

ANA PAULA PECONICK

**EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO VACINAL SBm7462[®]
ANTI-CARRAPATO *Rhipicephalus microplus* EM
PLANTAS TRANSGÊNICAS (*Arabidopsis thaliana*)**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

P369e
2010

Peconick, Ana Paula, 1980-
Expressão de peptídeo vacina SBm7462® anti-carrapato
Rhipicephalus microplus em plantas transgênicas
(*Arabidopsis thaliana*) / Ana Paula Peconick. – Viçosa, MG,
2010.
xiii, 80f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 63-80

1. Proteínas recombinantes. 2. Vacinas. 3. Carrapato -
Controle. 4. Imunologia veterinária. 5. Parasitologia
veterinária. 6. Plantas transgênicas. 7. *Rhipicephalus
microplus*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.65

ANA PAULA PECONICK

EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO VACINAL SBm7462® ANTI-CARRAPATO *Rhipicephalus microplus* EM PLANTAS TRANSGÊNICAS (*Arabidopsis thaliana*)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2010.

Prof. Gervásio Henrique Bechara

Profa. Flávia Maria Lopes Passos

Prof. Ricardo Wagner Dias Portela

Prof. Leandro Licursi de Oliveira

Prof. Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo
(Orientador)

“O que é impossível nas mãos dos outros
torna-se sucesso nas mãos de Deus.”

(Cônego José Geraldo Vidigal de Carvalho)

Ao vovô Zé (José Andrade Peconick)

AGRADECIMENTOS

Primeiro e sempre a Deus, que ilumina meus caminhos, abençoando minha vida.

Aos meus super pais, Marco Antônio e Rosane, e minha querida irmã Fabiana que são simplesmente maravilhosos.

À Universidade Federal de Viçosa, minha segunda casa, que nos fornece a oportunidade de estudar (*Ediscere*), saber (*Scire*), agir (*Agere*) e vencer (*Vincere*). Destaques ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO).

Aos professores Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo e Marlene Isabel Vargas Vilória, que sempre foram mais do que meus orientadores, tornaram-se meus padrinhos, e junto com toda sua família sempre foram grandes amigos, nos momentos de conquistas e nos mais difíceis.

Aos Professores Wagner Campos Otoni e Elizabeth Pacheco Batista Fontes, que além de suas orientações, abriram as portas de seus laboratórios para o progresso deste experimento. Em especial, a Anésia Aparecida dos Santos por todos os materiais, ensinamentos e amizade.

A professora Claudine Márcia Carvalho pela disponibilidade das análises no microscópio confocal, também a Cláudia e a Carla do Núcleo de Microscopia e Microanálise/UFV.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel e a Jamile do laboratório de Genômica/BIOAGRO/UFV pela atenção e sequenciamentos das amostras.

A professora Renata Maria Strozi Alves Meira e seus estudantes pelo auxílio e instalações do Laboratório de Anatomia Vegetal/UFV.

Às estudantes de iniciação científica, Letícia e Mariana, muito eficientes e minhas amigas confidentes.

Aos amigos Karlos, Sthephany, Gabriel Carvalho, Anna Paula, Bianca, Rodrigo, Janaína, Gabriel Tafur, Isabela, Cíntia, Leandro, Vitor e meu padrinho Fabrício, que além de muita ajuda foram motivos para grandes sorrisos.

A todos os professores e colegas que cruzaram meu caminho que sempre dividiram seus conhecimentos e, muitos, amizade.

Ao Márcio e Sidimar pelos auxílios e sugestões.

A Rosi, secretária da Pós-Graduação do Departamento de Veterinária, pela dedicação e carinho em todos os momentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade com o apoio financeiro.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo convênio que disponibilizou recursos para a realização do presente experimento e apoio financeiro nos eventos científicos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro das bolsas de iniciação científica.

A toda minha família, muito amorosa, pela torcida e orações, em especial ao meu avô Mazilio e vovó Helena. E a minha vó Bioca (*in memorian*), sempre em meus pensamentos. E ao meu vô Zé (*in memorian*) que sempre acreditou no meu sucesso e nos deixou recentemente.

A minha nova família “Neves dos Reis” tão acolhedora, especialmente ao Augusto e Enrico fontes de muita alegria.

Ao melhor marido do mundo, Jairo, meu porto seguro para os momentos delicados e trampolim para a realização dos meus sonhos. E ao “nosso bebê”, Brutinhos, meu grande companheiro.

Enfim, a todos que me ajudaram para a conclusão desse trabalho e que sempre foram tão amáveis. Muito obrigada...

BIOGRAFIA

ANA PAULA PECONICK, filha de Marco Antônio Peconick e Rosane Lopes Peconick, nasceu aos 3 dias do mês de setembro, do ano de 1980, na cidade de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais.

Concluiu o ensino fundamental (1º grau) em 1995 e o ensino médio (2º grau) em 1998 no Colégio Arnaldo, em Belo Horizonte – MG.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG em Março de 2000, finalizando em janeiro de 2005. Iniciou-se na pesquisa pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), convênio CNPq/UFV com o projeto “Controle do carrapato *Boophilus microplus* pela vacina sintética SBm7462. I – Polimorfismo populacional do parasito” de Agosto de 2002 a Julho de 2004 no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/BIOAGRO/UFV sob a orientação do prof. Joaquin H. Patarroyo. No segundo semestre de 2004 realizou estágio supervisionado no Laboratório de Bioquímica e Imunologia/ Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Viçosa (UFMG).

Em março de 2005 ingressou no Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa, como bolsista da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo Departamento de Medicina Veterinária, sob a orientação do professor Joaquin H. Patarroyo. Concluiu o mestrado em dezembro de 2006 com a dissertação “Conservação de seqüências nucleotídicas do gene *bm86* e das seqüências peptídicas 4822 e 4823, constituintes da vacina sintética SBm7462”. Em seguida, iniciou o doutorado no mesmo Programa.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	4
2.2 Medidas de controle <i>R. microplus</i>	7
2.3 Vacinas.....	9
2.4 Vacinas anti <i>R. microplus</i>	11
2.5 A vacina sintética SBm7462®.....	13
2.6 Plantas Transgênicas.....	16
2.7 Plantas utilizadas para expressar e produzir subunidades vacinais.....	19
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Local de realização e regulamentação do experimento.....	24
4.2 Análise do gene.....	25
4.3 Produção de células ultra competentes <i>Escherichia coli</i> DH5 alfa.....	26
4.4 Subclonagem do vetor PSC-A e transformação em <i>E. coli</i> DH5 alfa.....	27
4.5 Crescimento bacteriano em meio líquido, extração do DNA plasmidial, estoque e sequenciamento dos clones.....	29
4.6 Construções de DNA.....	31
4.7 Produção de células competentes de <i>Agrobacterium</i>	35
4.8 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> linhagem GV3101.....	36
4.9 Obtenção e cultivo de material vegetal.....	36
4.10 Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> e seleção de transformantes independentes.....	37
4.11 Análise molecular das plantas transgênicas.....	38
4.11.1 Extração do DNA genômico das plantas.....	38
4.11.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	39
4.12 Expressão do transgene por RT-PCR.....	39
4.12.1 Extração do RNA total de <i>A. thaliana</i> transformadas.....	39
4.12.2 Análise da expressão das plantas transgênicas por RT-PCR....	40

4.13 SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	41
4.14 Pesquisa de antígeno rBm7462 em folhas de <i>A. thaliana</i> através da técnica de Peroxidase-anti-Peroxidase – PAP.....	43
4.15 Microscopia confocal e processamento de imagens.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Análise dos genes.....	45
5.2 Construções de DNA.....	47
5.3 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
5.4 Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> e seleção de transformantes independentes.....	51
5.5 Transcrição e expressão da rBm7462 em <i>A. thaliana</i> transgênicas.....	55
6. CONCLUSÃO.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Desenho da vacina sintética SBm7462®.....	14
Figura 2 - Desenho do gene <i>seq2</i>	26
Figura 3 - Mapa físico do vetor pSC-A.....	27
Figura 4 - Mapa físico do vetor pDONR201.....	32
Figura 5 - Mapa físico do vetor pk7WG2.....	33
Figura 6 - Mapa físico do vetor pk7FWG2.....	33
Figura 7 - Códon de <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
Figura 8 - Primeira PCR de recombinação.....	48
Figura 9 - Segunda PCR de recombinação.....	49
Figura 10 - PCR de colônia de <i>A. tumefaciens</i> para Seq2.....	51
Figura 11 - Plântulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
Figura 12 - <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
Figura 13 - Sequência <i>seq2</i>	55
Figura 14 - Resultado do RT-PCR.....	56
Figura 15 - Resultado do SDS-PAGE.....	57
Figura 16 - Imunohistoquímica (PAP) de <i>A. thaliana</i>	59
Figura 17 - Expressão do rBm7462.....	60

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Potenciais vantagens do uso de vacinas orais produzidas em plantas.....	20
Tabela 2 – Oligonucleotídeos específicos para clonagem e diagnóstico.....	35

RESUMO

PECONICK, Ana Paula, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Expressão do peptídeo vacinal SBm7462[®] anti-carrapato *Rhipicephalus microplus* em plantas transgênicas (*Arabidopsis thaliana*).** Orientador: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo. Co-orientadores: Wagner Campos Otoni e Marlene Isabel Vilória Vargas.

A demanda por vacinas parasitárias em saúde animal é crescente. Os prejuízos causados pela infestação de carrapatos e as doenças transmitidas pelos mesmos estão na ordem de bilhões de dólares, sendo o carrapato *Rhipicephalus microplus* o parasito de maior impacto econômico na pecuária do Brasil e dos países com clima tropical e subtropical. Pesquisas de ponta, aplicando ferramentas de biotecnologia, são usadas em alguns ou em todos os estágios no desenvolvimento de vacinas. A produção de proteínas heterólogas é uma promissora alternativa para a fabricação de vacinas. Os vegetais representam um dos sistemas mais econômicos para a produção em larga escala de proteínas para uso industrial e farmacêutico, o que significa utilizar as plantas como biofábricas. O objetivo do presente trabalho é produzir antígenos vacinais homólogos do peptídeo sintético SBm7462[®] contra o carrapato *R. microplus*, em plantas (*Arabidopsis thaliana*) transformadas com gene sintético. O gene denominado *seq2*, que possui a seqüência da SBm7462[®] repetida três vezes em tandem foi inserido em vetores de doação (pDONR201) e, em seguida, em vetores de expressão binário para plantas (pk7WG2 e o pk7FWG2), utilizando-se o sistema Gateway[®]. Pela seleção em meio com antibiótico e reação em cadeia de polimerase (PCR), selecionaram-se as plantas transformadas positivamente, a presença do transgene nessas foi confirmado por sequenciamento genético. As plantas transgênicas com melhor

desenvolvimento apresentaram o gene *seq2* integrado ao seu genoma. Para avaliar a expressão do peptídeo recombinante foram realizadas as técnicas de RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*), imunohistoquímica e análise em microscópio confocal. As proteínas recombinantes denominadas rBm7462 foram expressas no apoplasto das células epidérmicas das folhas transgênicas. As plantas com os maiores níveis de expressão foram selecionadas para, nas próximas gerações, imunizar camundongos BALB/c. Esse é o primeiro estudo da produção de subunidades vacinais em plantas transgênicas contra um ectoparasito.

ABSTRACT

PECONICK, Ana Paula, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2010. **Expression of the peptide vaccine SBm7462[®] anti-tick *Rhipicephalus microplus* in transgenic plants (*Arabidopsis thaliana*).** Adviser: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo. Co-advisors: Wagner Campos Otoni and Marlene Isabel Vilória Vargas.

The demand for parasitic vaccines in animal health is growing. The damage due to infestation of ticks and diseases transmitted by them are in the billions of dollars, and the tick *Rhipicephalus microplus* parasite of the greater economic impact on livestock in Brazil and in countries with tropical and subtropical climates. Advanced research projects, applying tools of biotechnology are used in some or all stages in the development of vaccines. The production of heterologous proteins is a promising alternative for the manufacture of vaccines. The plants represent one of the most economical for large-scale production of proteins for industrial and pharmaceutical, which means using plants as biofactories. The objective of this work is to produce vaccine antigens homologous synthetic peptide SBm7462[®] against the tick *R. microplus* in plants (*Arabidopsis thaliana*) transformed with synthetic gene. The gene *seq2*, which has the sequence SBm7462[®] repeated three times in tandem was inserted into donor vector (pDONR201) and then in binary expression vectors for plants (pk7WG2 and pk7FWG2), using the Gateway[®] system. By selection in medium with antibiotics and polymerase chain reaction (PCR) were selected as positively transformed plants, the presence of these transgene was confirmed by genetic sequencing. Transgenic plants with improved development presented *seq2* gene integrated in its genome. To evaluate the expression of the recombinant peptide were carried out RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), immunohistochemistry and confocal

microscope analysis. The recombinant proteins were expressed rBm7462 the apoplast of epidermal cells of transgenic leaves. Plants with the highest levels of expression were selected for new generations, to immunize BALB/c. This is the first study of the production of subunit vaccine in transgenic plants against an ectoparasite.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo. Muitos fatores agem diretamente na atividade econômica relacionada à pecuária de leite e de corte, dentre eles o controle de ectoparasitos e as doenças transmitidas pelos mesmos.

Os prejuízos causados pela infestação de carrapatos e as doenças transmitidas, segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*), ultrapassam sete bilhões de dólares anuais no mundo, acometendo mais de 75% da população mundial de bovinos (Godoi e Silva, 2009). Somente no Brasil, que possui um rebanho com aproximadamente 200 milhões de cabeças, estudos apontaram prejuízos superiores a dois bilhões de dólares anuais (Grisi *et al.*, 2002; Tavares, 2006).

O controle de carrapatos repousa principalmente na utilização de drogas carrapaticidas que são responsáveis pela seleção de populações resistentes (Sangster, 2001; Taylor, 2001). Outro problema com o uso de acaricidas é a contaminação residual na carne, leite, derivados e no meio ambiente. Tudo isso aponta para a necessidade de pesquisas de métodos alternativos, seguros e eficientes de controle, atuando de modo integrado (Willadsen, 2006). Entre as alternativas, encontram-se os métodos imunoproliféricos.

A demanda por vacinas, para o controle de parasitos, em saúde animal é crescente, e empresas remetem para lucros acima de três bilhões de dólares

só nesse setor (Dalton e Mulcahy, 2001). A utilização de vacinas parece ser em curto prazo, a opção mais viável e duradoura para controlar os carrapatos. A grande vantagem do uso de vacinas é a menor possibilidade da aquisição de resistência por parte do parasito.

A vacina sintética SBm7462[®] foi desenvolvida a partir de uma proteína intestinal do carrapato *R. microplus* com determinantes imunogênicos comprovadamente conservados entre as mais dispersas populações desse carrapato (Peconick *et al.*, 2008) e com uma eficácia vacinal satisfatória (Patarroyo *et al.*, 2002; Patarroyo *et al.*, 2009).

A produção de proteínas heterólogas é uma alternativa promissora para a produção de vacinas, inclusive com custos de produção mais acessíveis. Os vegetais representam um dos sistemas mais econômicos para a produção em larga escala de proteínas para uso industrial e farmacêutico (Cançado, 2002; Ma *et al.*, 2005; Mei *et al.*, 2006), o que significa utilizar as plantas como biofábricas. As células vegetais são biorreatores ideais para a produção de vacinas e outros biofármacos, com a possibilidade de eliminar a necessidade de alguns processamentos caros, como fermentação, purificação, frigoríficos, transporte e entrega estéril (Daniell *et al.*, 2009).

Este segmento que representa a terceira geração de vegetais geneticamente modificados (VGMs), movimentando um mercado de bilhões de dólares. Estima-se que até o final do presente ano, a exploração desse promissor segmento, poderá representar 35% do mercado de biofármacos e gerar benefícios de até 20 bilhões de dólares. Muitas empresas e universidades já se dedicam a pesquisas nesta área, inclusive com pedidos de patentes solicitados (Minaré, 2006; Shin e Doran, 2009; Alderborn *et al.*, 2010).

Muitas são as propostas em todo o mundo para regulamentar e estimular a produção de vegetais geneticamente modificados para os mais diversos fins (WHO, 2006; Alderborn *et al.*, 2010; Davison, 2010). A Lei de Biossegurança, Lei 11.105/05 permite ao Brasil avançar nesse segmento de pesquisa. No nosso país há esforços imediato, intenso e integrado do Governo, Indústria e Academia, de que o Brasil configurará, em poucos anos, entre os países líderes na indústria de biotecnologia, com destaque nas áreas de saúde humana, agropecuária e biotecnologia industrial (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2006). O desenvolvimento de

novas e melhores vacinas não possui apenas conotações de natureza científica e tecnológica, mas um aumento de poder político, econômico e social (Francis, 2001).

Este estudo objetiva utilizar uma tecnologia alternativa de produção de subunidades vacinais anti-carrapato *R. microplus*. Produzindo *Arabidopsis thaliana* transgênicas com gene sintético, desenhado em nosso laboratório, que codifica o peptídeo SBm7462[®], e avaliar a expressão do mesmo nas plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O carrapato *Rhipicephalus microplus*

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1887) representa o principal ectoparasito de bovinos nas regiões tropicais e subtropicais, entre as 869 espécies conhecidas de carrapatos no mundo. Ao longo dos séculos, *R. microplus*, com origem Asiática, se difundiu pelas regiões neo-tropicais juntamente com as migrações de pessoas e suas criações de animais. Importantes divergências genéticas e de adaptações de uma mesma espécie distribuída entre diferentes continentes envolvem uma “plasticidade ecológica” das populações de carrapatos, onde mudanças globais afetam os parasitos e a forma de manejar o controle dos mesmos (Sutherst, 2001; Estrada-Peña *et al.*, 2006). Embora ainda existam divergências sobre a classificação taxonômica desse ectoparasito (Caeiro 2006), estudos utilizando metodologias taxonômicas moleculares demonstraram proximidade filogenética do gênero *Boophilus* com *Rhipicephalus*. Propondo-se uma nova classificação para a espécie, que mudaria de *Boophilus microplus* para *Rhipicephalus microplus* (Murrel *et al.*, 2000; Murrel *et al.*, 2001; Beati e Keirans, 2001). Na descrição deste trabalho, adotar-se-á o citado status taxonômico com base molecular. A

classificação estabelecida por Nuñez *et al.* (1982) com as atualizações propostas seguiria a seguinte ordem:

Reino: Animalia
Filo: Arthropoda
Classe: Arachnida
Ordem: Acari
Subordem: Metastigmata
Família: Ixodidae
Subfamília: Rhipicephalinae
Gênero: *Rhipicephalus*
Espécie: *Rhipicephalus microplus*

Na América Latina, *R. microplus* encontra-se amplamente distribuído pelo Brasil, norte da Argentina, Paraguai, Uruguai, leste da Bolívia, Colômbia e Venezuela. No Brasil, destacam-se as regiões Centro-Oeste e Sudeste, locais com intensa atividade pecuária, que possuem além do hospedeiro, condições ideais de temperatura e umidade para o parasito (Estrada-Peña, 1999; Estrada-Peña *et al.*, 2006).

Aliado a sua extensa distribuição geográfica, os severos prejuízos causados por *R. microplus* à pecuária nacional são de ordem direta e indireta. Os primeiros remetem para animais com perda de peso, baixa conversão alimentar, perdas na qualidade do couro, toxinas liberadas no hospedeiro, lesão da pele, entre outros. Jonsson (2006) calculou que cada fêmea ingurgitada é responsável por uma redução de aproximadamente 1,37g de peso dos bovinos. O mesmo autor ainda relata anemia, supressão do apetite e alteração no metabolismo como conseqüências da perda de produção devido à infestação de *R. microplus*.

Os prejuízos de causa indireta estão relacionados com a transmissão de hematozoários, como *Babesia bovis* e *B. bigemina*, além de participação na epidemiologia do *Anaplasma marginale* (Patarroyo, 1994; Santos *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 2005; Oliveira-Siqueira *et al.*, 2005). Estudos demonstram que os carrapatos provocam efeitos imunossupressores no hospedeiro, o que pode

facilitar a transmissão ou a gravidade de babesioses e anaplasmoses (Kashino *et al.*, 2005; Jonsson, 2006).

A saliva do carrapato contém componentes que garantem o sucesso da alimentação, com funções que afetam o sistema imunológico, o hemostático e vias inflamatórias do hospedeiro (Turni *et al.*, 2004). Em relação à modulação que os carrapatos podem provocar no sistema imune de seu hospedeiro, relatou-se polarização para resposta Th2, com supressão da produção de interleucinas 1 e 2 (IL-1 e IL-2) e do interferon gama (IFN- γ). Supressão de linfócitos T e queda nos níveis de IgG também foram verificados; além da ativação de quinases que reduzem a dor e de histaminas que minimizam o processo inflamatório (Willadsen e Jongejan, 1999; Wikel e Alarcon-Chaidez, 2001; Kashino *et al.*, 2005).

