportamento hematófago caracterizado por longos períodos de alimentação sobre o hospedeiro, os carrapatos tiveram que desenvolver mecanismos para modular muitos dos processos fisiológicos dos seus hospedeiros [8], como por exemplo, a vasoconstrição, a inflamação e a resposta imunológica [41]. Apenas uma pequena resposta inflamatória na pele é observada quando os carrapatos estão se alimentando em seus hospedeiros naturais. Esta resposta inflamatória deficiente deve-se a fatores imunomoduladores secretados pelos carrapatos durante a sua alimentação no local da lesão [8]. Essa modulação do sistema imune possivelmente ocorre em decorrência a alterações na resposta imune induzida por linfócitos T [27].

Para modular essas defesas do hospedeiro, os carrapatos possuem substâncias com efeitos vasodilatadores e imunossupressores que auxiliam sua alimentação. Com os efeitos de vasoconstrição, inflamação e da resposta imunológica prejudicados, os carrapatos conseguem se fixar mais facilmente, mantendo o sangue fluindo sem a ocorrência de resposta fisiológica efetiva do hospedeiro para a eliminação do parasito. Conseqüentemente, patógenos têm sua transmissão facilitada durante o período em que o carrapato está se alimentando. Assim, certos patógenos podem utilizar esta lesão na pele do hospedeiro que está profundamente alterada pelos efeitos da saliva do carrapato como porta de entrada para uma infecção [41].

São relativamente recentes a identificação molecular e a caracterização de componentes da saliva dos carrapatos com funções anticomplemento e anticoagulantes. Nos últimos anos, diversas proteínas vêm sendo descritas com essas atividades na saliva dos carrapatos, revelando um papel fundamental dessas moléculas na sobrevivência desses parasitos. Essa

constatação tem sido reforçada com estudos que examinam esses fatores da saliva [41]. O complemento é um dos primeiros mecanismos do sistema imunológico ativado pelos carrapatos quando esses ectoparasitos se alimentam no hospedeiro. A ativação desse sistema pode resultar em danos para o carrapato mediado pela resposta inflamatória do hospedeiro [43].

Para se alimentarem, os animais hematófagos precisam bloquear os mecanismos de hemostasia do hospedeiro produzindo substâncias antagonistas que serão secretadas nos hospedeiros através da saliva. A atividade anticoagulante dos componentes da saliva dos carrapatos ainda não foi precisamente caracterizada. As pesquisas dessas substâncias têm revelado uma enorme variedade de funções anticoagulantes, revelando o uso potencial dessas moléculas para terapêutica ou como ferramentas para estudos da fisiologia dos processos vasculares e hemostáticos [4].

II. MOLÉCULAS DA GLÂNDULA SALIVAR QUE MODULAM A FISIOLOGIA DO HOSPEDEIRO

1. Modulação da resposta imune adquirida

A saliva dos carrapatos contém proteínas que são secretadas no organismo dos animais parasitados, onde podem induzir respostas imunes do tipo humoral e celular. O animal parasitado tem reações inflamatórias na pele, devido à hipersensibilidade a essas proteínas secretadas pelo carrapato. Isso causa eritema e edema que prejudica a fixação do parasito, embora essa modificação não seja suficiente para afetar seriamente o parasito. Esse processo de inflamação cutânea do animal parasitado pode restringir o fluxo sanguíneo para o local de fixação do carrapato, prejudicando, assim a fonte de alimentação dos carrapatos [42].

A resposta imunológica dos hospedeiros contra carrapatos envolve células apresentadoras de antígenos, citocinas, linfócitos B e T, granulócitos, entre

outras células e moléculas [49]. Organismos causadores de doenças são hábeis em suprimir ou desviar a resposta imune inata e específica dos hospedeiros. Algumas dessas estratégias imunomodulatórias empregadas incluem: bloquear a função das células apresentadoras de antígenos; reduzir a atividade dos linfócitos T; suprimir e desativar a produção e ação de citocinas; diminuir a resposta a anticorpos e bloquear a ativação do sistema complemento [50].

Para modular as respostas do hospedeiro contra o parasitismo, os carrapatos secretam moléculas que modulam o sistema imune do hospedeiro [43]. Proteínas que se ligam à histamina e a IgG foram encontradas na saliva do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus*, subvertendo o sistema de defesa do hospedeiro [35].

Estudos comprovam que esses parasitos interferem no estímulo de para a ativação de linfócitos T. Pode-se citar como exemplo um estudo em que o extrato de glândula salivar do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inibiu a proliferação de células T de bovinos que foram estimuladas, *in vitro*, com mitógenos [43]. A diferenciação de células T CD4⁺ em células T_h1 ou T_h2 é influenciada pelo ambiente da pele parasitada e por moléculas da saliva do carrapato [27]. A natureza do agente invasor e os tipos de resposta imune inata envolvida determinam qual o tipo de célula T auxiliar irá se desenvolver [20].

A saliva e o extrato da glândula salivar da espécie de carrapato *Ixodes ricinus* possui um efeito supressivo na resposta imune inata em camundongos BALB/c [29]. Estudos *in vitro* demonstram que a saliva do carrapato *I. ricinus* polariza a resposta imune para o tipo T_h2, revelando a importância da saliva na habilidade de modular o sistema imune por reduzir a resposta imune tipo T_h1 e estimulação do tipo T_h2 [27]. Foram comparados grupos de camundongos BALB/c que foram ou infestados com *I. ricinus* parasitados com *Borrelia burgdorferi* ou infectados experimentalmente. Nos camundongos infectados experimentalmente, desenvolveu-se uma resposta imune do tipo T_h1 e T_h2 com a produção de IgG2a antiborrélica. Em contraste, nos camundongos infestados pelos carrapatos ocorreu uma modulação da resposta imune celular para o tipo T_h2, com a produção de IgG2a antiborrélica diminuída [6].