O ciclo do carrapato *R. microplus* é dividido em fase de vida livre e fase de vida parasitária. A primeira fase inicia-se após a queda de teleógina ingurgitada com o período de pré-postura, ovopostura, eclosão dos ovos, neolarvas e larvas infestantes. A fase de vida parasitária começa quando a larva instala-se no hospedeiro, transformando-se em metalarva, ninfa, metaninfa. A partir desse momento já ocorre diferenciação entre os sexos, no caso do macho de metaninfa se transforma em neandro e gonandro. No caso de fêmea de metaninfa para neógina, partenógena e teleógina. O início da queda das teleóginas ocorre em média entre o 22º e 23º dias. Apenas um hospedeiro é parasitado, ou seja, trata-se de um carrapato do tipo monoxênico. A dinâmica e viabilidade da fase de vida livre são fortemente influenciadas pelo micro clima ao redor do carrapato, principalmente as condições de umidade e temperatura (Gonzales, 1974; Corson *et al.*, 2004; Sutherst e Bourne, 2006). Apesar de ser conhecido como carrapato de bovinos, o *R. microplus* pode utilizar outras espécies como hospedeiros acidentais, como ovelha, veado, cavalo, coelho, cães, cabras e o próprio homem (Gonzales, 1974; Prata *et al.*, 1999).

O processo reprodutivo e a digestão do sangue, segundo Da Silva Vaz-Jr, *et al.* (2004), estão entre as funções preponderantes no *R. microplus*.

Nunes *et al.* (2005) mostraram processos apoptóticos nas glândulas salivares das fêmeas completando o processo de ingurgitamento. A teleógina

morre após realizar postura de 2000 a 4000 ovos no meio ambiente (Pereira, 1982).

As fêmeas da espécie de *R. microplus* podem ingerir de sangue 100 vezes mais a massa do próprio corpo. Mecanismos que protegem o carrapato de moléculas nocivas do hospedeiro permitem que essa espécie seja bem adaptada a uma alimentação hematófaga. Sua estrutura histológica intestinal é constituída por uma membrana basal coberta de fibras musculares longitudinais e circulares (Hernández *et al.*, 1997). As células digestivas intestinais promovem a endocitose de componentes do sangue e grandes quantidades de heme são armazenadas no hemossomo, a heme é liberada durante a digestão da hemoglobina e está envolvida em catalises nas reações de redox. A heme possui sua toxicidade inibida por uma lipoproteína de ligação da heme (*heme-binding lipoprotein* – HeLp), podendo dessa forma, ser reutilizada pelo carrapato (Maya-Monteiro *et al.*, 2004; Lara *et al.*, 2005; Graça-Souza *et al.*, 2006). A principal proteína do ovo dos carrapatos, a vitelina, é um reservatório de nutrientes e heme para o desenvolvimento do embrião, isso sugere que a ligação de heme com a vitelina representa um importante mecanismo anti-oxidante, protegendo o embrião (Logullo *et al.*, 2002). Muitas outras moléculas essenciais para o processo digestivo do *R. microplus* já foram estudadas, bem como suas glândulas salivares (Nunes *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2006; Ciprandi *et al.*, 2006), sendo que algumas apresentam potencial de serem usadas na biomedicina, como o peptídeo antimicrobiano *Ixodidin* (Fogaça *et al.*, 2005).

2.2 Medidas de controle do carrapato *R. microplus*

O controle de carrapatos está centrado, atualmente, no uso de pesticidas das mais variadas bases químicas. O alvo desses compostos químicos, em geral, é o sistema nervoso do ectoparasito. Recentes pesquisas propõem o uso de ectoparasiticidas tendo como objetivo afetar os mecanismos reguladores do crescimento, neuropeptídeos e o sistema neuroendócrino (Taylor, 2001).

O uso indiscriminado de acaricidas, e muitas vezes sem critérios técnicos, levou a uma pressão de seleção culminando na aquisição de resistência (processo irreversível) por parte dos parasitos aos mais diversos grupos químicos. Resistência a acaricidas é o maior obstáculo à produção pecuária. A definição de resistência, segundo Sangster (2001), é a habilidade de um parasito sobreviver a doses de droga que normalmente mataria espécies iguais e no mesmo estágio de desenvolvimento, sendo que esse é um processo relacionado com fatores genéticos, biológicos e operacionais. Existem vários tipos de mecanismos de resistência para cada classe de acaricida. Mutação no local alvo do acaricida representa o principal mecanismo de resistência observado, mas há exemplos de mecanismos metabólicos (Baxter e Barker, 1998; Foil *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos comparam a biologia reprodutiva entre linhas de carrapatos resistentes e susceptíveis a acaricidas. O padrão geral dos resultados revela um comportamento biológico semelhante ou com pequena significância biológica tendendo para menores índices reprodutivos para as cepas resistentes. Esses índices referem-se ao peso, número e viabilidade dos ovos (Glória *et al.*, 1993; Davey *et al.*, 2006).

Em todo o mundo existem várias linhas de pesquisas de métodos alternativos de controle do carrapato *R. microplus*. Medidas alternativas de controle são propostas como modo de minimizar os obstáculos derivados do uso de parasiticidas químicos, que além da resistência, trazem problemas de resíduos para os produtos de origem animal e para o meio ambiente.

Diversas medidas de controle biológico vêm sendo avaliadas como possíveis ferramentas de combate ao *R. microplus*. Dentre elas, destaca-se a utilização de pastagens ou o uso rotacional das mesmas que dificultam o acesso de larvas ou que liberem agentes voláteis (Labruna e Veríssimo, 2001; Fernandez-Ruvalcaba *et al.*, 2004). Outra medida que tem sido abordada é o banho dos animais com extratos fitoterápicos que inibem o acesso das larvas (Heimerdinger *et al.*, 2006; Broglio-Micheletti *et al.*, 2009). Por outro lado o emprego de entomoparasitas é outra técnica sob avaliação. Entre os entomoparasitas pode-se destacar a mosca *Megaselia scalaris* que reduz o número de ovos das teleóginas (Andreotti *et al.*, 2002). Nematóides entomopatogênicos são promissores agentes biológicos no controle de

diversas espécies de carrapatos, entre elas *R. microplus*, destruindo a hemocele dessas espécies (Samish e Glazer, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2004). Fungos entomopatogênicos, com ação similar ao exposto anteriormente, de diferentes gêneros estão apresentando resultados satisfatórios como pesticidas (Bittencourt *et al.*, 2003; Polar *et al.*, 2005a; Polar *et al.*, 2005b; Bahiense *et al.*, 2006), entre outras medidas.

O melhoramento animal na seleção de raças mais resistentes ao carrapato ainda é um processo polêmico. Há controvérsia sobre estimativas de valores de herdabilidade e questiona-se a correlação da característica de resistência aos carrapatos com a produtividade do animal (Jonsson *et al.*, 2000a; Frisch *et al.*, 2000). O que se sabe é que bovinos com maior grau de sangue zebuino (*Bos indicus*) possuem maior resistência à parasitas, e mesmo dentro desse grupo há diferenças de raças, os animais Nelore, por exemplo, são mais resistentes de que os Gir ou Guzerá (Veríssimo *et al.*, 2004; Jonsson, 2006).

Pesquisas e avanços científicos na área de imunologia, como a compreensão cada vez maior sobre biologia de parasitas, uso de modernas ferramentas como a biologia molecular e alta escala de produção permitem que vacinas antiparasitárias sejam uma grande possibilidade (Dalton e Mulcahy, 2001). O desenvolvimento de vacinas contra carrapatos representa uma promissora alternativa de controle.

A associação de medidas representa maior garantia de bons resultados no controle do carrapato (Sangster, 2001). O uso de vacinas com banhos estratégicos de acaricidas é um bom exemplo desse controle integrado que remete para bons índices para o produtor rural (Willadsen, 2006).

2.3 Vacinas

A definição clássica de vacinas (cujo nome advém de *vaccinia*, o agente infeccioso da varíola bovina), segundo Abbas *et al.* (2003), é de que essas são substâncias, como proteínas, toxinas, partes de bactérias, vírus ou outro agente patogênico, ou mesmo organismos inteiros, atenuados ou mortos, preparações de antígenos, muitas vezes combinadas com adjuvantes, que ao

serem introduzidas no organismo vivo, suscitam uma reação do sistema imunológico, uma imunidade protetora, semelhante à que ocorreria no caso de uma infecção por um determinado agente patogênico, desencadeando a produção de anticorpos e ativação de células específicas que acabam por tornar o organismo imune ou, ao menos mais resistente, a esse agente (e às doenças por ele provocadas). Mas o mecanismo de ação das vacinas demanda conceitos mais sofisticados e, por isso, o estudo de imunologia é tão complexo.

O processo de vacinação deve ser ponderado quanto aos seus riscos e benefícios (Glickman, 1999). Propõe-se que a solução para essa controvérsia encontra-se em estudos que respondam questões sobre segurança, identificação de bases biológicas evitando reações adversas, tecnologia para sua produção e custo-benefício. O desenvolvimento de novos métodos para compreender e manipular o sistema imune, controlar enfermidades infecciosas e parasitárias é o objetivo constante de diversos grupos de pesquisa distribuídos por todo o mundo.

Antes de tudo vacinação representa uma medida preventiva. As vantagens que oferece esse processo sobre os convencionais métodos de controle químicos, segundo Willadsen (1997), são várias: muitas vezes representam uma ação sustentável; são livres de resíduos; são mais específicas e com menores problemas de resistência quando comparadas aos fármacos; são mais seguras. A utilização e produção de vacinas, em muitos casos, representam as únicas medidas médicas de intervenção e freqüentemente oferecem maior custo-benefício do que as terapias (Francis, 2001).

A maioria das vacinas licenciadas usadas em medicina veterinária são produzida por métodos convencionais que utilizam os princípios iniciados por Jenner e Pasteur há 200 e 100 anos atrás. São várias as vantagens e desvantagens das vacinas convencionais. Todavia, estudos com engenharia genética aplicada na produção de vacinas vêm capitalizando vantagens e minimizando desvantagens. A biotecnologia encontra-se presente na produção de muitas vacinas (Babiuk, 2002).

O desenvolvimento de vacinas e seu licenciamento requerem muitas etapas e decisões feitas por especialistas que interagem em seus estudos. A questão central está no controle da qualidade de seu desenvolvimento, de sua

produção, armazenamento e uso. É um contínuo processo que envolve desde avanços tecnológicos ao marketing comercial, passando pela identificação e boa caracterização de antígenos protetores; determinação do processo de uma viável produção comercial do antígeno; a formulação desses antígenos mais adjuvantes como uma vacina capaz de fornecer uma resposta imunológica apropriada e sustentável; a validação do protótipo no campo (Nalin, 2002).

2.4 Vacinas anti *R. microplus*

Há mais de 70 anos que imunidade contra infestações de carrapatos é induzida por vacinação com uma variedade de materiais antigênicos, incluindo macerados de todo o carrapato, extratos das glândulas salivares, material intestinal, cutículas, entre outros (Willadsen, 2004).

Dois tipos antigênicos distintos são muito discutidos. O primeiro refere-se aos antígenos “expostos”, que são secretados junto com a saliva do carrapato durante a alimentação. Antígenos ocultos, representando o segundo grupo, normalmente não entram em contato direto com o sistema imune do hospedeiro, entre esses estão as proteínas derivadas do intestino ou dos ovos do carrapato, por exemplo. Relata-se ainda um terceiro grupo intermediário, com propriedade de ambos (Trimnell *et al.*, 2002; Nuttall *et al.*, 2006). Os melhores resultados no processo de vacinação contra carrapatos ocorrem normalmente quando o antígeno não está exposto durante a alimentação do parasito, com os denominados antígenos ocultos ou *concealed antigens* (Oliveira, 1998).

A identificação de antígenos protetores para bovinos contra o *R. microplus* é crescente visto o impacto econômico e as dificuldades, já mencionadas, no controle desse parasita. São pesquisados antígenos larvais; antígenos das glândulas salivares (64TRP); precursores de enzimas proteolíticas; proteínas intestinais (Bm91, Bm86, BMA7); a vitelina e outras glicoproteínas dos ovos dos carrapatos (BYC); a calreticulina, entre outras (Willadsen *et al.*, 1996; Andreotti *et al.*, 2002; De La Fuente e Kocan, 2003; Singh e Ghosh, 2003; Da Silva Vaz Jr. *et al.*, 2004; Trimnell *et al.*, 2002; Pruett *et al.*, 2006; Leal *et al.*, 2006a e 2006b).

Willadsen *et al.* (1989) isolaram uma glicoproteína, de 89.000 Da de peso molecular e ponto isoelétrico entre 5,1 a 5,6, da membrana intestinal de uma amostra de *R. microplus* australiana (Yeerongpilly) e denominaram essa proteína de Bm86, estando presente em larvas, ninfas e adultos. Esse antígeno foi identificado através de séries de fracionamento e provas de vacinação. Oliveira (1998) determinou que a Bm86 se localiza, mais precisamente, nas microvilosidades da membrana das células epiteliais do intestino, sendo altamente concentrada próximo à membrana basal. É uma molécula de 650 aminoácidos com potenciais sítios de glicosilação. O gene *bm86* possui 2225 nucleotídeos. Especula-se que sua função esteja relacionada com a endocitose.

Em 1994, na Austrália, foi liberada a primeira vacina comercial contra *R. microplus*, utilizando clonagem do gene *bm86* em *Escherichia coli* e produção da proteína recobinante Bm86 (rBm 86), recebendo o nome de TickGARD® (Hoeschst Animal Health, Austrália) e subsequentemente denominada TickGARD Plus® (Smith *et al.*, 1995; Willadsen, 1997). Com as bases do mesmo antígeno foi formulada em Cuba a vacina Gavac® (Heber Biotec AS, Havana, Cuba) e Gavac Plus®, porém essa rBm 86 foi produzida em *Pichia pastoris* (García-García *et al.*, 1998).

A eficácia destas vacinas tem variado entre 50 e 91%. Esses valores são avaliados pela redução da viabilidade e do número de ovos, consequentemente diminuindo o número de carrapatos nas gerações subseqüentes, tendo todos os estágios de desenvolvimento comprometidos (Rodriguez *et al.*, 1994; Jonsson *et al.*, 2000b). Alterações histológicas do trato digestivo de *R. microplus* pela ação de anticorpos anti-rBm86 também já foram avaliados por Hernández *et al.* (1997), que observaram as destruições de células digestivas, secretoras e basofílicas, além de erosão e ruptura da parede intestinal e extravasamento do conteúdo digestivo para a cavidade celomática.

Vacinas contendo a Bm86 atuam por meio da indução da produção de anticorpos anti-Bm86, com o possível envolvimento do complemento e outros mecanismos efetores (García-García *et al.*, 1998; Willadsen, 2004).

Algumas amostras de *R. microplus*, entretanto, mostraram-se menos susceptíveis a vacina recombinante Bm86 (rBm86). O gene *bm95* foi isolado de uma população de carrapatos argentinos (cepa A), em seguida clonado,

expresso na levedura *P. pastoris* e utilizado como outra vacina recombinante, controlando a população que era resistente a rBm86 (García-García *et al.*, 2000). A proteína Bm95, com função homóloga a Bm86, possui 2225 nucleotídeos que codificam 569 aminoácidos.

O isolamento geográfico de cepas de *R. microplus* pode levar a essas diferenças genéticas e fisiológicas, remetendo a uma resposta negativa ao controle pela vacinação (García-García *et al.*, 1999). Existindo, portanto, a constante busca por um imunógeno ou a combinação de antígenos que cubram o maior número possível de populações, protegendo o rebanho das infestações por *R. microplus*.

2.5 A vacina sintética SBm7462[®]

O uso de peptídeos sintéticos representa uma promissora ferramenta na produção de vacinas. Vantagens significativas no uso desses peptídeos são citadas por Neurath e Kent (1986), tais como alto grau de pureza, ausência de contaminantes, estabilidade (uma vez que não se observam enzimas proteolíticas originárias de material biológico), completa caracterização química e reprodutibilidade. Patarroyo *et al.* (1994) citam também a ausência de mecanismos supressores, alérgicos ou autoimunes, e mecanismos de evasão típicos de microorganismos.

A primeira vacina sintética contra o *R. microplus*, foi denominada de 4912, que apresentou resultados pouco satisfatórios (Oliveira, 1998). Com o avançar das pesquisas a SBm7462[®] foi desenvolvida por Patarroyo *et al.* (2002), apresentando bons resultados e já representa um produto patentado. A partir das análises de estudos por predição computacional, determinantes imunogênicos da SBm 7462[®] foram definidos a partir da seqüência da Bm 86. O imunógeno possui seqüências que foram desenhadas (figura 1) no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/Bioagro/Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, e sintetizadas no Instituto de Inmunologia Del Hospital San Juan de Dios, em Bogotá, Colômbia. Esses peptídeos foram catalogados pelo livro de seqüências como 4822 (aa. 398-411), 4824 (aa. 132-145) e 4823

(aa. 21-35), o peptídeo SBm7462[®] possui essas seqüências nesta ordem e com duas cisteínas no C- e N- terminais. A partir de estudos controlados *in vivo* verificou-se que o imunógeno tem uma eficácia vacinal (81,05%) no que tange à redução do número de carrapatos, menor postura e menor taxa de sobrevivência das larvas (Patarroyo *et al.*, 2002). Esses dados refletem melhores resultados do que à maioria dos testes com rBm86 em iguais condições.

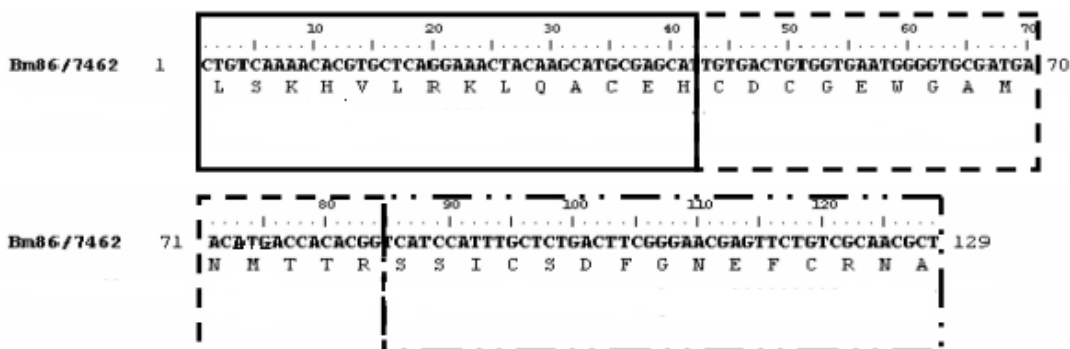


Figura 1: Desenho da vacina sintética SBm7462[®]. O peptídeo 4822 está representado pelo retângulo com linhas cheias, o 4824 com linhas tracejadas e o 4823 com linhas interrompidas.

Após alinhamento entre as proteínas Bm86 e Bm95 foi observado que apenas duas mudanças dentro das seqüências que constituem o SBm7462[®]. Estudos de variabilidade genética analisando 20 amostras de distintos locais e condições geográficas de regiões brasileiras e outros países sul-americanos demonstraram que a seqüência SBm7462[®] manteve-se conservada entre todas as populações (Sossai *et al.*, 2005; Peconick *et al.*, 2008), concluindo que não há variabilidade nessas seqüências que possam interferir na eficiência vacinal. Isso reforçou o conceito de antígeno ou imunógeno universal e justificam plenamente a escolha por introduzir genes sintéticos que codifiquem o peptídeo SBm7462[®], utilizando organismos geneticamente modificados.

Testes a campo da vacina, com sobrecarga de estresse, corroboram os estudos controlados. Nestes também se observou aumento do título de anticorpos específicos e redução do número de teleóginas, do peso médio da ovoposição, da relação larvas/peso dos ovos e redução da fertilidade dos ovos,

alcançando uma eficiência final de 53,29% para o grupo vacinado com 2,0 mg do peptídeo SBm7462[®] (Couto Pimentel, 2002).

Estudos demonstraram a eficiência do peptídeo sintético SBm7462[®] na construção de uma resposta imune antígeno-específico que envolve mecanismos humorais, com predominância estatisticamente diferente do isótipo IgG₁ sobre o isótipo IgG₂, e celulares, a vacina estimula uma resposta imune T-dependente (Patarroyo et al., 2009).

Outras pesquisas testaram um modelo de liberação lenta em microesferas biodegradáveis PLGA (poliésteres derivados dos ácidos lático e glicólico) e avaliaram a resposta imune de bovinos vacinados. Os resultados revelaram que a saponina potencializa melhor resposta imune do peptídeo SBm7462[®], tendo sido também esta resposta mais precoce e que, as microesferas PLGA mostram-se viáveis a serem utilizadas como sistema de liberação para este peptídeo (Sales-Junior et al, 2005).