Um estudo *in vitro* foi realizado comparando-se o efeito de diferentes concentrações de saliva e extrato de glândula salivar de *I. ricinus* na imunidade

adquirida em camundongos BALB/c. O efeito de antígenos da glândula salivar e da saliva no sistema imunológico foi estudado pela proliferação de linfócitos e a secreção de IL-4 por células do linfonodo. Baixas concentrações de antígenos revelaram serem estimuladoras do sistema imune, enquanto altas concentrações de antígenos mostraram serem depressoras do sistema imune. A proliferação de linfócitos e a secreção de IL-4 aumentaram em resposta a baixas doses de antígenos do carrapato. Contudo, quando altas doses desses antígenos eram usadas, a proliferação de linfócitos e a secreção de IL-4 foram reduzidas [29].

Em *Ixodes scapularis* foi identificada uma proteína salivar (Salp15) que é diretamente responsável pela repressão da produção de interleucina-2 (IL-2) durante o desenvolvimento da resposta imune. Essa proteína é responsável, pelo menos parcialmente, na ação imunomodulatória da saliva do carrapato na resposta imune do hospedeiro [2]. Essa modulação seria feita pela ligação específica da Salp15 com as moléculas CD4 de células T. Em células T, a glicoproteína CD4 funciona com um co-receptor do receptor de células T (TCR). Esse co-receptor amplifica o sinal gerado pelo TCR recrutando Lck, que é essencial para a ativação de muitas moléculas envolvidas na cascata de sinalização de células T ativada. Essa interação entre Salp15 e CD4 causa a redução na produção de IL-2 durante o estímulo das células T [19].

As prostaglandinas aparentemente auxiliam a reverter o efeito dos vasoconstritores liberados pelas plaquetas e/ou aumentar o fluxo sanguíneo na pele [21]. Além dessa função inibitória de vasoconstrição, as prostaglandinas presentes na saliva de *R. microplus* mostraram atividade de supressão da produção de IFN-g e IL-2, que são citocinas produzidas por células T_h1 [43].

Entre os mecanismos de evasão dos carrapatos através da modulação da resposta imunológica, é sugerido um mecanismo de “seqüestro” de imunoglobulinas do hospedeiro no intestino do carrapato com posterior transporte dessas proteínas até as glândulas salivares. Essas imunoglobulinas são secretadas junto com a saliva do carrapato durante a alimentação do parasito [45].

2. MODULAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

O dano tecidual causado durante a lesão na pele na fase de fixação do carrapato pode resultar em uma rápida ativação do sistema complemento do

hospedeiro pela resposta da fase aguda. Conseqüentemente, a imediata inibição da atividade da via alternativa do complemento se faz necessária para o sucesso da alimentação. Presumivelmente, o carrapato necessitaria estocar esses fatores anticomplemento nos ácinos da glândula salivar antes da fase de alimentação. A atividade anticomplemento das espécies da família Ixodidae é espécie-específica para parasita-hospedeiro, sugerindo diferentes alvos de atividade anticomplemento entre as diferentes espécies dessa família de carrapatos [22]. Contudo, devemos atentar que fatores ecológicos e fisiológicos exercem também um papel na determinação da suscetibilidade de um hospedeiro para uma espécie de carrapato em particular [22].

Entre as diversas atividades imunossupressoras encontradas na saliva dos carrapatos encontra-se a habilidade de bloquear ou inibir a ação do sistema complemento. Quando cobaias previamente infestadas por *Dermacentor andersoni* foram tratadas com um veneno de serpente capaz de inibir o sistema complemento apresentaram diminuição na expressão da resistência adquirida. Por outro lado, cobaias deficientes em C4 (componente da via clássica) não mostraram diferença na rejeição a carrapatos, sugerindo o envolvimento da via alternativa no processo de resistência [48]. A atividade anticomplemento já foi demonstrada em carrapatos através de estudos *in vitro* com extrato de glândula salivar de *I. ricinus* [22], *I. hexagonus* [22], *I. uriae* [22], *I. scapularis* [38] e *Ornithodoros moubata* [3].

Os níveis de C3 aumentam quando o hospedeiro desenvolve resistência, ocorrendo a deposição de C3 no intestino dos carrapatos alimentados e também nas vesículas epidérmicas que se desenvolvem no hospedeiro abaixo do ponto de fixação do carrapato [1,37]. A atividade anticomplemento vem sendo descrita em diversas espécies através de diferentes pontos na cascata do complemento. Por exemplo, o parasito *Echinococcus granulosus* inibe a ativação do complemento através do seqüestro do fator H dentro da parede do cisto hidático [10]. Diferentemente, a forma resistente ao sistema complemento de *Schistosoma mansoni* secreta uma protease que hidrolisa C3 e C9 *in vitro* [25]. Estudos mostram também que a saliva do carrapato *I. dammini* contém um inibidor da ativação da via alternativa do complemento que inibe a deposição de C3b e a liberação da anafilatoxina C3a [38].