Uma vacina só terá aceitabilidade no mercado se o preço for módico. A vacina sintética SBm7462[®], que combate *R. microplus* foi patenteada no Brasil, Estados Unidos da América, México, Austrália e na União Européia. Porém, existem no mundo apenas cinco centros especializados na síntese química de peptídeos em escala industrial. Esse empecilho oneraria a produção e envio de grandes quantidades de peptídeo em curtos espaços de tempo, que certamente acarretariam em problemas de distribuição dessa vacina entre os inúmeros potenciais mercados consumidores. Portanto, formas alternativas de produzir essa vacina estão sendo avaliadas.

O desenho e síntese de uma sequência nucleotídica baseada na SBm7462[®] foi utilizado no *design* de uma vacina de DNA por Medeiros et al. (2008).

Sossai (2009) apresentou resultados que sugerem o uso de genes sintéticos, derivados do imunógeno SBm7462[®], como uma alternativa viável para a produção de peptídeos recombinantes em *P. pastoris*; Quatro peptídeos recombinantes induziram a produção do isotipo IgG₁ em valores que corroboram com os valores obtidos com o uso do peptídeo sintético SBm7462[®].

2.6 Plantas Transgênicas

Muitos anos antes do homem entender e conceituar biologia, ele já “praticava biotecnologia” na produção de vinhos e pães. Muitos passos foram dados desde então até chegarmos ao melhoramento genético biotecnológico. Em 1973, Hebert Boyer e Stanley Cohen iniciaram a era da engenharia genética realizando a primeira bem sucedida transformação genética, construindo um gene com DNA bacteriano e DNA de *Xenopus laevis* (Borém, 2004a).

Os valores gastos na área de biotecnologia agrícola, incluindo pesquisas de vegetais utilizados para a produção de subunidades vacinais, entre os anos de 2003 e 2004, ficaram na ordem de 44 bilhões de dólares entre os cinco maiores países investidores (Estados Unidos da América, Argentina, China, Canadá e Brasil), segundo Runge e Ryan (2004). A engenharia genética é uma ferramenta importantíssima para aumentar a vantagem comparativa dos países em desenvolvimento (Arraes, 2004).

Quando uma proteína é produzida em um organismo diferente daquele de sua origem, denominamos essa de proteína heteróloga, seja essa produzida por um sistema procariótico ou eucariótico. No primeiro caso, destaca-se o sistema que utiliza a bactéria *Escherichia coli*, que possui o maior rendimento na produção de proteínas recombinantes; Aqui, entretanto, há alguma limitação na expressão de genes eucarióticos. Já os sistemas eucarióticos, composto por leveduras, culturas de células de mamífero e de insetos, animais transgênicos e plantas, permitem modificação e processamento de proteínas (Cançado, 2002).

O baixo custo para o estabelecimento de plantações e o fato de já ter estabelecido todas as práticas que envolvem esse cultivo, processamento do material, a possibilidade de compartimentalização das proteínas recombinantes em diferentes organelas, a presença de órgãos naturais de acúmulo de proteínas, e a eliminação de necessidade de purificação do produto de interesse quando esse tecido é administrado via *per os* são apontados como vantagens de se utilizar o sistema vegetal como uma “fábrica verde” (Kusnadi *et al.*, 1997).

Algumas dificuldades que podem surgir em alguns casos, como níveis de produção de proteína recombinante irregulares e baixos, mas não desanimam os investigadores, que prosseguem com “afinações” (Jamal *et al*, 2009; Sharma e Sharma, 2009). As plantas parecem ser os únicos sistemas capazes de uma produção eficaz de certas proteínas humanas, tais como reguladores do crescimento e inibidores do ciclo celular (Lima 2001).

A primeira planta transgênica foi produzida em 1983 por Fraley e colaboradores logo após a descoberta da habilidade de *Agrobacterium* transferir DNA plasmidial (Santi *et al.*, 2006).

Lajolo e Nutti (2003) definem plantas transgênicas como aquelas que tiveram introduzido entre seus genes um novo gene ou fragmentos de DNA (denominado transgene), pelo processo de DNA recombinante ou engenharia genética. As plantas transgênicas também podem ser denominadas de organismo geneticamente modificado ou OGM. Resumidamente, descrevem cinco principais etapas envolvidas nesse processo: (1) localização ou síntese do gene correspondente a uma característica almejada; (2) obtenção e clonagem desse gene; (3) a “engenharia” do gene; (4) a transformação da célula do organismo receptor; (5) a seleção, regeneração da planta e fixação da característica desejada.

Uma vez localizado, isolado e clonado, o gene de interesse deve passar por algumas modificações antes de ser inserido num vegetal. Uma seqüência promotora, que controle o local e o momento de vida da planta em que o gene se expressará, deve ser acrescentada para que a característica desejada se manifeste corretamente. Uma seqüência terminadora avisa ao mecanismo celular que o final da seqüência do gene foi atingido. Um gene marcador pode ser acrescentado para identificar células ou tecidos da planta que tenham integrado com êxito o transgene (Borzani *et al.* 2001).

O promotor constitutivo CaMV 35S, por exemplo, é amplamente usado para expressar genes em vegetais, principalmente dicotiledôneas, e foi clonado a partir dos genes ribossomais 35S do vírus do Mosaico da Couve-flor (Borém e Vieira, 2005; Yang *et al*, 2007).

Os principais métodos científicos para se realizar a transformação genética, ou seja, a introdução controlada de ácidos nucléicos em um genoma receptor (excluindo-se a introdução por fecundação) podem ser divididos em

indiretos e diretos. Os primeiros utilizam-se de vetores, como *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes*. Numerosas espécies vegetais foram transformadas utilizando-se o sistema *Agrobacterium*, que se divide ainda em sistema co-integrado (baseado em recombinação simples e formação do plasmídeo co-integrado) e sistema binário (uso de vetor binário compatível com a replicação do plasmídeo Ti residente desarmado e com o gene a ser introduzido na planta). Contudo, esses sistemas não incluem a maioria das monocotiledôneas e gimnospermas, além da diferença de susceptibilidade em algumas dicotiledôneas. Devido a essa limitação métodos diretos físicos e químicos de transferência de genes foram criados; são exemplos os usos de polietilenoglicol, eletroporação, aceleração de partículas, lipossomos, micro e macroinjeção, laser, entre outros (Torres *et al.*, 1999; Borém *et al.*, 2004b; Marillonet *et al.*, 2005).

A avaliação das plantas transgênicas deve ser feita verificando a incorporação do transgene sem causar danos às outras funções do vegetal, à qualidade do produto, ou ao ecossistema ao qual vai se integrar. Para isso, Lopes e Araia (2006) recomendam cultivos e testes, observando a atividade do gene inserido, se a herança é estável, efeitos não previstos no crescimento, no rendimento e na qualidade da planta. A tolerância das plantas frente a manipulações de engenharia genética também deve ser verificada (Umezawa *et al.*, 2006).

Na década de 1990, ocorreu a primeira geração de transgênicos que afetavam diretamente no rendimento de cultivos, com plantas resistentes aos herbicidas e às pragas. Os transgênicos de segunda geração condicionam características qualitativas aos produtos agrícolas, promovendo vegetais com valor nutricional diferenciado, por exemplo. A terceira geração é capaz de oferecer produtos de efeito medicinal direto, como vacinas e anticorpos verdadeiras biofábricas (Arraes, 2004; Zanella e Siveira, 2008).

A biossegurança é preocupação em todo o mundo, sugestões e leis organizam e estimulam as atividades que envolvem organismos geneticamente modificados e seus derivados. Os riscos da fase de produção e entrega da presente tecnologia são controláveis através de regulamentação adequada (Kirk *et al.*, 2005). São estabelecidas normas de segurança, mecanismos de fiscalização e incentivos nas mais variadas plataformas (Ministério do

Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2006; WHO, 2006; Alderborn *et al.*, 2010; Davison, 2010). No Brasil, a lei número 11.105/2005 regulamenta a Política Nacional de Biossegurança (PNB), cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, e reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio.

2.7 Plantas utilizadas para expressar e produzir subunidades vacinais

Avanços na biologia molecular e maior entendimento de biotecnologia de plantas levam à produção de vacinas, anticorpos e outros compostos terapêuticos para uso humano e veterinário, com menores custos e mais eficientes que em métodos convencionais (Sharma e Sharma, 2009). A primeira utilização deste conceito foi em 1989 por Hiatt *et al.*, com a produção de anticorpos em plantas transgênicas. Anos depois, Mason *et al.* (1992) descreveram a expressão do antígeno de superfície da hepatite B em batatas transgênicas.

O conceito e o uso de subunidades vacinais ou epítomos apresenta excelentes resultados na imunização de seres humanos e animais, e a produção desses em plantas oferece grandes vantagens, dentre essas a administração via oral pelo alimento (Aziz *et al.*, 2002). Antígenos expressos em vegetais e frutas abrem um novo caminho para o desenvolvimento de vacinas via oral (Chargelegue *et al.*, 2001 e Streatfield *et al.*, 2003). Estudos relatam até maior imunogenicidade quando o material é administrado diretamente na planta como alimento para o animal, do que quando purificando seu extrato, o que sugere que alguns componentes da planta podem agir como adjuvante (Khandelwal *et al.*, 2003; Modelska *et al.*, 1998). Outros sugerem que a expressão de antígenos em plantas pode funcionar como uma “bio-encapsulação”, onde os antígenos são protegidos da degradação no sistema digestivo até a parede celular ser degradada próxima a Placa de Peyer, local de iniciação da imunidade de mucosa (Kong *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2006b). Produtos com atividade de adjuvante também já estão sendo produzidos em plantas (Kim *et al.*, 2007).

Vacinação oral é segura e facilmente administrada, já existindo proteção desde a superfície da mucosa. Estima-se uma redução de custos de até 90% no uso de proteínas recombinantes produzidas em plantas e administradas via oral (Daniell *et al.*, 2001). Potenciais vantagens relacionadas à redução desse custo de produção são apresentados na tabela 1. Vacinações com plantas transgênicas demonstraram a habilidade de induzir tanto resposta imune sistêmica quanto de mucosa (Walmsley e Arntzen, 2003). Resposta imune humoral e celular foram detectadas em diversos trabalhos com imunização oral via plantas transgênicas em hospedeiros experimentais (Chen *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). A imunização de bovinos, animais com sofisticado sistema digestivo, alimentados com plantas transgênicas resultou na construção resposta imune humoral e celular (Khandelwal *et al.*, 2003).

Tabela 1: Potenciais vantagens do uso de vacinas orais produzidas em plantas*

Menor custo de produzir material não purificado
Rápida escala de alta produção
Múltiplas vacinas podem ser produzidas juntas
Maior facilidade de armazenar o material
Redução da necessidade de transporte frio
Elimina custos de seringas e agulhas

* Modificado de Streatfield e Howard, 2003.

Streatfield (2005a) mostrou que o custo médio de uma dose de vacina parenteral contra a hepatite B, por exemplo, é de US\$ 0,25; em seguida, o pesquisador estimou que o custo para a produção de vacinas orais contra a mesma enfermidade, porém produzida em plantas, seria de aproximadamente US\$ 0,10 a dose.

A expressão de antígenos em plantas geneticamente modificadas abre um novo caminho para a produção de vacinas. A agricultura molecular (*molecular farming*) consiste na produção dessas plantas, onde através de engenharia genética são introduzidos genes que expressam determinadas proteínas de interesse biomédico ou industrial, como anticorpos, vacinas, biofármacos, enzimas e polímeros, visando a expressão de substâncias que a planta não expressava anteriormente ou que expressava em quantidade muito pequena (Minaré, 2006; Golds *et al.*, 2004).

São vários os trabalhos publicados relatando plantas transgênicas desenvolvidas para expressar antígenos protetores. São quase duas décadas com mais de 100 publicações com o tema “candidato a vacina” expressas em plantas, onde pelo menos 30 são produzidos em vegetais comestíveis (Streatfield e Howard, 2003; Mei *et al.*, 2006; Rice *et al.*, 2005; Daniell *et al.*, 2009). Já foi relatada a expressão de antígenos protetores, por exemplo, em *Nicotiana tabacum* contra hepatite B, anthrax, contra parvovírus, contra o vírus da raiva (Aziz *et al.*, 2002; Molina *et al.*, 2005; Ashraf *et al.*, 2005); em cenoura contra sarampo (Bouche *et al.*, 2003); em soja contra hepatite B (Sojikul *et al.*, 2003); em milho contra enterotoxinas causadas por *E. coli* (Streatfield *et al.*, 2003); em batata contra o vírus de Newcastle (Berinstein *et al.*, 2005); em alfafa contra a *Fasciola hepática*, rotavírus, vírus da febre aftosa, reovírus, e enterotoxinas de *E. coli* (Legockl *et al.*, 2005; Dong *et al.* 2005; Dus Santos, *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006a; Joensuu *et al.*, 2006).

São diversos os produtos terapêuticos, produzidos em plantas utilizadas como reatores que já estão disponíveis no mercado (Sharma e Sharma, 2009). Alguns estão nas primeiras fases de triagens clínicas em humanos (Streatfield 2005b; Daniell *et al.*, 2009). Destacam-se dois produtos que estão em vias de concluir seu licenciamento, o primeiro de fragmentos de anticorpo (porção Fc) produzido no tabaco, em Cuba (Pujol *et al.*, 2005); e o segundo que representará a primeira vacina licenciada produzida em plantas transgênicas, relatado por Rybicki (2009), contra Newcastle encontra-se no âmbito de aprovação pela USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América).

O primeiro relato de uma vacina constituída por peptídeos produzida em plantas transgênicas que induziu uma resposta imunológica protetora quando usada em hospedeiros experimentais, refere-se a epítomos protetores contra a aftosa (Dus Santos *et al.*, 2005). Peptídeos multimerizados produzidos em plantas transgênicas podem ser estáveis e ainda manter seus níveis de antigenicidade e imunogenicidade (Gil *et al.*, 2007).

Vacina protetora expressa em plantas transgênicas contra uma infecção parasitária foi descrita pela primeira vez por Hernández *et al.* (2007), com a produção de peptídeos sintéticos contra cisticercose em mamão. Antígenos

contra *Plasmodium* também já foram produzidos em tabaco com avaliação da resposta imune (Wang *et al.*, 2008).

Nos estudos com transgênicos, tabaco e *Arabidopsis* são consideradas plantas modelos; arroz, trigo e milho são os principais cereais utilizados; ervilha, soja e alfafa são as culturas que mais se destacam; tomate e banana são as frutas mais cultivadas; batata fecha essa lista (Schillberg *et al.*, 2005; Mei *et al.*, 2006).

Arabidopsis thaliana é uma pequena planta com flores, comestível, que é mundialmente usada como organismo modelo no estudo com vegetais (Chandler *et al.*, 2008). Não possui maior importância agrônômica, mas oferece importantes vantagens para pesquisas de base com genética e biologia molecular (Hays, 2002). Inclusive com o objetivo de se produzir subunidades vacinais (Greco *et al.*, 2007).

O genoma da *Arabidopsis* consiste de cinco cromossomos, com 125 milhões de pares de bases, o seu genoma é relativamente pequeno, se comparado com o das outras espécies vegetais, o que facilita o seu estudo (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Rigano *et al.* (2006) apresentaram o primeiro relato do perfil imunogênico Th1 em animais imunizados via oral contra a tuberculose, produzidos em *A. thaliana*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produzir de maneira alternativa um antígeno vacinal homólogo ao peptídeo sintético SBm7462[®] contra o carrapato *R. microplus*, em plantas *A. thaliana* transformadas com gene sintético e avaliar a expressão do mesmo.

3.2 Objetivos específicos

1. Fazer construções genéticas em vetor binário de expressão em plantas com o gene *seq2*;
2. Gerar plantas transgênicas de *A. thaliana* contendo o gene *seq2* e grupo de plantas-controle, sem o gene de interesse, via *Agrobacterium*;
3. Expressar os peptídeos recombinantes anti-*R.microplus* em plantas transgênicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização e regulamentação do experimento

A manipulação de genes e transformação de plantas foi realizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada A Agropecuária - BIOAGRO - da Universidade Federal de Viçosa (UFV), nos Laboratórios de Transformação de Plantas e Culturas de Tecidos II, sob a responsabilidade do Prof. Wagner Campo Otoni e no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, sob a responsabilidade da Profa. Elizabeth Pacheco Batista Fontes. O cultivo das plantas foi feito na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), setor do departamento de Biologia Vegetal, também sob a orientação da professora Profa. Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Estes laboratórios estão autorizados para trabalharem na linha proposta e possuem o denominado Certificado de Qualidade em Biosegurança (CQB) concedido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio); o CQB vigente é de número 0024/97.

Os cortes das plantas a fresco para observação em microscópio de imunofluorescência foram feitos no laboratório de Anatomia Vegetal, também do departamento de Biologia Vegetal. O processamento histológico de *A. thaliana* para realização de imuno-histoquímica foi feito no Laboratório de Histopatologia Veterinária, do departamento de Medicina Veterinária. As

análises do material vegetal em microscópio confocal foram realizadas pela professora Claudine Márcia Carvalho, do departamento de Fitopatologia, no Núcleo de Microscopia e Microanálise. Todas as estruturas e instalações citadas estão localizadas na Universidade Federal de Viçosa.

O sequenciamento genético das amostras foi feito no laboratório de Genômica e as demais análises moleculares e bioquímicas das plantas foram feitas no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV), ambos localizados também no BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa.

O protocolo que autoriza esse experimento segundo as normas do CTNBio é 01200002610/94-04.

4.2 Análise do gene

No LBCHV foram desenhados genes com as seqüências homólogas ao imunogêno SBm7462[®], para a expressão de proteínas heterólogas produzidas em diferentes sistemas. O gene utilizado no presente experimento, denominado *seq2*, é constituído da seqüência nucleotídica da SBm7462[®] ordenados repetidamente três vezes (a.a. 5 – 50; 51 – 94; e 95 – 139), com o tamanho de 462 pares de base (figura 2). Esse gene foi desenhado para a expressão intracelular, com a seqüência de Kozak na sua extremidade 5', necessária para promover o início da tradução através do reconhecimento da subunidade maior do ribossomo ao códon iniciador ATG contido nela. O gene apresenta em suas extremidades 5' e 3' sítios de restrição para enzimas específicas. O gene foi desenhado com otimização de códons para *Pichia pastoris*, para a realização de trabalhos anteriores com leveduras (Sossai 2009). Com o intuito de se utilizar o mesmo gene neste estudo, o primeiro passo constituiu em uma análise de códons preferencias para *A. thaliana*, verificando a possibilidade de tradução do gene na planta utilizada. Essa avaliação foi feita através do site <http://www.kazusa.or.jp/codon>, que trabalha com base no banco de dados do NCBI – GenBank. Os genes foram produzidos na Alemanha, pela empresa Entelechon[®].

```

Seq2
Total amino acid number: 141. Total nucleotides: 426 bp
Max ORF: 13-417, 135 AA, MW=15130,3 pI= 6,34

1      GGATCCGCCACCATGGCTTGTCTTAGCAAGCATGTTCTAAGGAAGTTACAAGCTTGCGAA
1      G S A T M A C L S K H V L R K L Q A C E

61     CACTGTGATTGTGGAGAATGGGGAGCTATGAACATGACGACAAGATCATCGATTTGCTCA
21     H C D C G E W G A M N M T T R S S I C S

121    GATTTTCGGTAACGAGTTTTGCAGAAACGCTTGTTTGTCCAAGCATGTCTTGAGGAAGTTG
41     D F G N E F C R N A C L S K H V L R K L

181    CAAGCTTGTGAACACTGTGATTGTGGTGAATGGGGTGCTATGAACATGACAACCAGATCC
61     Q A C E H C D C G E W G A M N M T T R S

241    TCTATATGCTCTGATTTTCGGTAACGAGTTTTGTAGGAACGCATGCCTTTCTAAGCATGTC
81     S I C S D F G N E F C R N A C L S K H V

301    CTTAGAAAGCTTCAAGCATGTGAGCATTGTGACTGTGGAGAATGGGGTGCAATGAACATG
101    L R K L Q A C E H C D C G E W G A M N M

361    ACTACTAGATCCAGTATCTGTTCCGATTTTCGGAAACGAATTTTGTAGAAACGCTTGTTAA
121    T T R S S I C S D F G N E F C R N A C *

421    GAATTC
141    E F

```

Figura 2: Desenho do gene *seq2*. Em negrito destaca-se a sequência de Kozak e M a metionida do códon iniciador ATG.

4.3 Produção de células ultra competentes *Escherichia coli* DH5 alfa

As células hospedeiras de *Escherichia coli* linhagem DH5 α utilizadas para clonagem nesse trabalho e transformação por choque térmico foram feitas de acordo com INOUE *et al.* (1990).

A linhagem de *E. coli* DH5 α foi ativada em placa contendo meio LB (Luria Bertani) sólido (10 g de Triptona; 10 g de NaCl; 5 g de Extrato de Levedura; 1,5% de agar e água deionizada q.s.p. 1000 mL) sem antibiótico. Cinco colônias foram inoculadas em 150 mL de meio SOB (3g de Triptona; 0,75g de extrato de levedura; 0,075 g de NaCl; 1,5 mL de KCl 0,25 M; 0,75 mL de MgSO₄ 2 M; 150 μ l de NaOH 5 M; e água destilada em quantidade suficiente para 150 mL) em Erlenmeyer de 500 mL. As colônias foram

cultivadas a 18°C sob agitação 150 rpm até atingir uma OD600 de aproximadamente 0,6.

Após atingir a OD desejada, a cultura foi transferida para dois tubos de polipropileno de 50 mL, mantida no gelo por 10 minutos e centrifugada a 2.000 x g por 20 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante os *pellets* foram suspendidos gentilmente em 15 mL de TB gelado [(10 mM de Pipes; 15 mM de CaCl₂ e 250 mM de KCl pH 6.7) mais 55 mM de MnCl₂] e incubados no gelo por 10 minutos. Posteriormente, juntando os dois volumes em um único tubo, nova centrifugação a 1000 x g por 10 minutos foi realizada e o *pellet* ressuspendido em 8 mL de TB gelado enriquecido com 7% de DMSO e incubado no gelo por mais 10 minutos. As células foram aliqüotadas em volume de 200 µL, congeladas em nitrogênio líquido e armazenada a -70°C.

A eficiência da transformação das *E. coli* DH5α foi calculada por meio da transformação por choque térmico com o plasmídeo puC18. Para realização desse cálculo, 0,2 ng do vetor pUC18 foi utilizado para transformar 200 µl de células competentes em 800 µl de meio SOC (2g de Triptona; 0,5 g de extrato de levedura; 0,05 g de NaCl; 1 mL de KCl 0.25 M; 0,5 mL de MgSO₄ 2 M; 10 µl de NaOH 5 M; 2 mL de glicose 1M; completar para 100mL com água deionizada). Assim a concentração final do vetor é de 0,0002 ng/µL.

Após incubação por 16 horas em estufa à 37°C, a placa foi dividida em quatro quadrantes onde se contou o número de colônias de um quadrante, multiplicando o valor encontrado por quatro, obtendo-se a quantidade final de colônias. O cálculo da eficiência foi realizado pela divisão do número total de colônias (UFC) pela concentração do clone plaqueado obtendo-se uma eficiência de 6×10^6 UFC/ng do vetor.

4.4 Subclonagem do vetor PSC-A e transformação em *E. coli* DH5 alfa

O gene veio da Alemanha liofilizado na quantidade de 10 µg de plasmídeo/gene, inseridos no vetor plasmidial pSC-A (figura 3). O vetor com o gene *seq2* (PSC-A-*seq2*) possui 3,5kb de tamanho e foi clonado em células ultra-competentes de *E. coli*, linhagem DH5α.

O vetor PSC-A-*seq2* foi suspenso em água deionizada livre de DNase, na concentração final de 200 ng/μL. Foram utilizados 200 ng de plasmídeo para transformar *E. coli* DH5α por choque térmico.

Para a reação de transformação, retiraram-se os tubos com as células competentes do freezer -70°C e as mesmas foram descongeladas em banho de gelo. Cada tubo recebeu 200ng de plasmídeo (aproximadamente 5 μL), foi homogeneizado lentamente e mantido no gelo por trinta minutos. Em seguida, as células foram submetidas a choque térmico, primeiro colocadas a 42°C por 90 segundos e, em seguida, a 4°C por 2 minutos. Adicionou-se 800 μL de meio SOC e permaneceu por 1 hora a 37°C, por 180 rpm em agitador.

Placas de Petri com meio LB sólido com 100 μg/mL de ampicilina foram semeadas com 100 μl de células transformadas. As placas foram fechadas, vedadas com filme plástico, invertidas e mantidas em estufa, a 37°C durante 17 horas.

As colônias portadoras do fragmento de interesse foram identificadas pela técnica de PCR de colônias. O teste de PCR de colônia foi constituído por 1X de PCR buffer 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl); 2,0 mM de MgCl₂; 0,3 mM de dNTPs; 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase e 0,4 μM dos primers M13 *forward* (5' GGTGTAACGACGGCCAGT 3') e M13 *reverse* (5' – CAGGAAACAGCTATGACC - 3') e água deionizada autoclavada para completar um volume final de 25 μl. As reações foram submetidas a 94°C por 10 minutos, para rompimento das células e desnaturação inicial do molde; 35 ciclos sucessivos a 94°C por 30 segundos; 55°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Em gel de agarose 1% (p/v), em TBE 1X (Tris Base 0,089M, Ácido Bórico 0,089 M e EDTA 0,05 M, pH 8,0), e corado com brometo de etídeo 0,1 μg. mL⁻¹, selecionaram-se as colônias segundo o seu tamanho teórico de 721pb, somando-se a seqüência amplificada do vetor PSC-A (259pb) e o tamanho dos genes *seq2* (426pb).

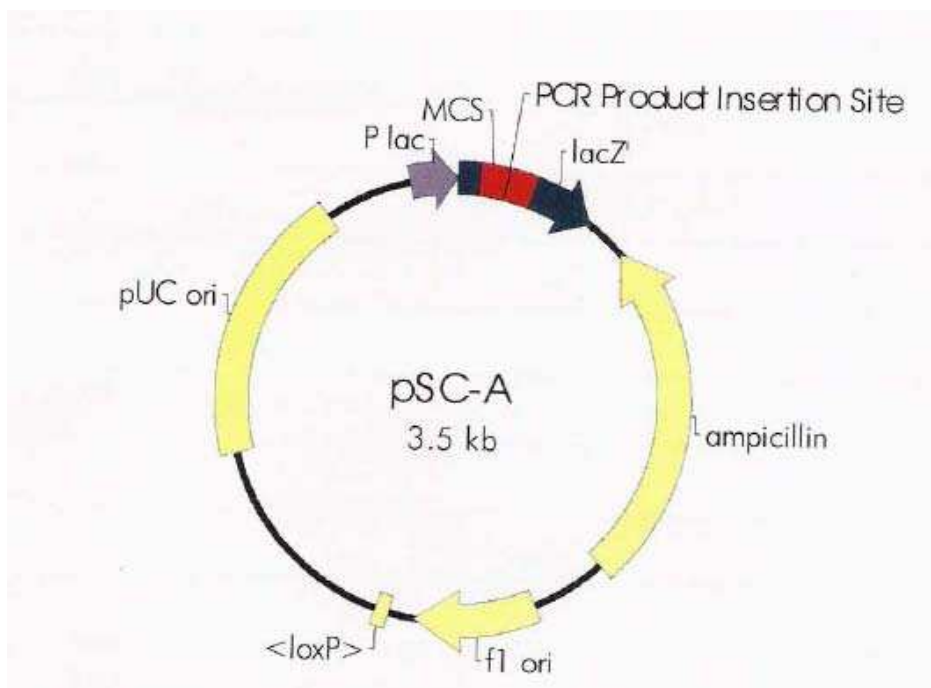


Figura 3: Mapa físico do vetor pSC-A. O gene *seq 2* sintetizado pela empresa Entelechon[®] veio inserido no vetor pSC-A. Observa-se que esse vetor possui o gene de resistência ao antibiótico ampicilina.

4.5 Crescimento bacteriano em meio líquido, extração do DNA plasmidial, estoque e sequenciamento dos clones

As colônias positivas cresceram em meio LB líquido (10 g de Triptona; 10 g de NaCl; 5 g de Extrato de Levedura e água deionizada q.s.p 1000 mL) com 100 µg/mL de ampicilina. As colônias positivas foram transferidas para tubos devidamente identificados. Em seguida colocadas no agitador com rotação de 180 rpm, a 37°C por 13 horas, em média.

O Kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega[®]) foi utilizado na extração do DNA plasmidial. Realizou-se a extração de dois clones independentes para cada amostra, visando descartar possíveis erros.

Os tubos com culturas de *E. coli* DH5α transformadas foram centrifugados a 10.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante resultante foi descartado. Adicionou-se 250 µL de solução de suspensão celular e o precipitado foi dissolvido delicadamente até alcançar completa homogeneização da solução. Esse conteúdo foi transferido para tubo de

polipropileno de 1,8 mL e acrescidos de 250 µL da solução de lise celular. Inverteram-se os tubos, delicadamente, por quatro vezes e incubou-se até clarear a suspensão (por no máximo cinco minutos).

Cada tubo recebeu, em seguida, 10 µL de solução de Protease Alcalina, homogeneizando-se por quatro inversões suaves e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos. Após adição de 350 µL da solução de neutralização por tubo e nova inversão de quatro tempos, finalizou com centrifugação a 14.000 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente.

O sobrenadante com o DNA foi transferido para mini-colunas associadas a tubos coletores. Centrifugou-se por 1 minuto a 14000 x g. Descartou-se o produto dos tubos coletores e lavaram-se as mini-colunas com 750 µL da solução de lavagem. Após nova centrifugação por mais um minuto, repetiu-se o último passo com 250 µL da solução de lavagem e mais 2 minutos de centrifugação.

Os DNAs foram suspensos em 50 µL de água livre de nuclease, em tubos novos e centrifugados por 1 minuto a 14000 x g.

As amostras foram quantificadas por meio de espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose. As mesmas foram estocadas em caixas crioprotetoras a -20°C até o sequenciamento.

As amostras foram sequenciadas no sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) pelo método enzimático descrito por SANGER *et al.* (1977). Utilizou-se o *Dyemonic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* e instruções do mesmo, como referência no preparo das amostras.

Os clones de *E. coli* DH5α contendo o fragmento de interesse foram estocados em alíquotas com 25% de glicerol ultra puro (Invitrogen USA). Após homogeneização, foram congelados em nitrogênio líquido e transferidos para o freezer – 70°C.

4.6 Construções de DNA

A tecnologia Gateway[®] é um sistema universal de clonagem, baseado em propriedades de locais específicos de recombinações do bacteriófago lambda (Landy, 1989).

Trabalhou-se com um vetor de entrada, denominado pDONR201 (Invitrogen USA), e dois vetores binários de expressão, os vetores pk7WG2 e o pk7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002), cujos respectivos mapas físicos estão representados pelas figuras 4, 5 e 6. Esses vetores de expressão foram construídos para serem utilizados no sistema Gateway[®] e para a transformação mediada por *Agrobacterium* (Karimi *et al.*, 2002). A diferença básica entre os dois é que o vetor pk7FWG2 possui na sua porção N terminal a fusão com o gene repórter *gfp* (*green fluorescent protein*). O produto de expressão, no caso o peptídeo com a marcação GFP é mais facilmente analisado nas metodologias moleculares de caracterização. E o vetor pk7WG2, que não possui gene repórter, é utilizado para produzir as plantas que imunizarão os animais em trabalhos posteriores, sem interferir com a possível eficiência vacinal. Portanto, os oligonucleotídeos *reverse* desenhados o gene *seq2* são diferentes, pois para uso do pk7FWG2 é necessário um códon de parada, para o pk7FWG2 não (tabela 2).

Para o isolamento do gene *seq2* foram desenhados oligonucleotídeos específicos para amplificação da região codificadora. A sequência de *seq2* foi primeiramente amplificada com oligonucleotídeos contendo uma sequência *attB* parcial na extremidade 5' (tabela 2), para em seguida serem novamente amplificadas com extensões de recombinação compatíveis com o sistema de clonagem Gateway (Invitrogen USA). Essas PCRs foram constituídas por 1X de PCR buffer 10X (100 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl); 2,0 mM de MgCl₂; 0,3 mM de dNTPs; 1 U de Platinum *Taq* DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen USA) e 0,4 μM dos iniciadores de acordo com a tabela 2 e água deionizada autoclavada para completar o volume final de 25 μL.

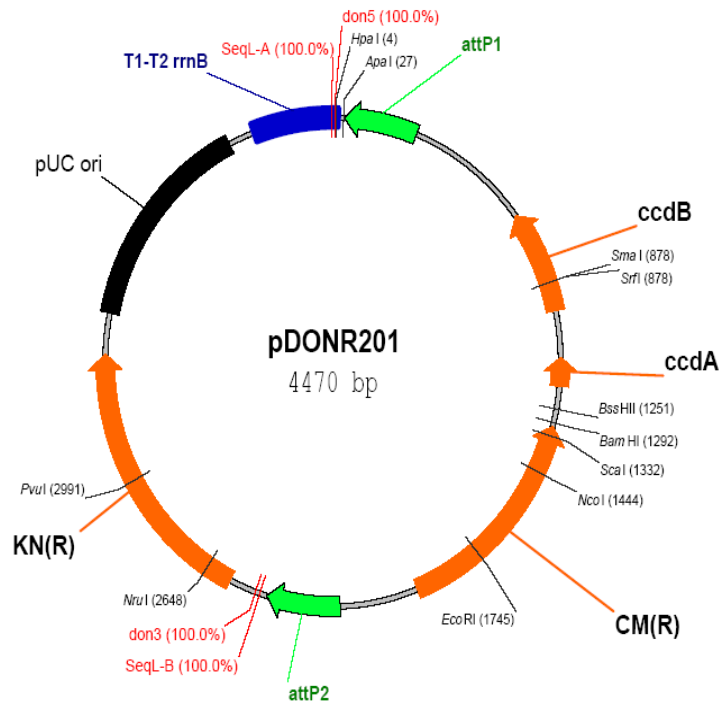


Figura 4: Mapa físico do vetor pDONR201 (Invitrogen USA). A anotação pDONR indica ser vetor de doação. Seu tamanho é de 4470pb e é resistente a Kanamicina.

As reações foram submetidas a 94°C por 1 minuto, para desnaturação inicial do molde; 25 ciclos sucessivos a 94°C por 30 segundos; 56°C por 60 segundos e 68°C por 60 segundos; e uma extensão final a 68°C por 7 minutos.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% (p/v), purificados e inseridos, por recombinação, no vetor de entrada pDONR201, utilizando a BP clonase (Invitrogen USA). Os clones resultantes pDONR-2st contém códon de terminação e foram usados para transferência dos respectivos cDNAs para o vetor de expressão em plantas pk7WG2. Os clones pDONR-2ns, sem códon de parada, tiveram seus cDNAs usados no vetor pk7WG2, que possui cauda GFP.

Os desenhos dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para os gene *seq2* foi feitos através do software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), e sua síntese pela Invitrogen®, os demais foram fornecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BIOAGRO/UFV).

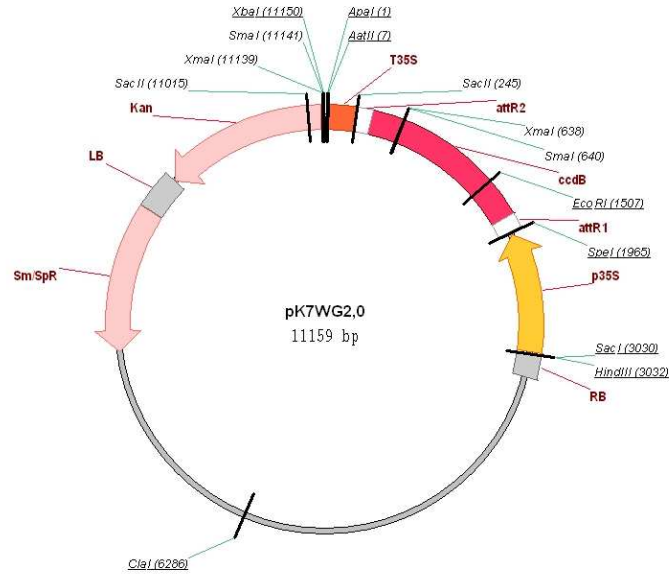


Figura 5: Mapa físico do vetor pK7WG2. Vetor de expressão binário em plantas, usado no sistema Gateway (Invitrogen USA) para transformação mediada por *Agrobacterium*. As letras e números referem-se: p a plasmídeo binário, com alto número de cópias; k refere-se pNOS-KAN^R-tNOS; 7 demonstra a presença do terminador T35S; WG ao cassete de expressão Gateway na orientação attR2, ccdB, CmR, attR1; 2 indica a presença do promotor p35S.

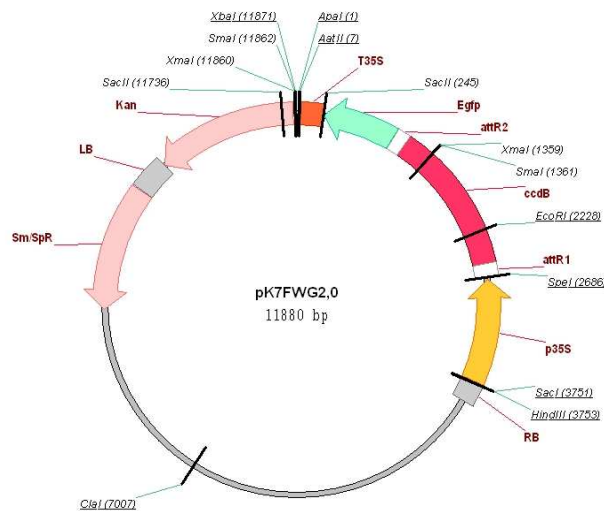


Figura 6: Mapa físico do vetor pK7FWG2. Vetor de expressão binário em plantas, usado no sistema Gateway (Invitrogen USA) para transformação mediada por *Agrobacterium*. As letras e números referem-se: p a plasmídeo binário, com alto número de cópias; k refere-se pNOS-KAN^R-tNOS; 7 demonstra a presença do terminador T35S; F indica cauda GFP; WG ao cassete de expressão Gateway na orientação attR2, ccdB, CmR, attR1; 2 indica a presença do promotor p35S.

A transferência dos referidos genes a partir do vetor de entrada pDONR201 para os vetores pk7WG2 e pk7FWG2, por meio de recombinação mediada por LR Clonase (Invitrogen), deu origem aos clones pk7-seq2 e pk7F-seq2. As construções no pk7FWG2 permitem a expressão de proteínas fusionadas a GFP no amino-terminal em plantas, sob o controle do promotor 35S.

Os clones obtidos foram utilizados na transformação de células ultra competentes de *E. coli* da linhagem DH5 α , pelo método de choque térmico (Inoue *et al.*, 1990) e extração do DNA plasmidial pelo Kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega[®]), ambos já descritos anteriormente (itens 4.4 e 4.5). A seleção de clones ocorreu com antibiótico apropriado e diagnóstico por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos (tabela 2). Utilizou-se 50 μ g/mL de Kanamicina para selecionar os clones em pDONR201 e 100 μ g/mL de espectinomicina para os clones em pk7WG2 e ok7FWG2. Em seguida, realizou-se PCR de colônia conforme descrito no item 4.4. Depois de amplificados, as amostras de DNA foram acrescidas de 12 μ l de corante tipo IV 4X (0,25% bromofenol *blue* e 40% sacarose) e aplicados em gel de agarose de alta resolução 1%, corado com brometo de etídeo, na voltagem de 90 volts em cuba de eletroforese horizontal, tendo TBE (Tris-borato 0,09M e EDTA 0,002M) como tampão de corrida. Com o auxílio de padrão de peso molecular, identificou-se a banda de interesse.

Os cassetes de expressão multiplicados e selecionados em *E. coli* DH5 α também foram confirmados por sequenciamento genético. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para a clonagem e diagnóstico dos clones são listadas na tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos específicos para clonagem e diagnóstico.

Oligonucleotídeos	Seqüência (5' - 3')	Região de anelamento
2/3FwdG	<u>AAAAAGCAGGCTTCACA</u> ATGGCTTGTCTTAGCA	Região de recombinação e das <i>seq2</i> e <i>seq3</i>
2stRvsG	<u>AGAAAGCTGGGTCTCACACAAGCGTTTCTACA</u>	Região de recombinação e da <i>seq2</i>
2nsRvsG	<u>AGAAAGCTGGGTCACAAGCGTTTCTACAAA</u>	Região de recombinação e da <i>seq2</i>
2942 - AttB1Fwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Complemento da região de recombinação
2943 - AttB2 Rvs	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Complemento da região de recombinação
3397 - DONFwd	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATC	pDONR201
3398 - DONRvs	TGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	pDONR201
MC36 (3408) Fwd	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC	Anela no promotor 35S
pK7FGFPRvs (4799) Rvs	CGCCCTCGCCCTCGCCGGACAC	Anela na seqüência do gene GFP

* Nucleotídeos em **negrito** correspondem a *start/stop* códon. Nucleotídeos sublinhados representam *attB* parcial para clonagem no sistema Gateway (Invitrogen USA).