O processo de ativação da via alternativa está ligado aos reguladores de ativação do complemento (RAC). Através desses reguladores da via alternativa, o hospedeiro inibe a ação do sistema complemento nas próprias células. Os RAC possuem em comum uma estrutura formada por pequenas repetições (SCR) que funcionam como unidades funcionais, capazes de inibir a ação do complemento em vários pontos da cascata do complemento [28]. Cada SCR contém quatro cisteínas que formam pontes disulfetos conferindo uma forma de pérola aos domínios SCR. Os carrapatos, ao tentarem inibir o sistema complemento, secretam, através da saliva, proteínas com funções análogas a esses RCA. Uma nova proteína anticomplemento, denominada Isac, foi descrita na glândula salivar de *I. scapularis*. Essa proteína possui uma função reguladora do sistema complemento pela via alternativa de uma maneira similar a duas proteínas RCA (fator acelerador da dissociação e o fator H). Isac não possui similaridade com nenhuma molécula anticomplemento já descrita. Contudo, a presença de quatro cisteínas em Isac sugere que possa haver uma homologia funcional a SCR derivada por evolução convergente. Em *I. ricinus*, estudos revelaram duas dessas proteínas (IRAC I e II). Essas proteínas seriam expressas constitutivamente na glândula salivar desse carrapato tendo sua expressão aumentada durante a alimentação do parasito. As proteínas anticomplemento da família Ixodidae não possuem homologia detectável com nenhuma seqüência protéica já reportada previamente. Isso sugere que a atividade anticomplemento das IRACs, que possuem um sítio ativo semelhante às RAC, foi desenvolvida por um processo de evolução convergente [8].

A atividade anticomplemento da saliva do carrapato *I. ricinus* foi testada através de experimentos de hemólise com hemácias de ovelha. Ficou demonstrado que a atividade anticomplemento é estimulada conforme a concentração de proteínas da saliva é aumentada. Ocorre inibição máxima do sistema complemento com redução de 70% de lise das hemácias [29].

Uma proteína inibidora do sistema complemento foi descrita recentemente no carrapato *O. moubata* [34]. Essa proteína, pertencente à família das lipocalinas, foi denominada OmCI. Sua estrutura está relacionada com a ligação de histamina [24,36]. OmCI inibe o sistema complemento pela via clássica e pela via alternativa e atua especificamente na molécula

de C5 da cascata de ativação do complemento porque previne a produção de C5a a partir de C5, não afetando, contudo, a produção de C3a pela ativação de C3. Assim, OmCI apresenta a sua atividade por um mecanismo inteiramente diferente ao do inibidor contido na saliva de *I. scapularis*, que é específico na inibição da via alternativa e previne a deposição de C3b e a liberação de C3a [38], provavelmente pela dissociação acelerada do fator Bb a partir da C3 convertase. O mecanismo preciso de ligação a C5, estrutura, e funções acessórias nos fatores séricos ainda não foram elucidados [34].

A calreticulina é uma proteína que possui participação em diversas funções celulares como ligação ao cálcio, e está presente na saliva dos carrapatos [11]. Estudos revelaram que em diversos modelos parasito-hospedeiro, essa proteína possui atividade anticomplemento. Experimentos *in vitro* revelaram que a inibição do sistema complemento ocorre pela ligação da calreticulina com C1q [18,29]. No carrapato *Amblyomma americanum* foi demonstrado a secreção de calreticulina na saliva diretamente no hospedeiro, sendo sugerido que atue modulando o sistema imune e/ou a hemostasia do hospedeiro [17].

A atividade anticomplemento dos carrapatos pode ter também um papel fundamental na transmissão de patógenos como a espiroqueta *B. burgdorferi* [46]. Ratos deficientes de C3 e C5 são suscetíveis à febre recorrente. Essa suscetibilidade não ocorre quando o sistema imune dos roedores está íntegro [7]. O tratamento de patógenos sensíveis ao soro de mamíferos (como por exemplo, a *B. garinni*), com extrato de glândula salivar de *I. ricinus* reduz a atividade do soro contra esse organismo. Assim, o bloqueio da atividade anticomplemento em espécies de carrapatos da família Ixodidae podem ajudar na proteção de espécies suscetíveis a *B. garinni* quando esses patógenos são transmitidos da saliva do carrapato para o organismo do hospedeiro. Essa proteção não acontece quando a *B. garinni* está no intestino do carrapato, ficando, assim, suscetível ao sistema de defesa do hospedeiro [22]. Sendo assim, os organismos patogênicos são mais infectantes quando estão na presença da saliva do carrapato, reforçando o conceito de transmissão ativada pela saliva como uma ação paralela do carrapato, aumentando, assim, a transmissão de patógenos para o hospedeiro.

3. MODULAÇÃO DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Ao longo da evolução, as espécies de animais hematófagos desenvolveram um grande repertório de substâncias anti-hemostáticas. A capacidade de hematofagia é um fenômeno que surgiu diversas vezes na evolução das espécies de maneira independente. Algumas famílias e mesmo gêneros de insetos que possuem espécies hematófagas divergiram antes do aparecimento dos mamíferos, de modo que mesmo espécies muito próximas apresentam soluções diferentes para bloquear a hemostasia dos respectivos hospedeiros [16,35].

As pequenas quantidades dos fatores de coagulação nos organismos dificultam seu estudo. Mesmo assim, o isolamento de agentes anticoagulantes e a caracterização dos seus sítios de ação vem sendo cada vez maior devido ao desenvolvimento da química de proteínas, da biologia molecular e da elucidação da bioquímica da coagulação [26,51].

Os alvos mais frequentes para os inibidores da cascata de coagulação são o fator Xa e a trombina. Essas duas moléculas fazem parte tanto da via extrínseca como da via intrínseca. A trombina desenvolve um papel central na hemostasia, não apenas convertendo fibrinogênio em fibrina, mas também por regular a sua própria produção pela ativação de outros fatores da coagulação (fV, fVIII, fXI, e proteína C) [15].