4.7 Produção de células competentes de *Agrobacterium*

Primeiramente foi plaqueada a semente de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem GV3101 em meio Rhizo sólido [extrato de levedura 0,5% (p/v), caseína 0,05% (p/v), manitol 0,8% (p/v), sulfato de amônia 0,2% (p/v), cloreto de sódio 0,5% (p/v), pH 6,6 ajustado com KOH] com 100 µg/mL de espectinomicina e cultivada a 28 °C, de 12 à 16 horas. Uma colônia isolada foi colocada para crescer em 50 mL de meio Rhizo líquido, a 28°C *overnight*, sob agitação constante de 220 rpm. Em seguida as células foram centrifugadas a 5000 x g por 10 minutos, a 4°C. As células foram lavadas 5 vezes em igual volume de água deionizada autoclavada gelada. Por último, as células foram suspensas em 2 mL de GYT (Glicerol 10%, Extrato de levedura 0,125%, Triptona 0,25%). Quarenta µl das células foram armazenadas em microtubos e devidamente identificadas, congeladas com nitrogênio líquido e estocados no -70°C.

4.8 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem GV3101

Células de *A. tumefaciens* linhagem GV3101 foram transformadas por eletroporação, com as construções pk7-seq2 e pk7F-seq2. Para a transformação de 40 µL de células competentes de *Agrobacterium*, foram usadas cerca de 80 µg das construções. As células competentes foram eletroporadas a 2500V durante 4 a 5 milissegundos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio Rhizo às células, para recuperação, e estas foram incubadas por 2 horas, a 28 °C.

Posteriormente, a suspensão celular foi concentrada em 100 µL através de centrifugação por 1 minuto, 14000 x g. Essa suspensão celular concentrada foi plaqueada em meio Rhizo sólido, contendo gentamicina 30 µg/mL e espectinomicina 100 mg/L. As placas foram incubadas a 28°C por 2 dias. As colônias transformadas foram diagnosticadas por PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos específicos 2/3FwdG e 4799 (Rvs) para as construções pk7F-seq2, e MC36 (Fwd) e 2stRvsG para pk7-seq2 (tabela 2). Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v). As amostras positivas para a PCR também foram seqüenciadas.

4.9 Obtenção e cultivo de material vegetal

Plantas *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia (Col 0), foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BIOAGRO/UFV) para o presente estudo. As sementes de *A. thaliana* do tipo selvagem foram semeadas em placas de vidro com meio MS ½ força (adaptado de Murashige e Shoog, 1962) 0,4% (p/v) de fitogel, pH ajustado para 5,8, e, posteriormente, em vasos plásticos contendo terra e substrato de hortaliças (1:1). As sementes de *A. thaliana* transgênicas foram esterilizadas e mantidas em placas contendo meio MS ½ força seletivo com Kanamicina 50 µg/mL. As sementes foram inoculadas a 4°C, no escuro, por três dias e depois expostas à luz branca. Estas sementes foram mantidas a 22°C para desenvolvimento. As plântulas foram transferidas, após um mês, para uma mistura de terra e substrato de

hortaliças na proporção 1:1. Essas foram crescidas e cultivadas em câmara de crescimento a 22°C, sob condições de dia longo (16 horas de luz e 8 horas de escuro).

4.10 Transformação de *Arabidopsis thaliana* e seleção de transformantes independentes

As plantas *A. thaliana* (ecotipo Col 0) foram transformadas com as construções pk7-seq2 e pk7F-seq2. As plantas para serem usadas devem ter atingido estágio de amadurecimento de crescimento de flores. As colônias de *A. tumefaciens* transformadas com estas construções e confirmadas por PCR, foram inoculadas e crescidas em 5 mL de meio LB líquido seletivo, com gentamicina (40 µg/mL) e espectinomicina (100 µg/mL), a 28°C, por 24 horas. Em seguida, as culturas foram transferidas para 200 mL de LB seletivo e incubado por mais 24 horas, a 28°C, até atingir a OD600 de aproximadamente 0,8. Posteriormente a suspensão celular foi centrifugada (8000 x g) e o precipitado suspenso em 250 mL de sacarose 5% (p/v), com Silwett L-77 0,05% (p/v). Esta solução foi utilizada para transformar as plantas *A. thaliana* Col-O pelo método de “mergulho” de escapes florais, veetendo-se o vaso com as plantas por 2 a 3 segundos na solução de sacarose com *Agrobacterium*, com suave agitação (modificado de Clough e Bent, 1998).

As plantas recém transformadas foram mantidas em câmara de crescimento, a 22°C, expostas a luz branca, até a produção de sementes. As sementes transgênicas após incubação foram esterilizadas com uma solução de etanol absoluto 70% (v/v) e Triton X-100 0,05% (v/v), por 5 minutos e adição de etanol absoluto, por 1 minuto e, em seguida, plaqueadas em meio MS ½ força seletivo, contendo Kanamicina 50 µg/mL, para seleção de transformantes independentes. As placas com sementes transgênicas foram incubadas a 4°C, no escuro, por 72 horas, para quebra de dormência, e posteriormente para uma incubadora a 22°C, com luz branca por 16 horas, na qual as plântulas foram mantidas por 1 mês. Após esse período, os transformantes independentes foram transplantados para vasos com terra e substrato (1:1) e mantidos em

câmara de crescimento, a 22°C, com fotoperíodo de 16 horas, para geração de sementes da geração F2 (T1). Estas serão plaqueadas e as plantas cultivadas por três gerações para a seleção, em Kanamicina, de plantas em homozigose.

4.11 Análise molecular das plantas transgênicas

4.11.1 Extração do DNA genômico das plantas

Para a extração do DNA genômico, as plantas de *A. thaliana* transformada e plantas controle negativo (não transformadas) foram maceradas em nitrogênio líquido, em microtubos, com o auxílio de pistilos. Utilizou-se o *Wizard® Genomic DNA Purification kit* (Promega) e seguiram-se as recomendações do fabricante.

Após a maceração de aproximadamente 30mg de extrato vegetal, adicionou-se 600 µL de solução de lise nucléica e incubou a 65 °C por 15 minutos. Para cada amostra foi acrescentado 3 µL de solução de RNase e incubou-se por mais 15 minutos, a 37 °C. Em seguida, cada amostra foi deixada a temperatura ambiente por 5 minutos. Os passos seguintes constituíram da precipitação da proteína e re-hidratação do DNA. Foram adicionados 200 µL de solução de precipitação protéica, centrifugação a 14.000 x g por 3 minutos e transferência do sobrenadante para um novo microtubo com 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente. Depois de misturar suavemente por inversão, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por mais um minuto. Aspirou-se o álcool e adicionou-se solução de re-hidratação do DNA que ficou a 4 °C *overnight*, antes de ser estocado no freezer -20 °C até o momento de uso.

A qualidade e concentração do DNA de cada amostra foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo.

4.11.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A presença do gene *seq2* no genoma de *A. thaliana* foi demonstrada inicialmente por análise de reações em cadeia de polimerase (PCR) do DNA extraído das folhas das plantas, utilizando *primers* 2/3FwdG e 2stRvsG ou 2nsRvsG, desenhados a partir das seqüências adjacentes ao sítio de inserção do gene (tabela 2). Cada reação foi constituída de reação foi 90 ng de DNA, 1X de PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,3 mM dNTPs, 3U de Platinum Taq DNA polymerase (Promega®), 0,4 mM de cada primer e água MilliQ esterilizada completando o volume de 25 µL. A reação foi realizada no termociclador NYX Technik ATC401 segundo o seguinte protocolo: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 56 °C por 45 segundos e 72 °C por 60 segundos, e extensão final mais 72 °C por 7 minutos. Em todas as reações utilizou-se controle negativo da planta não transformada e controle branco (utilizando-se água no lugar de cDNA), verificando-se possíveis erros ou contaminações. Selecionaram-se as amostras positivas por visualização em gel de agarose 1% (p/v).

Para as amostras que amplificaram fragmento com o tamanho da banda desejado, foi realizado o sequenciamento automático (SANGER *et al.*, 1977).

4.12 Expressão do transgene por RT-PCR

4.12.1 Extração do RNA total de *A. thaliana* transformadas

Para a extração do RNA total de *A. thaliana* utilizou-se o SV Total RNA Isolation System (Promega), segundo recomendações de Kobs (1998). Folhas foram maceradas em nitrogênio líquido, em microtubos livres de RNase, e aproximadamente 60 mg de tecido vegetal foram homogeneizados com 175 µL de tampão de lise de RNA. Adicionou-se 350 µL do tampão de diluição de RNA, misturou por inversão e, depois, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g, por 10 minutos. A parte clara da solução lisada, aproximadamente

500 μL , foi transferida para um novo microtubo livre de RNase. Após a adição de 200 μL de etanol 95% (v/v), o material foi transferido para colunas e tubos coletores e centrifugados a 14.000 x g por um minuto. A coluna foi lavada com 600 μL de solução de lavagem de RNA e centrifugada por mais um minuto, a 14.000 x g. Para cada extração realizada foi acrescido 50 μL do *mix* de incubação (tampão amarelo 80% (v/v), MnCl_2 10% (v/v), DNase 10% (v/v), preparado no momento de uso, e ficaram incubados por 15 minutos a temperatura de aproximadamente 22 °C. Seguindo o protocolo, foi adicionado 200 μL da solução de parada da DNase e centrifugação por 14.000 x g por um minuto. As amostras foram lavadas mais duas vezes com a solução de lavagem de RNA, com 600 e 250 μL da citada solução e centrifugado por 1 minuto, a 14.000 x g. Por último, cada coluna foi transferida para um novo microtubo livre de RNase e já identificado. Foram adicionados 100 μL de água livre de nucleases na membrana da coluna. Após centrifugação de 14.000 x g por 1 minuto, deixou-se as amostras secarem a temperatura ambiente e as mesmas estavam prontas para serem analisadas ou estocadas no ultra-freezer -70 °C até o momento de uso.

A integridade do RNA foi avaliada em eletroforese de gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo. As concentrações e o grau de pureza também foram determinados por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

4.12.2 Análise da expressão das plantas transgênicas por RT-PCR

A primeira fita de cDNA foi sintetizada através do Kit SuperScript™ First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen USA) em termociclador. Na primeira etapa, 5 μg de RNA total foram adicionados a 1 μL de oligo d(T) (10mM) com um volume de água DEPC suficiente para completar 12 μL em tubos de 0,2 mL. A reação foi incubada a 70 °C por 10 minutos e posteriormente a 4 °C por 2 minutos.

Num segundo momento, 7 μL do *mix* contendo 2 μL do tampão RT 10X; 2 μL de MgCl_2 (25 mM); 1 μL de dNTP (10 mM) e 2 μL de DTT (0,1 M) foram

adicionados em cada amostra e incubadas por 42°C por 5 minutos. Em seguida, 0,5 µL (2,5U) da enzima SuperScript™ II RT foi colocada em cada tubo, homogeneizados e incubados a 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos, finalizando com um banho de gelo por 2 minutos.

Na última etapa da reação realizou-se um tratamento com 0,5 µL de RNase H (10mM) por 20 minutos a 37°C com a finalidade de degradar as fitas de RNA complementares ao cDNA, deixando apenas as fitas de cDNA no produto final. Estes foram estocados a -20 °C em tubos de polipropileno de 1,6 mL até o momento do uso.

Para flanquear a região da seqüência 2 foram utilizados os pares de oligonucleotídeos 2/3FwdG e 2stRvsG ou 2nstRvsG para as seqüências com códon de parada ou não, respectivamente (tabela 2). Os fragmentos de DNA (ácido desoxirribonucléico) desejados foram amplificados por PCR utilizando-se cDNA produzido anteriormente. Utilizou-se 3 U da Plantium® Taq DNA Polimerase, 100 ng de cDNA, 1X de PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,3 mM dNTPs, 0,4 mM de cada primer, completando o volume de 25 µL com água MilliQ esterilizada. A reação é constituída por desnaturação a 94 °C por 1 minuto, 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 56 °C por 45 segundos e 72 °C por 60 segundos, e extensão final mais 72 °C por 7 minutos. Depois de amplificados, as amostras de DNA foram aplicadas em gel de agarose de alta resolução 1% e com o auxílio de padrão de peso molecular, identificou-se a banda de interesse.

4.13 SDS-PAGE e *Western blotting*

A primeira técnica para avaliação da antigenicidade das proteínas expressas foi realizada através de *Western blotting*, utilizando soro policlonal monoespecífico de coelho anti-peptídeo SBm7462® produzido no laboratório, LBCHV.

Primeiramente realizou-se a extração protéica de folhas verdes de amostras positivas no RT-PCR com a construção genética pK7-seq2. Macerou-se as folhas em nitrogênio líquido, de maneira semelhante à extração do RNA,

e para cada grama de folhas, utilizou-se 4 mL de tampão de extração [Tris HCl 50 mM (pH 7,0); EDTA 10 μ M; PMSF 1 μ M; Benzamidina 1 μ M; Tiouréia 2 μ M]. Centrifugou-se a 12.000 x g por 30 minutos, a 4 °C e no sobrenadante encontram-se as proteínas solúveis e no precipitado as proteínas de parede. Trabalhou-se com o sobrenadante que foi estocado no - 70°C até momento de uso.

As proteínas contidas no sobrenadante foram submetidas a eletroforese desnaturante em gel de acrilamida 15% (SDS-PAGE) e coradas com nitrato de prata.

Alíquotas de 160 μ L do sobrenadante foram fervidas por 4 minutos com igual volume de tampão redutor (uréia e β -mercaptoetanol) e aplicadas no gel. A corrida eletroforética se deu a 100V, sob amperagem e corrente constantes. Foi utilizado marcador de peso molecular. Ao final da corrida, o gel foi incubado em tampão de transferência (tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0,037% e 40% metanol) por 10 minutos.

A membrana utilizada para a transferência (Immobilon, porosidade 0,2 μ m) foi previamente tratada com metanol 100% por 1-3 segundos para adquirir caráter hidrofílica, e em seguida, equilibrada no tampão de transferência por 3 minutos, juntamente com os outros elementos do “sanduíche” do *blotting*. O “sanduíche” foi montado imerso no tampão de transferência colocando-se espuma, três folhas de papel de filtro, o gel, a membrana, e, novamente, três folha de papel de filtro Whatmam 3mm e espuma, tomando-se os cuidado de eliminar qualquer bolha de ar entre os elementos do sistema. A transferência ocorreu a 4°C, na voltagem de 40V, *overnight*.

Após esse período, a membrana foi bloqueada com PBST (PBS pH7,6, 0,5% de *Tween 20*) por duas horas e incubada sob agitação com anticorpos anti-SBm7462[®] por mais duas horas . Após três lavagens com PBST, a membrana foi incubada sob agitação com proteína A conjugada a peroxidase por duas horas. Posteriormente, lavou-se a membrana duas vezes com PBST e um vez com PBS pH 7,6. Após essa série de lavagens, colocou-se a membrana em contato com a solução reveladora (10mg de DAB - diaminobenzidina; 10mL de Tris 50mM pH 7,6; 1mL de Cloreto de Níquel 0,3%; 10 μ L de H₂O₂ 30%). Como controle negativo, foi utilizado um soro desprovido de anticorpos anti-SBm7462[®].

4.14 Pesquisa de antígeno rBm7462 em folhas de *A. thaliana* através da técnica de Peroxidase-anti-Peroxidase - PAP

Realizou-se imunohistoquímica, mais especificamente a técnica de peroxidase-anti-peroxidase ou PAP, das plantas contendo as construções pK7-seq2 e amostras controle, na pesquisa do peptídeo antigênico rBm7462.

Os tecidos vegetais foram fixados com formaldeído 3,7% em solução tampão de fosfato 50 mM (pH 7,4). Em seguida, os tecidos foram desidratados por incubação seriada em soluções crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100% duas vezes), por 1 hora cada. Depois, as amostras foram diafanizadas em dois banhos de xilol, mais uma hora cada, para inclusão dos fragmentos em blocos de parafina. Confeccionaram-se cortes com 4 μ m de espessura, que foram fixadas com poly-L-lysina 0,1% (w/v) em lâminas de vidro previamente tratadas. Para a imunohistoquímica, as lâminas foram desparafinizadas em xilol (2 passos de 30 minutos cada) e hidratadas em soluções alcoólicas decrescentes (100% duas vezes, 90%, 80% e 70%), trocando-se de solução a cada 5 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio metanólico 3% (v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem em phosphate buffer solution (PBS) pH 7,4, foi feita digestão enzimática dos cortes com tripsina, durante 15 minutos a 37 °C. Depois de lavar os cortes duas vezes com PBS pH 7,4, esses foram cobertos com soro normal de cabra (1:10) e incubado em câmara úmida por 45 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, com os cortes já secos, acrescentou-se anticorpo primário IgG de coelho anti-SBm7462, produzido no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/BIOAGRO/Universidade Federal de Viçosa, diluído 1:20; os cortes ficaram incubados 18 horas em câmara úmida, a 4 °C. Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS pH 7,4 e cobertos com anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho), também produzidos no mesmo laboratório, diluídos 1:10, incubados em câmara úmida a 37 °C, por 45 minutos. Na etapa seguinte, após nova lavagem, as lâminas foram cobertas com o complexo PAP produzidos em coelho (SIGMA[®]), segundo especificações do fabricante. Após 45 minutos em câmara úmida, a 37 °C, lavaram-se os cortes e colocou solução reveladora (25 mg de diaminobenzidina, 200 μ L de água oxigenada 30 volumes

e 100 mL de PBS pH 7,4) por 5 minutos. Após última lavagem, contra corou-se as amostras com Hematoxilina de Harris 1:10, desidratou-se, diafanizou-se em xilol e montou-se com Entellan[®]. Analisaram-se os resultados em microscópio óptico binocular ECLIPSE E600.

4.15 Microscopia confocal e processamento de imagens

A expressão das proteínas com cauda GFP foi confirmada por microscopia confocal. Foi realizada uma prévia seleção em microscópio de fluorescência das amostras positivas. A análise foi realizada nas folhas, com explantes de aproximadamente 0,5 cm², montadas em água, dos quais se observou, principalmente, a lâmina foliar. Foram utilizadas três repetições, consistindo de diferentes folhas de diferentes plantas. Também foram analisadas plantas não transformadas que funcionaram como controle negativo, para a diferenciação da emissão de fluorescência inespecífica. Trabalhou-se no microscópio óptico de varredura a laser, Confocal, marca Zeiss, modelo LSM 510 META no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa. As imagens de microscopia confocal foram obtidas utilizando-se o sistema LSM 510 META invertido (ZEISS) com laser de argon e laser de hélio néon com as objetivas de imersão de óleo de 40x e 60x. A fluorescência foi detectada usando o comprimento de onda de 458 nm com filtro dicromático de 515 nm e filtro de passagem de 475 a 525 nm para GFP. O *pinhole* foi fixado fornecendo uma faixa óptica de 1 a 1,5 μm. As imagens foram processadas com auxílio do *software* “LSM Image Browser 4” (Zeiss).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do gene

Estamos trabalhando com o desenvolvimento de uma proteína que não existe na natureza. O peptídeo SBm7462[®] é constituído de três epítomos imunogênicos, que somam 43 resíduos de aminoácidos, da glicoproteína intestinal Bm86 do carrapato *R. microplus* (Patarroyo *et al.*, 2002). Embora os níveis de proteção com a imunização desse peptídeo na forma sintética sejam elevados (Patarroyo *et al.*, 2009), formas alternativas de produção do imunógeno são avaliadas principalmente com o objetivo de se reduzir custos de produção. A produção heteróloga desse peptídeo utilizando genes sintéticos já foi avaliada em nosso laboratório, Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores – LBCHV (BIOAGRO/UFV), através do sistema de vacina de DNA (Medeiros *et al.*, 2008) e produção em *P. pastoris* (Sossai; 2009), sendo que o segundo trabalho apresentou melhores resultados.

Plantas e cultura de tecidos vegetais são usadas como sistema hospedeiro para a expressão de proteínas heterólogas, incluindo anticorpos, vacinas e outros agentes terapêuticos ou industriais, há quase 20 anos, oferecendo vantagens e superando limitações frente a outras formas de produção (Shin e Doran, 2009). Na presente proposta, avaliou-se a viabilidade

da produção de subunidades vacinais contra um ectoparasito, *R. microplus*, utilizando-se engenharia genética na transformação estável de plantas, no caso o vegetal modelo *A. thaliana*.

No LBCHV foram desenhados genes sintéticos com o objetivo de se produzir o peptídeo SBm7462 recombinante. O gene denominado *seq2*, de expressão intracelular, foi desenhado com códons preferenciais para *P. pastoris* (Sossai, 2009), e sabe-se que considerar a estrutura nucleotídica dos vetores de expressão é importante para se conseguir a produção de proteínas heterólogas (Streatfield *et al.*, 2003). Portanto, uma avaliação preliminar se esse gene também possui códons compatíveis com *A. thaliana* foi realizada.

Outros grupos de pesquisa também trabalharam com genes sintéticos otimizados na produção de subunidades vacinais, utilizando plantas como biofábricas, e apresentaram melhores resultados finais na expressão das proteínas (Sojikul *et al.*, 2003; Rigano *et al.*, 2004; Ashraf *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2005; Alvarez *et al.* 2006; Huang *et al.*, 2006b; Gil *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Cerovská *et al.*, 2008).

As implicações de se utilizar pequenos epítomos antigênicos expressos em plantas e imunização de animais estão relacionadas com segurança, menor custo, fácil viabilidade e vacinas efetivas. Uma vacina peptídica poderia evitar a incorporação de determinantes protéicos responsáveis pelo agravamento da doença (Belanger *et al.*, 2000). Inclusive pequenos peptídeos de apenas 15 resíduos de aminoácidos, produzidos em tabaco, mostraram antigenicidade (Brodzik *et al.*, 2005). Bouche *et al.* (2003) apresentaram pequenas seqüências formando poliepítomos, produzidos em cenouras transgênicas, imunizando camundongos BALB/c contra o sarampo, e concluíram que a combinação de selecionados epítomos e o sistema de produção em plantas é promissor para a produção de vacinas. Hernández *et al.* (2007) expressaram três peptídeos sintéticos em mamão que mostraram resposta imune protetora contra infecção parasitária (*Taenia solium*).

A figura 7 representa uma análise dos códons utilizados pelo gene *seq2*. Ao lado de cada códon está o significado do mesmo para a dada seqüência. Nessa figura está representado os códons preferenciais de *A. thaliana* segundo o banco de dados GenBank e análise do site

<http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Em destaque, na figura 7, estão os códons necessários para a tradução de *seq2*.

UUU 21.8(678320)	UCU 25.2(782818)	UAU 14.6(455089)	UGU 10.5(327640)
UUC 20.7(642407)	UCC 11.2(348173)	UAC 13.7(427132)	UGC 7.2(222769)
UUA 12.7(394867)	UCA 18.3(568570)	UAA 0.9(29405)	UGA 1.2(36260)
UUG 20.9(649150)	UCG 9.3(290158)	UAG 0.5(16417)	UGG 12.5(388049)
CUU 24.1(750114)	CCU 18.7(580962)	CAU 13.8(428694)	CGU 9.0(280392)
CUC 16.1(500524)	CCC 5.3(165252)	CAC 8.7(271155)	CGC 3.8(117543)
CUA 9.9(307000)	CCA 16.1(502101)	CAA 19.4(604800)	CGA 6.3(195736)
CUG 9.8(305822)	CCG 8.6(268115)	CAG 15.2(473809)	CGG 4.9(151572)
AUU 21.5(668227)	ACU 17.5(544807)	AAU 22.3(693344)	AGU 14.0(435738)
AUC 18.5(576287)	ACC 10.3(321640)	AAC 20.9(650826)	AGC 11.3(352568)
AUA 12.6(391867)	ACA 15.7(487161)	AAA 30.8(957374)	AGA 19.0(589788)
AUG 24.5(762852)	ACG 7.7(240652)	AAG 32.7(1016176)	AGG 11.0(340922)
GUU 27.2(847061)	GCU 28.3(880808)	GAU 36.6(1139637)	GGU 22.2(689891)
GUC 12.8(397008)	GCC 10.3(321500)	GAC 17.2(535668)	GGC 9.2(284681)
GUA 9.9(308605)	GCA 17.5(543180)	GAA 34.3(1068012)	GGA 24.2(751489)
GUG 17.4(539873)	GCG 9.0(280804)	GAG 32.2(1002594)	GGG 10.2(316620)

Figura 7: Códons de *Arabidopsis thaliana*. Frequência em porcentagem dos principais códons utilizados por *A. thaliana*. Análise de 31.098.475 de códons. [gbpIn]: 80395. Em destaque cinza os códons mais utilizados por *seq2*. Conteúdo GC 44,58%. (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi>).

Através de observação visual é possível afirmar que os códons utilizados com grande frequência para *A. thaliana* são compatíveis com os necessários para *seq2*. Portanto, embora o presente gene não tenha sido desenhado otimizado para ser expresso em plantas, pode ser usado no presente estudo.

5.2 Construções de DNA

Embora o gene tenha sido desenhado com sítios para clivagem de enzimas de restrição, não se trabalhou com essa metodologia, pois as enzimas não eram compatíveis com as dos vetores de expressão em plantas cedidos pelo Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BIOAGRO/UFV) e utilizados no presente estudo.

A tecnologia Gateway[®] permitiu a inserção do gene *seq2* em vetores binários de plantas para posterior análise e expressão das proteínas heterólogas. Essa é uma tecnologia de recombinação que pode ser aplicada à produção de proteínas recombinantes em plantas (Karimi *et al.*, 2007a e 2007b). Outros pesquisadores utilizaram essa tecnologia e concordam em ser uma rápida e confiável alternativa à clonagem de seqüências em vetores plasmidiais (Joubès *et al.*, 2004; Prabhakar *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009), inclusive para transformação mediada por *Agrobacterium* (Karimi *et al.*, 2002).

Após a clonagem de *seq2* inseridas no vetor pSC-A, seleção por resistência a antibiótico (ampicilina), confirmação por PCR de colônia, dois clones PSC-A *seq2A* e PSC-A *seq2B* tiveram o DNA plasmidial extraído e quantificado. Esses foram sequenciados e confirmaram a presença de *seq2*. Para a extração das seqüências de interesse foram realizadas duas reações em cadeia de polimerase com enzima DNA polimerase de alta fidelidade. Na primeira reação utilizou-se os oligonucleotídeos 2/3FwdG e 2stRvsG ou 2nsRvsG, amplificando uma banda de aproximadamente 426pb (figura 8). Após essa reação, uma parte da região de recombinação *attB* foi inserida.

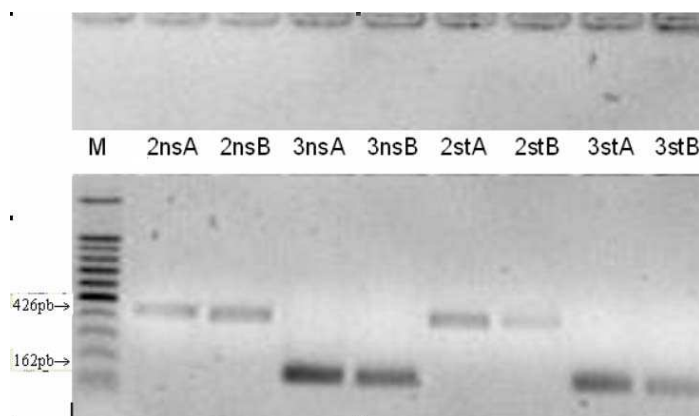


Figura 8: Primeira PCR de recombinação. Resultado revelado em gel de Agarose 1%. M – Marcador de 100pb; O número representa o respectivo gene extraído do vetor pSCA: 2 para *seq2* e 3 para *seq3* (que não foi avaliado no presente trabalho); ns usado para seqüência sem códon de parada e st quando há o códon de parada.

Na segunda reação em cadeia de polimerase, os oligonucleotídeos 2942- AttB1Fwd e 2942-AttB2 Rvs foram utilizados para complementar a região de recombinação (figura 9), o tamanho das bandas aumentou

aproximadamente 32 nucleotídeos, diferença sutil de se observar em eletroforese, mas confirmada pelo sequenciamento genético. Após a confirmação da extração das seqüências do gel, as seqüências estavam prontas para a inserção no vetor de doação, através do sistema Gateway®.

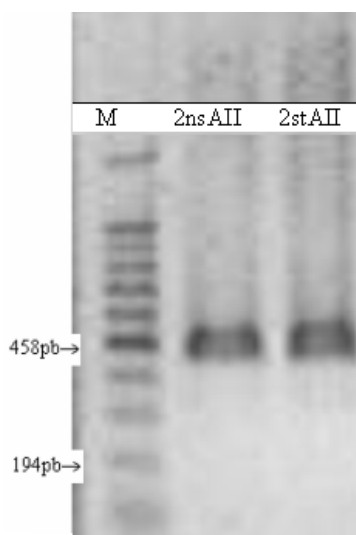


Figura 9: Segunda PCR de recombinação. Resultado revelado em gel de Agarose 1%. M – Marcador de 100pb; O número representa o gene *seq2*; ns usado para seqüência sem códon de parada e st quando há o códon de parada; II indica ser a segunda reação.

O pDONR201 é um vetor de doação adaptado ao sistema Gateway® com a seqüência de recombinação *attP*. Após a reação com BP clonase™, foi possível inserir *seq2* nesse vetor, criando clones com a entrada *attL*. Colônias de *E. coli* DH5α foram selecionadas em placas com LB e Kanamicina, e, então, confirmadas por PCR de colônia. Formaram-se os clones: pD2ns e pD2st.

A etapa seguinte utilizou a enzima LP clonase™ e vetores binário de expressão em plantas. Os clones pD2ns, que não possuem códon de parada, foram inseridos no vetor pK7FWG2 e deu origem a clones pk7F-*seq2*. Os clones pD2st formaram pk7-*seq2*, com códon de parada, inseridos no vetor pk7WG2. Os clones também foram multiplicados em meio LB, porém acrescidos de espectinomicina. Para todas as amostras foram realizados PCR de colônia. A escolha de se trabalhar com dois vetores de expressão, pk7WG2 e pk7FWG2, é justificada pelos objetivos alcançados com cada um: o vetor pk7WG2, que não possui gene repórter, não interfere com uma possível

eficiência vacinal; e o produto de expressão, no caso o peptídeo com a marcação GFP é mais facilmente analisado nas metodologias moleculares de caracterização. Após extração, o DNA plasmidial foi utilizado para transformar *Agrobacterium tumefaciens*.

5.3 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

O sistema binário foi desenvolvido a partir da observação de que o T-DNA não precisava estar fisicamente ligado à região vir para que ocorra sua transferência. O vetor binário possui replicação compatível com a do plasmídeo Ti desarmado residente no *Agrobacterium*. Dessa maneira, as proteínas da região vir codificadas pelo plasmídeo Ti desarmado podem agir para o reconhecimento das extremidades do vetor binário, promovendo a transferência do T-DNA para o genoma vegetal (Torres *et al.*, 1999).

Embora existam outros sistemas para a produção de plantas transgênicas, os relatos de trabalhos utilizando *Agrobacterium tumefaciens* ainda são maioria no meio científico (Rybicki, 2009). Dentre esses, são muitos os estudos utilizando *A. tumefaciens* especificamente para produzir subunidades vacinais assim como o presente estudo (Arakama *et al.*, 1997; Sojikul *et al.*, 2003; Streatfield *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004; Rigano *et al.*, 2004; MacRae *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008).

A linhagem de *A. tumefaciens* GV3101 utilizada nesse trabalho é compatível com transformação em *A.thaliana* (Greco *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2008).

Após a transformação, em placas de meio Rhizo acrescido de Gentamicina (seleção das bactérias) e Espectinomicina (seleção dos vetores binários), foi realizado PCR de colônia para confirmação dos clones com inserção do gene sintético *seq2*. A figura 10 apresenta um resultado de PCR de colônia, onde quatro clones foram positivos para pk7F-*seq2* (2nsA, 2nsB, 2nsC e 2nsD) e quatro para pk7-*seq2* (2stA, 2stB, 2stC e 2stD). Os iniciadores utilizados aumentam em aproximadamente 132pb o tamanho das bandas. Após a extração do DNA, as amostras positivas na PCR também foram

seqüenciadas para confirmar o sucesso da transformação. Aliquotas dos clones positivos foram estocados com glicerol 25% (v/v) em freezer -70°C até o momento de uso.

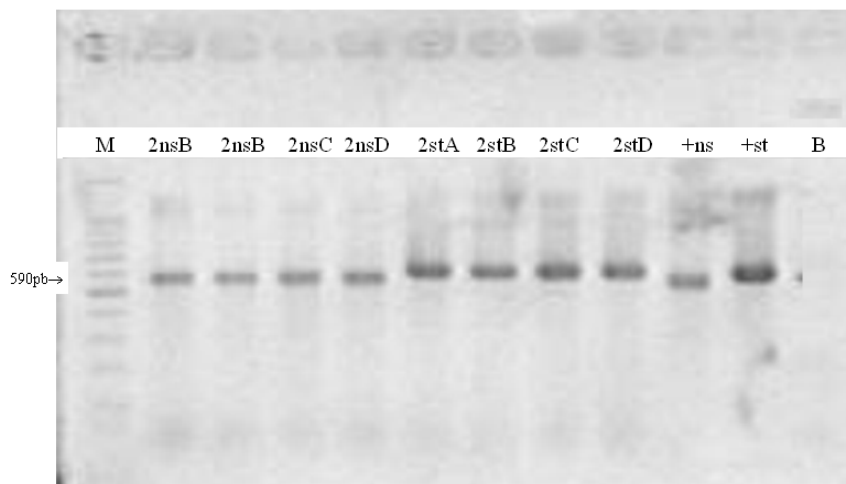


Figura 10: PCR de colônia de *A. tumefaciens* para Seq2. Gel de agarose 1%. M – Marcador de 100pb; O número representa o respectivo gene: 2 para *seq2*; ns usado para seqüência sem códon de parada e st seqüência com códon de parada; +ns – controle positivo para as amostras ns; +st – controle positivo para as amostras st; B – controle negativo.

5.4 Transformação de *Arabidopsis thaliana* e seleção de transformantes independentes

Muitos grupos de pesquisa, que trabalham com a produção e análise de antígenos protetores, consideram utilizar *A. thaliana* como o primeiro passo para o desenvolvimento de eficientes “fábricas verdes” (Rigano *et al.*, 2004). O grupo de pesquisa argentino do Dr. Borca, por exemplo, que trabalha com a expressão de peptídeos protetores contra a aftosa, primeiro expressou seu imunógeno em *A. thaliana* (Carrillo *et al.*, 1998), depois em alfafa (Wigdorovitz *et al.*, 1999), e avaliou a resposta imunológica em camundongos (Dus Santos *et al.*, 2005). Em nosso laboratório abriu-se uma nova linha de pesquisa com o objetivo de produzir subunidades vacinais contra o *R. microplus* em plantas transgênicas. Como estamos iniciando nossos experimentos, concordamos com muitos pesquisadores em começar utilizando a *A. thaliana* como planta

hospedeira (Carrillo *et al.*, 1998; Rigano *et al.*, 2004; MacRae *et al.*, 2004; Lindh *et al.*, 2009). Pretende-se, em trabalhos futuros, avaliar a resposta imune humoral e celular em camundongos imunizados com os peptídeos produzidos aqui, produzir o mesmo rBm7462 em outros vegetais e, posteriormente, imunizar bovinos.

Dentre as vantagens de se trabalhar com *A. thaliana*, pode-se destacar que essa é uma planta bem conhecida, muito utilizada como organismo modelo e, portanto, com muitos protocolos de trabalho bem estabelecidos (Lijsebettens e Clarke, 1998, Burssens *et al.*, 1998; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Walbot, 2000; Hays 2002; Coelho *et al.*, 2007).

Embora um dos grandes entraves na utilização de plantas como biofábricas seja a baixa concentração de proteínas heterólogas produzidas, há relatos de *A. thaliana* expressando proteínas VP2 (doença de Gumboro) na ordem de 0,5% até 4,8% da concentração total de proteínas solúveis (Wu *et al.*, 2004). Outros experimentos também utilizaram *A. thaliana* como material vegetal para a produção de subunidades vacinais e obtiveram resultados satisfatórios (MacRae *et al.*, 2004; Gil *et al.*, 2007).

A vacina bivalente HIV-1/HBV foi expressa em *Nicotiana tabacum* e *A. thaliana* e a produção de proteínas recombinantes foi semelhante em ambas plantas; sugerindo que o principal parâmetro para a inclusão das proteínas é intrínseco a natureza da fusão da proteína e não ao sistema de expressão da planta (Grego *et al.*, 2007).

As plantas *A. thaliana* são extremamente sensíveis a variações de umidade e temperatura. No início do experimento, com mínimas variações nas condições climáticas e ataque de pulgões, muitas plantas morreram ou apresentaram um amadurecimento precoce, ou seja, plantas pequenas com presença de flores. Portanto, para o sucesso do experimento as condições de cultivo e crescimento foram rígidas.

Após atingir bom desenvolvimento e amadurecimento floral, *A. thaliana* ecotipo Col 0 foram transformadas com as construções pk7-seq2 e pk7F-seq2, via *A. tumefaciens*. Algumas amostras foram cultivadas e não foram transformadas, para serem utilizadas como controle negativo. Outras plantas com transformações genéticas com genes diferentes de nosso interesse também foram utilizadas como parâmetro para a interpretação e análises de

testes posteriores. Realizou-se o método de “mergulho” de escapes florais ou *floral dip* (modificado de Clough e Bent, 1998) duas vezes nas mesmas plantas, com o intervalo de uma semana, para aumentar a taxa de transformação positiva, que foi de aproximadamente 70%.

O primeiro passo de seleção das plantas que possivelmente inseriram o gene *seq 2* em seu genoma, foi o cultivo das sementes em meio seletivo. Para a regeneração das plantas transformadas, utilizou-se meio seletivo com Kanamicina na concentração de 100 µg/mL, a razão de usar um maior nível de antibiótico é aumentar a pressão de seleção e minimizar o número de falsos positivos, estratégia também adotada por Aziz *et al.* (2002). Sementes de *A. thaliana* não transformadas foram colocadas no mesmo meio de cultura sem antibiótico e cresceram com velocidade superior as transformadas, também foram colocadas em meio seletivo e as mesmas não se desenvolveram ou apresentaram um crescimento mínimo. Essa característica deve-se ao fato de que as plantas transformadas, que incorporaram o transgene, adquiriram resistência à Kanamicina. A figura 11 mostra plântulas de *A. thaliana* ainda em placa e meio seletivo. Trinta plântulas transformadas com a construção pk7-*seq2* e trinta com a construção pk7F-*seq2* foram cultivadas na terra, em vasos individuais e identificados. Além das amostras controle que também foram cultivadas na terra. Depois das análises moleculares, confirmou-se que as plantas com melhor desenvolvimento eram as positivas para a presença do nosso inserto de interesse (figura 12). O crescimento superior das *A. thaliana* transgênicas indicam também que a integração de *seq2* no genoma vegetal não foi prejudicial ao desenvolvimento e rendimento das mesmas, característica importante que sempre deve ser avaliada, fornecendo dados que corroboram para uma manipulação genética bem sucedida (Lopes e Araia, 2006; Umezawa *et al.*, 2006).



Figura 11: Plântulas de *Arabidopsis thaliana*. As sementes foram cultivadas em meio seletivo com kanamicina. Idade de 13 dias, duas semanas antes de serem cultivadas em terra.

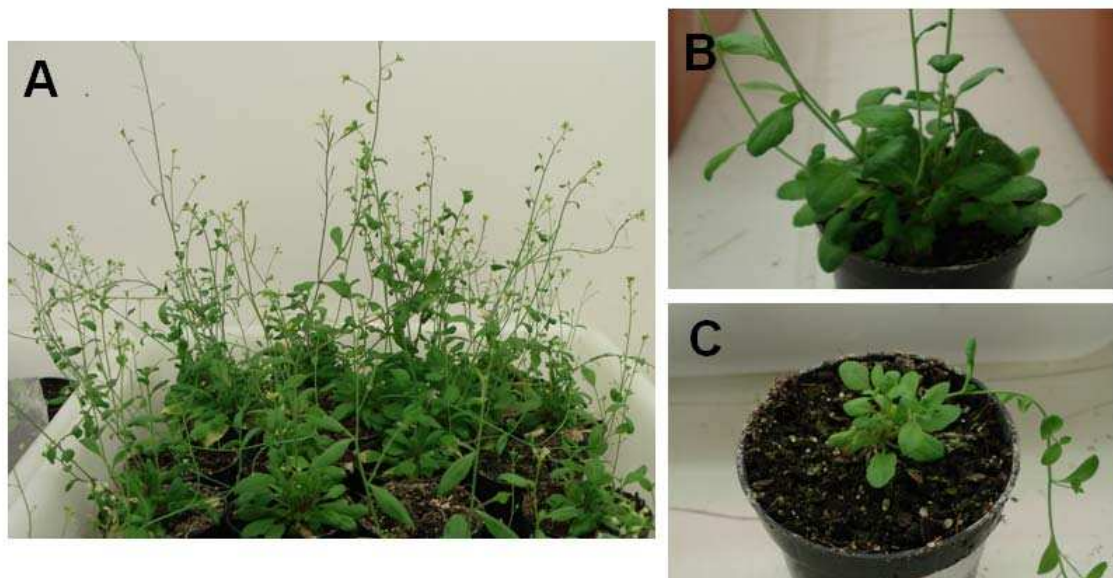


Figura 12: *Arabidopsis thaliana*. Plantas transformadas com *Agrobacterium* aos 78 dias de idade (A); Em B, amostra isolada da mesma planta com a presença de *seq2* confirmada e em C exemplar negativo para a presença de inserto. Observa-se grande diferença de desenvolvimento entre B e C, considerando que ambas possuem a mesma idade.