Foi caracterizado um inibidor de fXa na espécie de carrapato *I. ricinus* que foi denominado de ixodina [26]. *I. ricinus* apresenta também um inibidor de trombina denominado ixina, que inibe também a agregação plaquetária induzida por trombina [14].

O TAP é um inibidor de serinoproteases de baixo peso molecular, isolado de extratos do carrapato *O. moubata* e é um ligador específico para o fator Xa. O TAP inicialmente se liga ao fator Xa com baixa afinidade, em um sítio distinto do sítio catalítico e, posteriormente, interage com alta afinidade com o sítio ativo, formando um complexo inibidor-enzima estável. A inibição do fator Xa pelo TAP é dependente de dose. Verificou-se através de ensaios *in vitro*, que essa proteína atua como um anticoagulante plasmático humano. O TAP tem homologia limitada com os inibidores de Kunitz, sendo, diferentemente dos inibidores dessa classe, inibidor específico do fator Xa [47].

Uma proteína anticoagulante denominada Salp14 foi purificada da saliva do carrapato *I. scapu-*

laris. Verificou-se que a proteína recombinante Salp14 teve a capacidade de inibir a atividade do fator Xa de uma maneira dose dependente. Anticorpos gerados contra a Salp14 recombinante inibiu mais de 80% da atividade anticoagulante da saliva do carrapato. Isso sugere uma grande participação dessa proteína na atividade anticoagulante na saliva desse carrapato. A inabilidade do anti-soro para Salp14 provocar a completa inibição da atividade anticoagulante sugere que existem outros fatores inibindo a cascata de coagulação do hospedeiro [31].

O TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) é um inibidor do fator VIIa, dependente do fator Xa, que está presente em pequena quantidade no sangue, na forma livre ou estocado em plaquetas. A maior parte desse inibidor está ligada a lipoproteínas ou ao endotélio. O TFPI inibe diretamente o fator Xa e isso serve como co-fator para inibição do complexo fator tecidual/fator VIIa [9]. Recentemente, foi obtido a partir de uma biblioteca de DNA complementar de glândula salivar de *I. scapularis* uma proteína recombinante com propriedades semelhantes ao inibidor da via extrínseca da coagulação TFPI. A proteína recombinante obtida é um inibidor específico do fVIIa/FT dependente de fX ou fXa. O ixolaris, como esse inibidor foi chamado, apresenta similaridade com membros da família de inibidores Kunitz. O mecanismo de ação proposto para o ixolaris é a interação com o fVIIa/FT via domínio Kunitz 1 e com fX(a) via domínio Kunitz 2, formando um complexo quaternário fVIIa/FT/ixolaris/fX(a) [12]. Embora ixolaris apresente uma grande homologia de estrutura primária com TFPI, essa proteína não se liga ao sítio catalítico FXa. Diferentemente, a formação do complexo é mediada por um número de resíduos com superfície carregada que constituem um exsítio ligador de heparina de FXa [30]. Testes realizados com a administração intravenosa e subcutânea de ixolaris recombinante em ratos mostraram que essa proteína possui um potente efeito antitrombótico, com uma meia-vida prolongada e com baixos efeitos colaterais de hemorragia e de sangramento [32]. Mais recentemente, uma proteína recombinante com propriedades semelhantes a TFPI foi encontrada também na glândula salivar do carrapato *I. scapularis*. Diferentemente da ixolaris que possui dois domínios Kunitz, essa proteína recombinante, denominada penthalaris, possui cinco domínios Kunitz [6].

A saliva do carrapato *D. andersoni* também possui atividade anticoagulante. A via intrínseca e extrínseca de coagulação é inibida com extratos de glândula salivar desses carrapatos. Esses anticoagulantes são direcionados contra o fator V e VII [13]. Foi descrito o isolamento de uma proteína, denominada variabilina, da glândula salivar de *D. andersoni*. Essa proteína é um potente inibidor de agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno e trombina, e também inibe a adesão do fibrinogênio a GPIIb/IIIa. A inibição da coagulação ocorre porque a variabilina contém a seqüência RGD. Os parasitas hematófagos tem usado a habilidade da seqüência RGD, contida em suas moléculas, para inibir a ligação de Fg e outras proteínas ao GPIIb-IIIa como base da ação de uma variedade de agentes naturais antiplaquetários. A variabilina é o primeiro antagonista, contendo RGD, de GPIIb-IIIa encontrado em carrapatos [46].

Estudos revelaram que a saliva do carrapato *R. microplus* é um inibidor das vias extrínsecas e intrínsecas da cascata de coagulação. Um anticoagulante denominado BmAP (*Boophilus microplus Anticoagulant Protein*), foi isolado da saliva desse carrapato. Essa proteína mostrou um tempo prolongado de recalcificação e de protrombina em ensaios com plasma de bovino. A BmAP inibe a agregação plaquetária induzida por trombina ligando-se ao sítio ativo dessa proteína provavelmente pelo exsítio I [4,15]. A saliva desse carrapato contém ainda outra molécula inibidora de trombina, que foi denominada de microfilina pelo seu tamanho reduzido. De fato, essa proteína é a menor inibidora de trombina encontrada na saliva de carrapatos já descrita. Seu mecanismo de ação para a inibição da agregação plaquetária é semelhante ao da BmAP. A microfilina atua bloqueando o exsítio I da trombina [5].

III. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, o controle do carrapato vem sendo realizado principalmente com produtos químicos. Mas com o passar dos anos, esse método de controle vem se tornando cada vez mais difícil, pois os carrapatos resistentes a esses compostos acabam sobrevivendo, tornando o princípio ativo do acaricida obsoleto, devido a seleção de populações resistentes [44]. Como consequência, tem-se o aumento das doses de acaricidas, e isso agrava a contami-

nação de produtos alimentícios derivados de origem animal, além de causar poluição química no ambiente. Adicionalmente, há cada vez mais a preocupação, por parte da população, do consumo de alimentos produzidos sem o uso de agentes químicos [33]. A falta de atenção a essas tendências de consumo de alimentos pelos mercados consumidores pode ter efeitos negativos às exportações de alimentos. Por essas razões, estão sendo desenvolvidas alternativas para o controle dos carrapatos, entre elas, o uso de vacinas [23].

A alimentação de carrapatos sobre os seus respectivos hospedeiros, resistentes ou não a esses ectoparasitos, resulta na ativação de uma resposta inflamatória e imunológica [41]. As espécies de carrapatos da família Ixodidae se alimentam por períodos extensos de mais de 14 dias de duração, permitindo um amplo tempo de ativação da resposta imune inata e adaptativa. Proteínas do sistema complemento são ativadas em resposta a infestação por esses carrapatos. O sucesso da alimentação dos carrapatos depende da capacidade de suprimir as defesas dos hospedeiros por antagonismo das respostas inflamatórias montadas pelos animais parasitados. Para tanto, utilizam moléculas bioativas contidas nas glândulas salivares e as secretam nos locais de alimentação pela saliva [38].

Se a saliva dos carrapatos favorece a transmissão de organismos infecciosos, seria possível controlar a transmissão desses patógenos pela vacinação do hospedeiro contra as moléculas contidas na saliva que potencializam a infecção. Assim, ter-se-ia o bloqueio do efeito da saliva dificultando o estabelecimento do patógeno. Esta possibilidade é uma das mais importantes razões para se estudar efeitos imunomodulatórios na saliva dos carrapatos e assim oferecer um novo método para o controle de muitas doenças transmitidas por esses ectoparasitos [41].

Os efeitos imunoreguladores da saliva dos carrapatos são realizados por diversos inibidores de células T. Uma explicação de o porquê de tantos inibidores diferentes do sistema imune seria que os carrapatos da família Ixodidae, por se alimentarem por diversos dias, necessitariam de múltiplos mecanismos para inibir a resposta imune e a inflamação causada pela sua presença no hospedeiro [41]. Os carrapatos desenvolveram, portanto, diversas moléculas moduladoras do sistema imune do hospedeiro como resposta adaptativa.

A possibilidade de neutralizar a ação dos componentes da saliva relacionados com o aumento na transmissão de patógenos abre uma nova possibilidade no desenvolvimento de vacinas, pois, além de combater os carrapatos, limitaria a transmissão de patógenos por eles transmitidos. No entanto, é necessário melhorar a eficácia do controle imunológico. Para isso, é fundamental o estudo de moléculas envolvidas na fisiologia dos carrapatos que propiciam parasitismo. O contato da saliva secretada pelo carrapato com os componentes do sistema imune e de coagulação causa uma modulação desses sistemas. O parasitismo seria prejudicado se a ação dessas moléculas presentes na saliva dos carrapatos fosse bloqueada. Por essa razão, são pesquisados na saliva alvos potenciais para o desenvolvimento de vacinas.

O mecanismo da modulação do sistema imune do hospedeiro pelos carrapatos está sendo cada vez mais elucidado. A proteína Salp15 que interage especificamente com co-receptores de células T de mamíferos pode ter outra utilidade além da prevenção da fixação dos carrapatos e da possível transmissão de patógenos para o hospedeiro. Além disso, esses estudos podem ser utilizados com finalidades terapêuticas, para diversas doenças auto-imunes mediadas por células T e para o desenvolvimento de medicamentos para tolerância a transplantes [19].

Estudos demonstram que a saliva do carrapato *I. ricinus* polariza a resposta imune para o tipo T_H2 . Essa dicotomia na atividade das células T auxiliaadoras é em parte associada com a suscetibilidade ou resistência a patógenos. Esses resultados evidenciam a importância da saliva dos carrapatos sobre a polarização da resposta imune para a produção de T_H2 . A neutralização dessas moléculas salivares poderia interferir com o estabelecimento da resposta imune por T_H2 e subsequentemente afetar a transmissão de patógenos transmitidos pela saliva dos carrapatos [6].

Em quase todos os sistemas analisados, a saliva dos carrapatos tem favorecido a infecção dos patógenos. Quando isso não ocorre, também não há a diminuição do poder de infecção desses patógenos. Isso revela o quanto os agentes de doenças se adaptaram aos mecanismos de evasão dos carrapatos para o seu desenvolvimento. A identificação de novas moléculas anticomplemento presentes na saliva dos carrapatos irá embasar a importância da atividade inibidora desenvolvida na relação parasito-hospedeiro.

Esses estudos ajudarão no desenvolvimento de novos alvos potenciais para o desenvolvimento de vacinas contra os carrapatos.

Podemos encontrar na glândula salivar dos carrapatos algumas moléculas com efeitos redundantes na modulação dos processos fisiológicos dos hospedeiros. É o caso das proteínas ixolares e penthalaris que inibem a cascata de coagulação por mecanismos semelhantes permitindo, assim, a permanência da alimentação do carrapato *I. scapularis* por longos períodos. A evolução parece ter selecionado carra-

patos capazes de inibir a cascata de coagulação para que esses animais pudessem passar um longo tempo se alimentando sobre o hospedeiro [26,32].