Após a seleção em meio seletivo, trabalhou-se com metodologias moleculares para confirmação da transformação genética. O DNA genômico dos vegetais foi extraído e quantificado para a realização de PCR e sequenciamento genético. As plantas positivas no primeiro teste revelaram bandas de 462pb de tamanho. Plantas controles não amplificaram seqüências de DNA com o tamanho do nosso interesse. Amostras selecionadas do teste anterior foram seqüenciadas e confirmaram em definitivo a integração do gene *seq2* ao genoma vegetal (figura 13). Doze linhagens transgênicas foram selecionadas, seis com cauda GFP e seis com códon de parada, para dar continuidade aos estudos.

```
AAAAAGCAGGCTTCACAATGGCCTTGTCTTAGCAGCATGTTCTAAGGAAGTT  
ACAAGCTTGCGAACACTGTGATTGTGGAGAATGGGGAGCTATGAACATGAC  
GACAAGATCATCGATTTGCTCAGATTTTCGGTAACGAGTTTTGCAGAAACGCT  
TGTTTGTCCAAGCATGTCTTGAGGAAGTTGCAAGCTTGTGAACACTGTGATT  
GTGGTGAATGGGGTGCTATGAACATGACAACCAGATCCTCTATATGCTCTG  
ATTTTCGGTAACGAGTTTTGTAGGAACGCATGCCTTTCTAAGCATGTCCTTAG  
AAAGCTTCAAGCATGTGAGCATTGTGACTGTGGAGAATGGGGTGCAATGAA  
CATGACTACTAGATCCAGTATCTGTTCCGATTTTCGGAAACGAATTTTGTAGA  
AACGCTTGTGTGAGACCCAGCTTTCT
```

Figura 13: Sequência *seq2*. Sequenciamento do DNA extraído da planta *A. thaliana* confirmando a presença da sequencia *seq2* (em cinza) com códon de parada. Sublinhado e em negrito o *star/stop* códon.

5.5 Transcrição e expressão da rBm7462 em *A. thaliana* transgênicas

A transcrição do *seq2* foi avaliada por RT-PCR. O RNA total das folhas de *A. thaliana* foi extraído e analisado. A média de concentração das amostras foi de aproximadamente 100 µg/mL. Para a confecção do cDNA utilizou-se oligo dT. A PCR, realizada em seguida com *primers* que flanqueiam a região *seq2*, confirmou a transcrição, amplificando um fragmento de 426 pb (figura 14). Observa-se na figura a amplificação de uma banda inespecífica, de aproximadamente 150 pb. Após análise mais detalhada de nossos *primers* e de *seq2*, acreditamos que os mesmos poderiam se anelar de modo mais inespecífico em outras regiões da seqüência, pois o gene é a repetição da

SBm7462[®] três vezes. Resolvemos essa questão ao repetir a PCR para algumas amostras utilizando a Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), que é uma polimerase com atividade de exonuclease 3'→5'. Nessa segunda PCR, os *primers* só foram capazes de anelar nas regiões esperadas porque havia atividade de correção da polimerase, amplificou-se apenas a banda esperada. Plantas não transformadas e controle branco não mostraram a amplificação de *seq2* ou qualquer outra banda.

Rodrigues (2005) também confirmou a expressão de seu transgene produzido em *A. thaliana* também por RT-PCR e monitoramento em microscópio confocal, metodologias semelhantes ao presente trabalho.

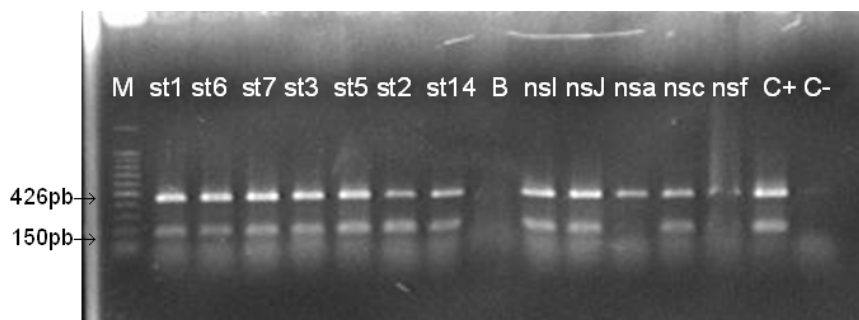


Figura 14: Resultado do RT-PCR. Resultado revelado em gel de Agarose 1%. M – Marcador de 100pb; B – Controle Branco da reação; C+ – Controle Positivo da reação; C- – Controle negativo da reação; As construções pk7-*seq2* estão representadas por st e o número que representa a amostra; Representado por ns e letras estão as construções pk7F-*seq2*.

O perfil eletroforético da expressão das proteínas recombinantes sem marcação GFP foi analisado por SDS-PAGE. A figura 15 mostra a caracterização destes peptídeos por SDS-PAGE com gradiente de 15%, corado com nitrato de prata. A nossa proteína de interesse possui o tamanho de aproximadamente 15 kDa, condizente com o número de resíduos de aminoácidos de *seq2*, tamanho que pode ser visualizado no gel. Esses dados concordam com Sossai (2009) que também produziu a proteína rBm7462 a partir do gene *seq2* em *P. pastoris*.

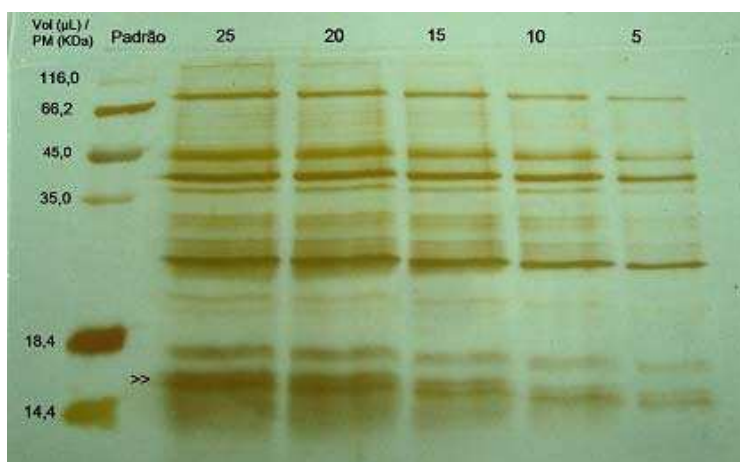


Figura 15: Resultado do SDS-PAGE. Gel de eletroforese (SDS-PAGE) com gradiente de concentração de 10 a 16% corado com nitrato de prata. Padrão molecular na primeira canaleta. Peptídeo rBm7462 (15 kDa) em diferentes concentrações: 25, 20, 15, 10 e 5 µg por canaleta, respectivamente. A seta indica banda com tamanho aproximado de 15kDa, o que representaria o rBm7462.

Com o objetivo de confirmar as bandas encontradas no SDS-PAGE como sendo do peptídeo rBm7462, foi realizada a técnica de *Western blotting* utilizando soro de coelho imunizados com o peptídeo SBm7462[®]. Porém acreditamos que devido a pouca disponibilidade de material vegetal (os vasos individualizados representam uma pequena amostra de *A. thaliana*, que já é uma planta de pequenas dimensões) e à baixa concentração de proteínas, não conseguimos a visualização da banda de interesse na membrana de nitrocelulose (dados não mostrados). Foi preciso preservar ao máximo as plantas positivas nas análises moleculares iniciais, pois o objetivo posterior consistia na seleção de sementes. Nas próximas gerações de *A. thaliana* transgênicas cultivaremos maior quantidade de material vegetal para ser utilizado nessa metodologia e confirmar a presença da proteína recombinante.

Muitos são os relatos de pesquisadores que concordam que a baixa concentração protéica e suas possíveis causas podem ser um entrave para a produção de proteínas nas “fábricas verde” (Daniell *et al.*, 2009). Entre as causas são relatadas as condições de cultivo, a presença de pragas e fatores genéticos que afetam a transcrição, tradução e modificações pós-traducional

(Jamal *et al.*, 2009). Os fatores ambientais foram controlados, mas ainda podemos manipular a parte de engenharia genética. Melhores resultados estão sendo alcançados para a expressão de peptídeos em plantas com o uso de genes sintéticos usando códons otimizados, o uso de promotores fortes, que podem incluir a seqüência Kozac ou sinais de retenção celular, como a SEKDEL (Dong *et al.*, 2005; Lindh *et al.*, 2009). Uma vez trabalhando com genes sintéticos podemos aumentar sua expressão através da otimização de seu desenho, assim como outros grupos de pesquisas aumentaram a expressão de subunidades vacinais, contra outros parasitos, expressas em plantas (Sharma e Sharma, 2009; Vathipadiekal *et al.*, 2010). A concentração final do produto produzido em vegetais exerce uma grande influência sobre a economia do processo, esforços consideráveis são feitos, por pesquisadores na acadêmica e ou atuando na área comercial, para aumentar os níveis de expressão de proteínas heterólogas (Shin e Doran, 2009).

Para visualizar a expressão da rBm7462 sem a marcação GFP, com o gasto de pequena quantidade de material vegetal, realizou-se imunohistoquímica. A metodologia de PAP foi aplicada para amostras de plantas com a seqüência de *seq2* com códon de parada, positivas no teste de RT-PCR, ou seja, amostras com a construção pk7-*seq2*, e para amostra negativa. Embora nessa técnica se confirme que a expressão de proteína recombinante é baixa, a alta sensibilidade e especificidade da técnica mostraram diferença significativa entre amostra positiva e negativa, como pode ser observado na figura 18. Ao longo de todo o corte histológico, na figura 18A, observam-se pontos fortemente corados acastanhados, representando o peptídeo marcado. Além de a técnica provar a expressão de *seq2*, por ser um método imunológico, mostra também a antigenicidade do peptídeo recombinante. O reconhecimento do rBm7462 por anticorpos policlonais monoespecíficos anti-SBm7462[®] que as características antigênicas dos epítomos após processamento pós-traducional nas plantas foram preservadas. Resultados que concordam com Gil *et al.* (2007), que também trabalharam com peptídeos expressos em vegetais transgênicos que mantiveram seus níveis de antigenicidade.

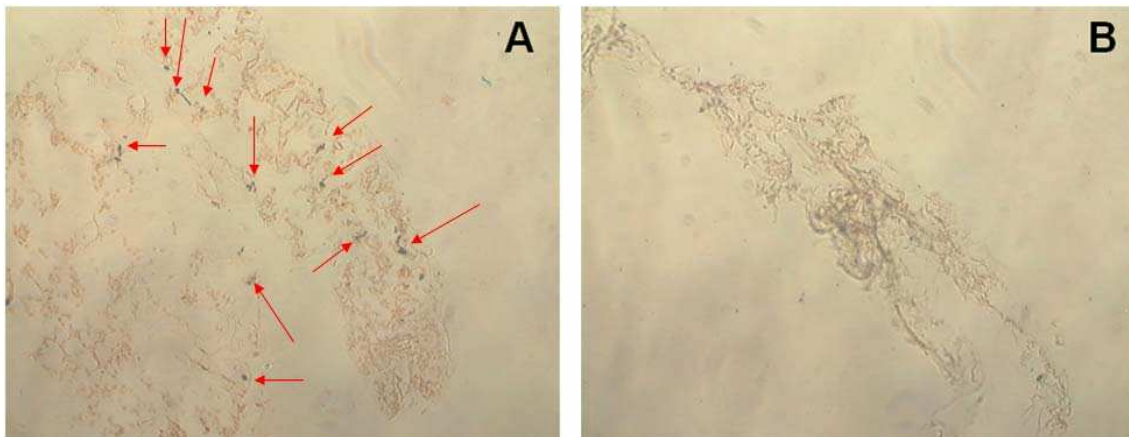


Figura 16: Imunohistoquímica (PAP) de *A.thaliana*. Planta positiva em **A**, expressando o peptídeo recombinante rBm7462, As setas vermelhas destacam os pontos de reação positivo. Em **B** plantas não transformadas que funcionaram como controle negativo. Lâminas contra coradas Hematoxilina de Harris. Aumento de 200X.

Em relação aos transgenes com a cauda GFP, as amostras positivas no teste de RT-PCR foram analisadas em microscópio de fluorescência num primeiro momento, onde se visualizou a expressão do peptídeo próximo a parede celular. Em seguida, foi realizada análise em microscópio confocal das folhas. As vantagens desse microscópio sobre o de fluorescência convencional seriam a menor profundidade de campo, que elimina a fluorescência das regiões fora de foco, a capacidade de co-localizar secções ópticas de amostras espessas e o aumento de resolução uma vez que a luz incidente sobre a amostra é um feixe de luz monocromático (Vermelho *et al.*, 2006). Lacorte *et al.* (2007) expressaram proteínas do vírus da anemia aviária em plantas e também utilizaram a estratégia de utilizar vetor binário com GFP fusionado a porção N terminal, semelhante a presente construção com o vetor pk7FWG2.

Além da expressão do peptídeo foi possível determinar a localização mais precisa do mesmo. Fusão do gene estudado a uma cauda GFP é uma importante ferramenta biotecnológica para se determinar a localização intracelular de uma proteína alvo, técnica que também foi utilizada em plantas transgênicas por Hirai *et al.* (2010). A maior taxa de fluorescência observada nas células da epiderme da *A. thaliana* foi visualizada na região do apoplasto (Figura 17). Essa região de localização do antígeno pode atender a ideia de

biocapsúla. Numa planta, apoplasto refere-se ao conjunto de compartimentos existentes exteriormente à membrana plasmática. Estruturalmente é formado pelo contínuo das paredes celulares de células adjacentes, assim como pelos espaços extracelulares, onde ocorre o transporte apoplástico de água e solutos (Cambell e Reece, 2002). Nas amostras que serviram de controle negativo observa-se apenas baixa expressão inespecífica de fluorescência, sem alteração no padrão de fluorescência.

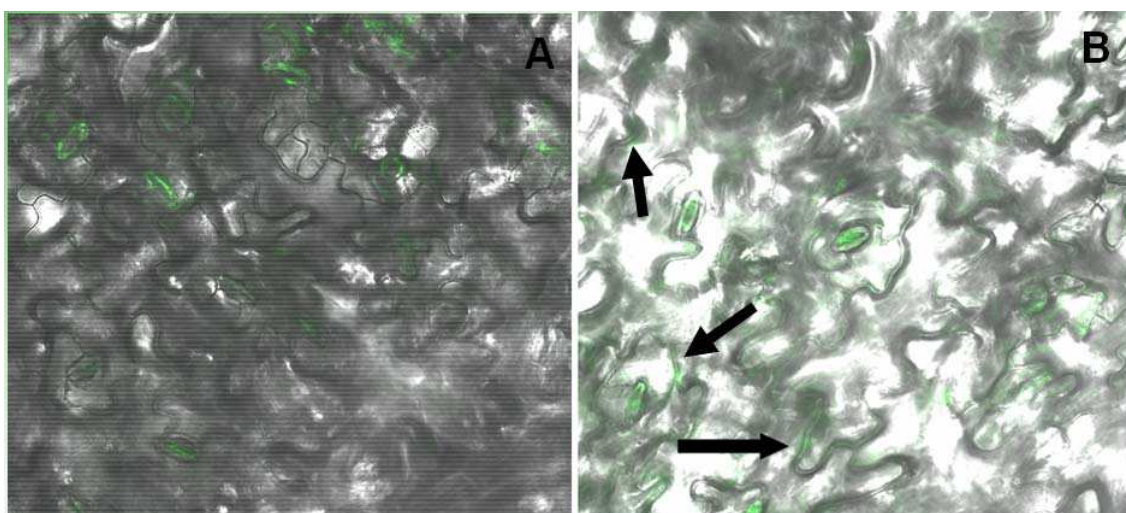


Figura 17: Expressão do rBm7462. Imagem monitorada por microscópio confocal das células epidérmicas de *A. thaliana* expressando o peptídeo rBm7462. A seta destaca a fluorescência dos peptídeos marcados com GFP, concentrados principalmente no apoplasto (A). Em B observamos amostra de vegetal não transformada com fluorescência inespecífica nos cloroplastos.

Diversos grupos de pesquisa são unânimes em afirmar que a produção de proteínas heterólogas representa uma medida alternativa com grande sucesso potencial para a síntese de vacinas, especialmente em saúde animal, muitos são os caminhos para explorar esse segmento e potencializar a produção (Rice *et al.*, 2005; Streatfield, 2005b; Sharma e Sharma, 2009; Daniell *et al.*, 2009). Existem trabalhos publicados apresentando a expressão de subunidades vacinais contra parasitos em plantas transgênicas (Hernández *et al.*, 2007; Wang *et al.* 2008), mas esse é o primeiro relato de nosso conhecimento da produção de subunidades vacinais em plantas transgênicas contra um ectoparasito, no caso, o carrapato *R. microplus*. Inclusive, manteve-

se a antigenicidade dos peptídeos recombinantes produzidos. Os dados apresentados podem ser utilizados como modelo para novos estudos da expressão de outros peptídeos imunogênicos contra ectoparasitos na área de medicina veterinária e humana. A produção de vacinas em plantas geneticamente modificadas na saúde animal representa uma alternativa promissora explorada em diferentes segmentos da pesquisa acadêmica e industrial (Streatfield, 2005b; Rice *et al.*, 2005; Daniell *et al.*, 2009). A perspectiva é de que a vacina rBm7462 produzida em vegetais seja viável economicamente e confira uma resposta imune protetora, assim como a produzida pela SBm7462[®], constituída de peptídeos sintéticos (Patarroyo *et al.*, 2009). O próximo passo consiste na avaliação da resposta imune humoral e celular de camundongos BALB/c, que receberão as subunidades produzidas no presente trabalho, via *per os* e via subcutânea, avançando na confirmação de se utilizar plantas como biofábricas na produção da vacina recombinante rBm7462.

6. CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho mostram que é possível produzir peptídeo homólogo a vacina SBm7462[®], anti-carrapato *R. microplus*, por meio da expressão de gene sintético em vegetais geneticamente modificados, mais precisamente em *A. thaliana*, sem perda de antigenicidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4 ed. Livraria e editora Revinter Ltda., Rio de Janeiro, 544p. il, 2003.

ALDERBORN, A., SUNDSTRÖN, J., SOERIA-ATMADJA, D., SANDBERG, M., ANDERSSON, H. C., HAMMERLING, U. Genetically modified plants for non-food or non-feed purposes: Straightforward screening for their appearance in food and feed. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 453–464, 2010.

ALVAREZ, M. L., PINYERD, H. L., CRISANTES, J. D., RIGANO, M. M., PINKHASOV, J., WALMSLEY, A. M., MASON, H. S., CARDINEAU, G. A. Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice. **Vaccine**, v.24, p. 2477-2490, 2006.

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**, v. 2, p. 557 – 563, 2002.

ARAKAWA, T., CHONG, D. K. X., MARRIT, J. L., LANGRIDO, W. H. R. Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. **Transgenic Research**, v.6, p. 403-413, 1997.

ARRAES, P.A. Plantas transgênicas: será que podemos parar o avanço do conhecimento?
EMBRAPA.www.embrapa.br/imprensa/artigos/2000/artigo.2004-12-

07.2353068872/? searchterm=Plantas %20genética. Acesso em 25 de janeiro de 2007, hora: 10:07. 2004.

ASHRAF, S., SINGH, P. K., YADAV, D. K., SHAHNAWAZ, M., MISHRA, S., SAWANT, S. V., TULI, R. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. **Journal of Biotechnology**, v.119, p. 1 – 14, 2005.

AZIZ, M. A., SING, S., KUMAR, P. A., BHATNAGAR, R.. Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.299, p.345-351, 2002.

BABIUK, L. A. Vaccination: A Management Tool in Veterinary Medicine. **The Veterinary Journal**, v.164, p.188-201, 2002.

BAHIENSE, T. C., FERNANDES, E. K. K., BITTENCOURT, V. R. E. P. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 319 -324, 2006.

BAXTER, G. D., BARKER, S. C. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *R. (B.) microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. **Insect Biochemical Molecular Biology**, v. 28, p. 581 – 589, 1998.

BEATI, L., KEIRANS, J. E. Analysis of the systematic relationships among ticks genera *Rhopicephalus* and *Boophilus* (Acari:Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 32-48, 2001.