Outra possibilidade que se abre na pesquisa da glândula salivar dos carrapatos seria o estudo de moléculas inibidoras da cascata de coagulação no que diz respeito à utilização dessas substâncias como fármacos pela indústria médica. Inibidores específicos da coagulação podem ser usado como fármacos anticoagulantes pelo seu valor terapêutico, como é o caso do TAP, que inibe especificamente o fator Xa [47].

REFERÊNCIAS

- 1 **Allen J.R., Khalil H.M. & Graham J.E. 1979.** The location of tick salivary antigens, complement and immunoglobulin in the skin of guinea-pigs infested with *Dermacentor andersoni* larvae. *Immunology*. 38: 467-472.
- 2 **Anguita J., Ramamoorthi N., Hovius J., Das S., Thomas V., Persinski R., Conze D., Askenase P., Rincón M. & Kantor F. 2002.** Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation. *Immunity*. 16: 849-859.
- 3 **Astigarraga A., Oleaga-Perez A., Perez-Sanchez R., Baranda J.A. & Encinas-Grandes A. 1997.** Host immune response evasion strategies in *Ornithodoros erraticus* and *O. moubata* and their relationship to the development of an antiargasid vaccine. *Parasite Immunology*. 19: 401-410.
- 4 **Ciprandi A., Horn F. & Termignoni C. 2003.** Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 25: 250-262.
- 5 **Ciprandi A., De Oliveira S.K., Masuda A., Horn F. & Termignoni C. 2006.** *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Experimental Parasitology*. 114: 40-46.
- 6 **Christe M., Rutti B. & Brossard M. 2000.** Cytokines (IL-4 and IFN- γ) and antibodies (IgE and IgG2a) produced in mice infected with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto via nymphs of *Ixodes ricinus* ticks or syringe inoculations. *Parasitology Research*. 86: 491-496.
- 7 **Connolly S.E. & Benach J.L. 2001.** Cutting edge: the spirochetemia of murine relapsing fever is cleared by complement-independent bactericidal antibodies. *The Journal of Immunology*. 167: 3029-3032.
- 8 **Daix V., Schroeder H., Praet N., Georjin J.P., Chiappino I., Gillet L., De Fays K., Decrem Y., Leboulle G., Godfroid E., Bollen A., Pastoret P.P., Gern L., Sharp P.M. & Vanderplasschen A. 2007.** *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Molecular Biology*. 16: 155-166.
- 9 **De Oliveira L.C.O. & Franco R.F. 2001.** Novas drogas anticoagulantes. In: *Simpósio: hemostasia e trombose* (Ribeirão Preto, Brasil). p. 276-281.
- 10 **Diaz A., Ferreira A. & Sim R.B. 1997.** Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. *The Journal of Immunology*. 158: 3779-3786.
- 11 **Ferreira C.A.S., Vaz I.D., Da Silva S.S., Haag K.L., Valenzuela J.G. & Masuda A. 2002.** Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Experimental Parasitology*. 101: 25-34.
- 12 **Francischetti I.M.B., Valenzuela J.G., Andersen J.F., Mather T.N. & Ribeiro J.M.C. 2002.** Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood*. 99: 3602-3612.
- 13 **Gordon J.R. & Allen J.R. 1991.** Factors V and VII anticoagulant activities in the salivary glands of feeding *Dermacentor andersoni* ticks. *The Journal of Parasitology*. 77: 167-170.
- 14 **Hoffmann A., Walsmann P., Riesener G., Paintz M. & Markwardt F. 1991.** Isolation and characterization of a thrombin inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*. *Pharmazie*. 46: 209-212.
- 15 **Horn F., Dos Santos P.C. & Termignoni C. 2000.** *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 384: 68-73.
- 16 **Imamura S., Vaz I.D., Sugino M., Ohashi K. & Onuma M. 2005.** A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*. 23: 1301-1311.

- 17 **Jaworski D. C., Simmen F. A., Lamoreaux W., Coons L. B., Muller M. T. & Needham G. R. 1995.** A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *Journal of Insect Physiology*. 41: 369-375.
- 18 **Johnson S., Michalak M., Opas M. & Eggleton P. 2001.** The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extra-cellular space. *Trends in Cell Biology*. 11: 122-129.
- 19 **Juncadella I.J., Garg R., Ananthnarayanan S.K., Yengo C.M. & Anguita J. 2007.** T-cell signaling pathways inhibit by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *Immunology & Medical Microbiology*. 49: 433-438.
- 20 **Kitano H. & Oda K. 2006.** Robustness trade-offs and host-microbial symbiosis in the immune system. *Molecular Systems Biology*. doi: 10.1038/msb4100039.
- 21 **Law J.H., Ribeiro J.M.C. & Wells M.A. 1992.** Biochemical insights derived from insect diversity. *Annual Review of Biochemistry*. 61: 87-111.
- 22 **Lawrie C.H., Randolph S.E. & Nuttall P.A. 1999.** Ixodes ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Experimental Parasitology*. 93: 207-214.
- 23 **Leal A.T., Seixas A., Pohl P.C., Ferreira C.A.S., Logullo C., Oliveira P.L., Farias S.E., Termignoni C., Vaz I.D. & Masuda A. 2006.** Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 114: 341-345.
- 24 **Mans B.J., Louw A.I. & Neitz A.W.H. 2003.** The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, *Ornithodoros savignyi*, are part of the tick lipocalin family: Implications for the origins of tick toxicoses. *Molecular Biology and Evolution*. 20: 1158-1167.
- 25 **Marikovsky M., Arnon R. & Fishelson Z. 1990.** *Schistosoma mansoni*: localization of the 28 kDa secreted protease in cercaria. *Parasite Immunology*. 12 389-401.
- 26 **Markwardt F. 1994.** Coagulation inhibitors from blood-sucking animals. A new line of developing antithrombotic drugs. *Pharmazie*. 49: 313-316.
- 27 **Mejri N. & Brossard M. 2007.** Splenic dendritic cells pulsed with *Ixodes ricinus* tick saliva prime naive CD4⁺t to induce γ_2 cell differentiation *in vitro* and *in vivo*. *International Immunology*. 19: 535-543.
- 28 **Meri S. & Jarva H. 1998.** Complement regulation. *Vox Sang*. 74: 291-302.
- 29 **Michalak M., Corbett E.F., Mesacli N., Nakamura K. & Opas M. 1999.** Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochemical Journal*. 344: 281-292.
- 30 **Monteiro R.Q., Rezaie A.R., Ribeiro J.M.C. & Francischetti I.M.B. 2005.** Ixolaris: a factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. *Biochemical Journal*. 387: 871-877.
- 31 **Narasimhan S., Koski R.A., Beaulieu B., Anderson J.F., Ramamoorthi N., Kantor F., Cappello M. & Fikrig E. 2002.** A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Molecular Biology*. 11: 641-650.
- 32 **Nazareth R.A., Tomaz L.S., Ortiz-Costa S., Atella G.C., Ribeiro J.M.C., Francischetti I.M.B. & Monteiro R.Q. 2006.** Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. *Thrombosis and Haemostasis*. 96: 7-13.
- 33 **Nolan J. 1985.** Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 18: 155-166.
- 34 **Nunn M.A., Sharma A., Paesen G.C., Adamson S., Lissina O., Willis A.C. & Nuttall P.A. 2005.** Complement Inhibitor of C5 Activation from the Soft Tick *Ornithodoros moubata*. *The Journal of Immunology*. 174: 2084-91.
- 35 **Paesen G.C., Adams P.L., Harlos K., Nuttall P.A. & Stuart D.I. 1999.** Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Molecular Cell*. 3: 661-671.
- 36 **Paesen G.C., Adams P.L., Nuttall P.A. & Stuart D.L. 2000.** Tick histamine binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1482: 92-101.
- 37 **Papatheodorou V. & Brossard M. 1987.** C3 levels in the sera of rabbits infested and reinfested with *Ixodes ricinus* and in the midguts of fed ticks. *Experimental and Applied Acarology*. 3: 53-59.
- 38 **Ribeiro J.M. 1987.** *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Experimental Parasitology*. 64: 347-353.
- 39 **Ribeiro J.M. 1995.** Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Disease*. 4: 143-152.
- 40 **Till W.M. 1961.** A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann. *Memoirs of the Entomological Society of South Africa*. 6: 1-124.
- 41 **Titus R.G., Bishop J.V. & Mejia J.S. 2006.** The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology*. 28: 131-141.

- 42 **Tizard I.R. 2000.** *Immunity to Parasites. In: Veterinary Immunology: An Introduction.* Philadelphia: W. B. Saunders, pp. 280-294.
- 43 **Turni C., Lee R.P. & Jackson L.A. 2007.** The effects of salivary gland extracts from *Boophilus microplus* ticks on mitogen-stimulated bovine lymphocytes. *Veterinary Research Communications*. 31: 545-552.
- 44 **Vaz, I.D., Lermen T.T., Michelin A., Ferreira C.A.S., Freitas D.R.J., Termignoni C. & Masuda A. 2004.** Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*. 119: 237-245.
- 45 **Wang H. & Nuttall P.A. 1999.** Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cell and Molecular Life Sciences*. 56: 286-295.
- 46 **Wang X., Coons L.B., Taylor D.B., Stevens S.E. & Gartner T.K. 1996.** Variabilin a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 271: 17.785-17.790.
- 47 **Waxman L., Smith D.E., Arcuri K.E. & Vlasuk G.P. 1990.** Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science*. 248: 593-596.
- 48 **Wikel S.K. & Allen J.R. 1977.** Acquired resistance to ticks: III Cobra venom factor and the resistance response. *Immunology*. 32: 457-465.
- 49 **Wikel S.K. 1999(a).** Modulation of the host immune system by ectoparasitic arthropods. *BioScience*. 49: 311-320.
- 50 **Wikel S.K. 1999(b).** Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *International Journal for Parasitology*. 29: 851-859.
- 51 **Zavalova L.L., Basanova A.V. & Baskova I.P. 2002.** Fibrinogen-fibrin system regulators from bloodsuckers. *Biochemistry (Mosc)*. 67: 135-142.

ANEXO D

CURRICULUM VITÆ resumido

PARIZI, L. F.

1. DADOS PESSOAIS:

Nome: Luís Fernando Parizi

Local e data de nascimento: Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 17/04/1983

Endereço profissional: Centro de Biotecnologia- UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500
Prédio 43421 - Campus do Vale, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone profissional: (51) 3308- 6078 E-mail: luisfparizi@cbiot.ufrgs.br

2. FORMAÇÃO:

Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Período: 2001 a 2007.

Mestrado em andamento no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.
Título: Proteção cruzada contra a infestação de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em bovinos vacinados com a glutatona S-transferase recombinante de *Haemaphysalis longicornis*.

Orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior.

Co-orientadora: Dra. Aoi Masuda.

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Período: 2008-Atual.

3. ESTÁGIOS:

Estágio de iniciação científica, Laboratório de Imunologia Aplicada a Sanidade Animal, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.

Orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior. Sem Bolsa. Período: 04/2004 a 03/2005.

Orientadora: Dra. Aoi Masuda. Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. Período: 04/2005 a 08/2006.

Orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior. Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. Período: 10/2006 a 07/2007.

4. ARTIGOS COMPLETOS:

PARIZI, L. F.; POHL, P. C.; MASUDA, A. & DA SILVA VAZ, I. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18: 1-7, 2009.

PARIZI, L. F.; Herbert, R.; FERREIRA, C. A. S.; IMAMURA, S.; OHASHI, K.; ONUMA, M.; MASUDA, A. & DA SILVA VAZ, I. Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* calreticulins. *Veterinary Parasitology (Print)*, 164: 282-290, 2009.

PARIZI, L. F.; MASUDA, A. & DA SILVA VAZ, I. Modulation of the host Immune system by ticks. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35: 285-294, 2007.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

PARIZI, L. F.; MASUDA, A. & DA SILVA VAZ, I. Vaccination of Bovines with the Recombinant *Haemaphysalis longicornis* Glutathione S-transferase. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Águas de Lindóia. Livro de Resumos da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2009.

GUIZZO, M. G.; PARIZI, L. F.; ANDRADE, C. P.; LOGULLO, C.; MASUDA, A. & DA SILVA VAZ, I. Cloning of the Gene and Characterization of the Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Águas de Lindóia. Livro de Resumos da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2009.

- OLDIGES, D. P.; PARIZI, L. F.; SEIXAS, A.; LORENZINI, D. M.; DA SILVA VAZ, I. & TERMIGNONI, C. Cloning and Expression of an Ovary Protein from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Aguas de Lindóia. Livro de Resumos da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2009.
- OLDIGES, D. P.; PARIZI, L. F.; SEIXAS, A.; LORENZINI, D. M.; DA SILVA VAZ, I. & TERMIGNONI, C. Expressão e purificação da cisteíno endopeptidase VTDCE: antígeno para vacina contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: II Semana Científica da UFCSPA, Porto Alegre- RS, 2009.
- SCHULER, A.D; PARIZI, L. F.; LOGULLO, C.; MASUDA, A.; & DA SILVA VAZ, I. Clonagem e expressão de dois fragmentos do gene da Glicogênio Sintase Quinase de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre- RS. Livro de Resumos do XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2009.
- GUIZZO, M. G.; PARIZI, L. F.; ANDRADE, C. P.; LOGULLO, C.; MASUDA, A. & DA SILVA VAZ, I. Clonagem do gene e caracterização da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre- RS. Livro de Resumos do XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2009.
- OLDIGES, D. P.; PARIZI, L. F.; SEIXAS, A.; LORENZINI, D. M.; DA SILVA VAZ, I. & TERMIGNONI, C. Clonagem e expressão da VTDCE de ovário de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre-RS. Livro de Resumos do XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2009.
- PARIZI, L. F.; MASUDA, A. & DA SILVA VAZ, I. Cloning of a recombinant cystatin from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Águas de Lindóia- SP. Livro de Resumos da XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 11: 8227, 2008.
- OLDIGES, D. P.; PARIZI, L. F.; SEIXAS, A.; LORENZINI, D. M.; DA SILVA VAZ, I. & TERMIGNONI, C. Clonagem da Cisteíno Endopeptidase Degradadora de Vitelinade uma proteína de ovário do Carrapato *Rhipicephalus microplus*. In:

- XX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Porto Alegre- RS. Livro de Resumos do XX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 20: 407, 2008.
- PARIZI, L. F.; RECH, R.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.; MASUDA, A. & DA SILVA VAZ, I. Evaluation of immunogenicity in bovines of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemaphysalis longicornis* recombinant calreticulins. In: 8th International Veterinary Immunology Symposium, Ouro Preto- MG. Program and Book of abstracts of the International Veterinary Immunology Symposium, 1: 100, 2007.
- PARIZI, L. F.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.; MASUDA, A. & DA SILVA VAZ, I. Avaliação da imunogenicidade em bovinos e camundongos da calreticulina recombinante do carrapato *Haemaphysalis longicornis*. In: XIX Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre- RS. Livro de Resumos do XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007.
- PARIZI, L. F.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.; DA SILVA VAZ, I. & MASUDA, A. Cloning, expression and partial characterization of a recombinant calreticulin from *Haemaphysalis longicornis*. In: XXXV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, Águas de Lindóia- SP. Livro de Resumos da XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006.
- PARIZI, L. F.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.; DA SILVA VAZ, I. & MASUDA, A. Produção e Caracterização Imunológica da Calreticulina Recombinante do Carrapato *Haemaphysalis longicornis*. In: XVIII Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre- RS. Livro de Resumos do XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2006.
- PARIZI, L. F.; IMAMURA, S.; ONUMA, M.; DA SILVA VAZ, I. & MASUDA, A. Clonagem e expressão da calreticulina do carrapato *Haemaphysalis longicornis*. In: XVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. Porto Alegre- RS. Livro de Resumos do XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2005.

6. PROCESSOS OU TÉCNICAS

- PARIZI, Luís Fernando; MASUDA, Aoi; Da Silva Vaz, I. Pedido de Patente para Glutathione-S-transferase ou peptídeos derivados utilizados para o controle do carrapato. 2009.

ANEXO E

Carta do artigo submetido:

Ms. No.: EP-09-373

Title: Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation

Corresponding Author: Dr Itabajara Da Silva Vaz Jr.

Authors: Luís Fernando Parizi, master; Kiyoko U Utiumi, master; Saiki Imamura, PhD; Misao Onuma, PhD; Kazuhiko Ohashi, PhD; Aoi Masuda, PhD;