BELANGER, H., FLEYSH, N., COX, S., BARTMAN, G., DEKA, D., TRUDEL, M., KOPROWSKI, H., YUSIBOV, V. Human respiratory syncytial virus vaccine antigen produced in plants. **The FASEB Journal**, v. 14, p. 2323-2327, 2000.

BERINSTEIN, A., VAZQUEZ-ROVERE, C., ASURMENDI, S., GÓMEZ, E., ZANETTI, F., ZABAL, O., TOZZINI, A., GRAND, D. C., TABOGA, O., CALAMANTE, G., BARRIOS, H., HOPP, E., CARRILLO, E. Mucosal and systemic immunization elicited by Newcastle disease virus (NDV) transgenic plants as antigens. **Vaccine**, v.23, p.5583 – 5589, 2005.

BITTENCOURT, V. R. E. P., BAHIANSE, T. C., FERNANDES, E. K. K., DE SOUZA, E. J. Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOROKIN, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari; Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n. 1. p. 38-42, 2003.

BORÉM, A. **Biotechnologia e meio ambiente**. Viçosa: Ed. Folha de Viçosa, 425p.: il., 2004a.

BORÉM, A., PATERNIANI, E., CASTRO, L. A. B. **Transgênicos, a verdade que você precisa saber**. Brasília, DF: Dupligráfica. 57p., 2004b.

BORÉM, A., VIEIRA, M. L. C. **Glossário de Biotecnologia**. Viçosa Ed. Folha de Viçosa, 158p., 2005.

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., ALMEIDA-LIMA, U., AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher. 593p.: il., 2001.

BOUCHE, F. B., MARQUET-BLOUIN, E., YANAGI, Y., STEINMETZ, A., MULLER, C. P. Neutralising immunogenicity of a polyepitope antigen expressed in a transgenic food plant: a novel antigen to protect against measles. **Vaccine**, v.21, p.2065 – 2072, 2003.

BRODZIK, R., BANDURSKA, K., DEKA, D., GOLOVKIN, M., KOPROWSKI, H. Advances in alfalfa mosaic virus-mediated expression of anthrax antigen *in planta*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 717-122, 2005.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F., VALENTE, E. C. N., SOUZA, L. A., DIAS, N. S., ARAÚJO, A. M. N. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887)(Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 44-48, 2009.

BURSSSENS, S. MONTAGU, M. V., INZÉ, D. The cell cycle in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 9-19, 1998.

CAEIRO, V. Reflexão sobre a taxonomia actual dos *Ixodidae*. A sistemática morfológica *versus* sistemática molecular - o género *Rhipicephalus* e o género *Boophilus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, n. 101, p. 37-39, 2006.

CAMBELL, N.A., REECE, J.B. (2002). **Biology**. California: Benjamin Cummings. p. 753-754, 2002.

CANÇADO, L. J. Utilização de sementes de tabaco transgênico como biorreatores para a produção de um fragmento scFv de um anticorpo monoclonal, 92f. Dissertação (Mestrado). UNICAMP, Campinas, São Paulo. 2002.

CARRILLO, C., WIGDOROVITZ, A., OLIVEROS, J. C., ZAMORANO, P. I., SADIR, A. M., GÓMEZ, N., SALLINAS, J., ESCRIBANO, J. M., BORCA, M. V. Protective Immune Response to Foot-and-Mouth Disease Virus with VP1 Expressed in Transgenic Plants. **Journal of Virology**, v.72, n. 2, p. 1688-1690, 1998.

CEROVSKÁ, N., HOFFMEISTEROVÁ, H., PECENKOVÁ, T., MORAVEC, T., SYNKOVÁ, H., PLCHOVÁ, H., VELEMÍNSKY, J. Transient expression of HPV 16 E7 peptide (aa 44-60) and HPV 16 L2 peptide (aa 108-120) on chimeric

potyvirus-like particles using *Potato virus X*-based vector. **Protein Expression & Purification**, v.58, p. 154-161, 2008.

CHANDLER, J., NARDMANN, J., WERR, W. Plant development revolves around axés, **Trends in Plant Science**, v.13, n.2, p. 78-84, 2008.

CHARGELEGUE. D., OBREGON, P. DRAKE, P. M. W. Transgenic plants for vaccine production: expectations and limitations. **TRENDS in Plant Science**, v.6, p.495-496, 2001.

CHEN, H. F., CHANG, M. H., CHIANG, B. L., JENG., S. T. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71. **Vaccine**, v.24, p. 2944 – 2951, 2006.

CIPRANDI, A., de OLIVEIRA, S. K., MASUDA, A., HORN, F. TERMIGNONI, C. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. **Experimental Parasitology**, v. 114, p.40-46, 2006.

CLOUGH, S. J. and BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 16, p. 735-743, 1998.

COELHO, S. M., PETERS, A. F., CHARRIER, B., ROZE, D., DESTOMBE, C., VALERO, M., COCK, J. M. Complex life cycles of multicellular eukaryotes: New approaches based on the use of model organisms. **Gene**, v. 406, p. 152–170, 2007.

CORSON M. S., TEEL, T. D., GRANT, W. E. Microclimate influence in a physiological model of cattle-fever tick (*Boophilus* spp.) population dynamics. **Ecological Modelling**, n. 180, p. 487-514, 2004.

COUTO-PIMENTEL, J. A Vacina Sintética SBm 7462 no Controle do Carrapato *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887) em Animais Estabulados e a Campo. **Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV**, 77p. 2002.

DA SILVA VAZ-JR, I. D. S., LOGULLO, C., TERMIGNONI, C., DE OLIVEIRA, P. L., MASUDA, A. Caracterização d novos antígenos em *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 146-149, 2004.

DALTON, J. P., MULCAHY, G. Parasite vaccine – a reality? **Veterinary Parasitology**, v.98, p. 149 – 167, 2001.

DANIELL, H., SINGH, N. D., MASON, H., STRATFIELD, S. J. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 12, p. 669-679, 2009.

DANIELL, H., STREATFIELD, S. J., WYCOFF, K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. **Trends Plant Science**, v.6, p. 219-226, 2001.

DAVEY, R. B., GEORGE, J. E., MILLER, R. J. Comparison of the reproductive biology between acaricide-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 211–220, 2006.

DAVISON, J. GM plants: Science, politics and EC regulations. *Plant Science*, v. 178, p. 94–98, 2010.

DE LA FUENTE, J., KOCAN, K. M. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. **Expert Review of Vaccines**, v. 2, p. 583-593, 2003.

DONG, J. L., LIANG, B. G., JIN, Y. S., ZHANG, W. J., WANG, T. Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. **Virology**, v.339, p.153 – 163, 2005.

DUS SANTOS, M., CARRILLO, C., ARDILA, F., RÍOS, R. D., FRANZON, P., PICCONE, M. E., WIGDOROVITZ, A., BORCA, M. V. Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen. **Vaccine**, v.23, p.1838 – 1834, 2005.

ESTRADA-PEÑA, A. Geostatistic and remote sensing using NOAA-AVHRR satellite imagery as predictive tools in tick distribution and habitat suitability estimations for *R. (B.) microplus* (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 81, p. 73-82, 1999.

ESTRADA-PEÑA, A., BOUATTOUR, A., CAMICAS, J. L., GUGLIELMONE, A., HORAK, I., JONGEJAN, F., LATIF, A., PEGRAM, R., WALKER, A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental & Applied Acarology**, v. 38, p. 219–235, 2006.

FERNANDEZ-RUVALCABA, M., PRECIADO-DE-LA TORRE, F., CRUZ-VAZQUEZ, C., GARCIA-VAZQUEZ, Z. Anti-tick effects of *Melinis minutiflora* and *Andropogon gayanus* grasses on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae. **Experimental and Applied Acarology** v. 32, p. 293 – 299, 2004.

FOGAÇA, A., ALMEIDA, I. C., EBERLIN, M. N., TANAKA, A. S., BULET, P., DAFFRE, S. 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.

FOIL, L.D., COLEMAN, P., EISLER, M., FRAGOSO-SANCHEZ, H., GARCIA-VAZQUEZ, Z., GUERRERO, F. D., JONSSON, N. N., LANGSTAFF, I.G., LI, A.Y., MACHILA, N., MILLER, R.J., MORTON, J., PRUETT, J. H., TORR, S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 163 – 181, 2004.

FRANCIS, A. E. The future of vaccines, immunization concepts and practice. **Vaccine**, v.19, p. 2206 – 2209, 2001.

FRISCH, J. E., O'NEILL, C. J., KELLY, M. J. Using genetics to control cattle parasites – the Rockhampton experience. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 253 – 264, 2000.

GARCÍA-GARCÍA, J. C., MONTERO, C., REDONDO, M., VARGAS, M., CANALES, M., BOUÉ, O., RODRÍGUEZ, M., JOGLAR, M., MACHADO, H., GONZÁLES, I. L., VALDÉZ, M., MÉNDEZ, L., DE LA FUENTE, J. Control of Ticks resistant to the immunization with BM86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *R. (B.) microplus*. **Vaccine**, v. 18, p. 2275-2287, 2000.

GARCÍA-GARCÍA, J.C., GONZÁLEZ, I.L., GONZÁLEZ, D.M., VALDÉS, M., MÉNDEZ, L., LAMBERTI, J., D'AGOSTINO, B., CITRONI, D., FRAGOSO, H., ORTIZ, M., RODRÍGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. Sequence variations in the *R. (B.) microplus*Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Experimental & Applied Acarology**, v. 23, p. 883–895, 1999.

GARCIA-GARCIA, J.C., SOTOT, A., NIGRO, F., MAZZA, M., JOGLAR, M., HECHEVARRIA, M., LAMBERTI, J., DE LA FUENTE, J. Adjuvant and immunostimulating properties of the recombinant Bm86 protein expressed in *Pichia pastors*. **Vaccine**, v. 16, p. 1053 – 1055, 1998.

GIL, F., REYTOR, E., PÉREZ-FILGUEIRA, D. M., ESCRIBANO, J. M. Multimerization of peptide antigens for production of stable immunogens in transgenic plants. **Journal of Biotechnology**, v.128, p.512–518, 2007.

GLICKMAN, L. Weighing the risks and benefits of vaccination. **Advances in Veterinary Medicine**, v.41, p. 701 – 713, 1999.

GLÓRIA, M. A., FACCINI, J. L. H., DAEMON, E., GRISI, L. Biologia comparativa da fase não parasitária de estirpes de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) resistente e sensível a carrapaticidas em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, n. 2, p. 79-84, 1993.

GODOI, C.R., SILVA, E.F.P. Carrapato *Boophilus microplus* e impacto na produção animal. Revisão de literatura **PUBVET**, v. 3, n. 22, p.92, 2009.

GOLDS, T. J., EIBL, C., KOOP, H. U. Green Factory: Recombinant Protein Production in Chloroplasts. **BIOforum Europe, GIT VERLAG GmbH & Co. KG**, Alemanha, p. 32-34, 2004.

GONZALES, J. C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 101p., 1974.

GRAÇA-SOUZA, A., MAYA-MONTEIRO, C., PAIVA-SILVA, G. O., BRAZ, G. R. C., PAES, M. C., SORGINE, M. H. F., OLIVEIRA, M. F., OLIVEIRA, P. L. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 322–335, 2006.

GRECO, R., MICHEL, M., GUETARD, D., Cervantes-Gonzalez, M., Pelucchi, N., Wain-Hobson, S., SALA, F., SALA, M. Production of recombinant HIV-1/HBV virus-like particles in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants for a bivalent plant-based vaccine. **Vaccine**, v. 25, p.8228–8240, 2007.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p. 8-10, 2002.

HAYS, J. B. *Arabidopsis thaliana*, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. **DNA Repair**, v. 1, p. 579–600, 2002.

HEIMERDINGER, A., OLIVO, C. J., MOLENTO, M. B., AGNOLIN, C. A., ZIECH, M. F., SCARAVELLI, L. F. B., SKONIESKI, F. R., BOTH, J. F., CHARÃO, P. S. Extrato alcoólico de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) no controle do *Boophilus microplus* em bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n.1, p. 37-39, 2006.

HERNÁNDEZ, C. M., MASSARD, C. L., SOARES, C. O., FONSECA, A. H. Alterações histológicas do trato digestivo de *Boophilus microplus* pela ação de anticorpos anti rBm 86. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 1, p. 33-37, 1997.

HERNÁNDEZ, M., CABRERA-PONCE, J. L., FRAGOSO, G., LÓPEZ-CASILLAS, F., GUEVARA-GARCÍA, A., ROSAS, G., LEÓN-RAMÍREZ, C., JUÁREZ, P., SÁNCHEZ-GARCÍA, G., CERVANTES, J., ACERO, G., TOLEDO, A., CRUZ, C., BOJALIL, R., HERRERA-ESTRELLA, L., SCIUTTO, E. A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. **Vaccine**, v. 25, p. 4252-4260, 2007.

HIATT, A. Cafferkey, R., Bowdish k. Production of antibodies in transgenic plants. **Nature**, v. 342, p. 76–78, 1989.

HIRAI, T., SATO. M., TOYOOKA, K., SUN, H. J., YANO, M., EZURA, H. Miraculin, a taste-modifying protein is secreted into intercellular spaces in plant cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 209–215, 2010.

HUANG, L. K., LIAO, S. C., CHANG, C. C., LIU, H. J. Expression of avian reovirus σ C protein in transgenic plants. **Journal of Virological Methods**, v.134, p.217- 222, 2006a.

HUANG, Z., SANTI, L., LePORE, K., KILBOURNE, J., ARNTZEN, C. J., MASON, H. S. Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice. **Vaccine**, v. 24, p. 2506-2513, 2006b.

INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v.96, n.1, p. 23-28, 1990.

JAMAL, A., KO, K., KIM, H. S., CHOO, Y. K., JOUNG, H., KO, K. Role of genetic factors and environmental conditions in recombinant protein production for molecular farming. **Biotechnology Advances**, n. 27, p. 914–923, 2009.

JOENSUU, J.J., VERDONCK, F., EHRSTRÖM, A., PELTOLA, M., SILJANDER-RASI, H., NUUTILA, A. M., OKSMAN-CALDENTEY, K. M., TEERI, T. H., COX, E., GODDEERIS, B. M., NIKLANDER-TEERI, V. F4 (K88) fimbrial adhesin FaeG expressed in alfalfa reduces F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* excretion in weaned piglets. **Vaccine**, v.24, p.2387 – 2394, 2006.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v.137, p. 1-10, 2006.

JONSSON, N. N., MATSCHOSS, A. L., PEPPER, P., GREEN, P. E., ANSELL, J. Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Veterinary Parasitology**, v.89, p. 297 – 305, 2000a.

JONSSON, N. N., MATSCHOSS, A. L., PEPPER, P., GREEN, P. E., ALBRECHT, M. S., HUNGERFORD, J., ANSELL, J. Evaluation of TickGARDPLUS, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein–Friesian cows. **Veterinary Parasitology**, v. 88, p. 275 – 285, 2000b.

JOUBÉS, J., SCHUTTER, K. D., VERKEST, A., INZÉ, D., VEYLDER, L. D. Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures. **The Plant Journal**, v.37, p. 889-896, 2004.

KARIMI, M., BLEYS, A., VANDERHAEGHEN, R., HILSON, P. Building blocks for plant gene assembly. **Plant Physiology**, v.145, p. 1183-1191, 2007b.

KARIMI, M., DEPICKER, A., HILSON, P. Recombinational Cloning with Plant Gateway Vectors. **Plant Physiology**, v.145, p. 1144-1154, 2007a.

KARIMI, M., INZÉ, D., DEPICKER, A. GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. **TRENDS in Plant Science**, v.7, n.5, p. 193-195, 2002.

KASHINO, S. S., RESENDE, J., SACCO, A. M. S., ROCHA, C., PROENÇA, L., CARVALHO, W. A., FIRMINO, A. A., QUEIROZ, R., BENAVIDES, M., GERSHWIN, L. J., DE MIRANDA-SANTOS, I. K. F. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. . **Experimental Parasitology**, v. 110, p. 12-21, 2005.

KHANDELWAL, A., LAKSHMI SITA, G., SHAILA, M. S. Oral immunization of cattle with hemagglutini protein of rinderpest virus expressed in transgenic peanut induces specific immune responses. **Vaccine**, v.21, p. 3282-3289, 2003.

KIM, T. G., KIM, M. Y., KIM, B. G., KANG, T. J., KIM, Y. S., JANG, Y. S., ARNTZEN, C. J., YANG, M. S. Synthesis and assembly of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). **Protein Expression & Purification**, v. 51, p. 22-27, 2007.

KIRK, D. D., MCLINTOSH, K., WALMSLEY, A. M., PETERSON, R. K. Risk analysis for plant-made vaccines. **Transgenic Research**, v. 14, p. 449–462, 2005.

KOBS, G. Isolation of RNA from Plant, Yeast and Bacteria. Promega Notes v.68, p. 28-31, 1998.

KONG, Q. RICHTER, L., YANG, Y. F., ARNTZEN, C. J., MASON, H. S., THANAVALA, Y.. Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.20, p.11539-11544, 2001.

KUSNADI, A. R., NIKOLOV, Z. L., HOWARD, J. A. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.56, n.5, p. 473-484, 1997.

LABRUNA, M. B., VERÍSSIMO, C. J. Observações sobre a infestação por *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bovinos mantidos em rotação de pastagem, sob alta densidade animal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 115-120, 2001.

LACORTE, C., LOHUIS, H., GOLDBACH, R., PRINS, M. Assessing the expression of chicken anemia virus proteins in plants. **Virus Research**, v.129, p. 80-86, 2007.

LAJOLO, F. M., NUTTI, M. R. **Transgênicos – Bases científicas da sua segurança**. São Paulo: SBAN, 112p. il., 2003.

LANDY, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of λ site-specific recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 913-949, 1989.

LARA, F. A., LINS, U., BECHARA, G. H., OLIVEIRA, P. L. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 3093-3101, 2005.

LEAL, A. T., POHL, P. C., FERREIRA, C. A. S., NASCIMENTO-SILVA, M. C. L., SORGINE, M. H. F., LOGULLO, C., OLIVEIRA, P. L., FARIAS, S. E. Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* *yolk* pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**, v. 45, p. 107-114, 2006a.

LEAL, A. T., SEIXAS, A., POHL, P. C., FERREIRA, C. A. S., LOGULLO, C., OLIVEIRA, P. L., FARIAS, S. E., TERMIGNONO, C., DA SILVA VAZ Jr., MASUDA, A. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* *Yolk* pro-

Cathepsin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, p. 341-345, 2006b.

LEGOCKI, A. B., MIEDZINSKA, K., CZAPLINSKA, M., PLUCIENICZAK, A., WEDRYCHOWICZ, H. W. Immunoprotective properties of transgenic plant expressing E2 glycoprotein from CSFV and cysteine protease from *Fasciola hepatica*. **Vaccine**, v.23, p.1844 – 1846, 2005.

LI, J. T., FEI, L., MOU, Z.R., WEI, J., TANG, Y, HE, H. Y., WANG, L., WU, Y. Z. Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. **Virology**, v. 356, p. 171-178, 2006.

LIJSEBETTENS, M. V., CLARKE, J. Leaf development in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 47-60, 1998.

LIMA, M. A. V. A. Ficha temática n. 4: Novos produtos e substâncias. **Material Didático Multimédia de Genética e Biotecnologia Vegetal**. www.institutovirtual.pt/edu-agri-biotec. Acesso em 25 de janeiro de 2007, hora: 10:30.

LINDH, I., WALLIN, A., KALBINA, I., SÄVENSTRAND, H., ENGSTRÖM, P., ANDERSON, S., STRID, A., Production of the p24 capsid protein from HIV-1 subtype C in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota* using an endoplasmic reticulum-directing SEKDEL sequence in protein expression constructs. **Protein Expression and Purification**, v. 66, p. 46–51, 2009.

LOGULLO, C., MORAES, J., DANSAPETRETSKI, M., VAZ JR. , I. S., MASUDA, A., SORGINE, M. H. F., BRAZ, G. R., MASUDA, H., OLIVEIRA, P. L. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p. 1805-1811, 2002.

LOPES, S., ARAIA, E. **Plantas transgênicas**. www.editorasaraiva.com.br/biosonialopes. Acesso em 14 maio, 2006. Hora: 19:35. 2006.

MA, J. K-C., DRAKE, P. M. W., CHARGELEGUE, D., OBREGON, P., PRADA, A. Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production. **Vaccine**, v. 23, p. 1814-1818, 2005.

MacRAE, A. F., PREISZNER, J., NG, S., BOLLA, R. I. Expression of His-tagged Shigella IpaC in *Arabidopsis*. *Journal of Biotechnology*, v.112, p. 247–253, 2004.

MARILLONNET, S., THOERINGER, C., KANDZIA, R., KLIMYUK, V., GLEBA, Y. Systemic *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. **Nature Biotechnology**. Published online: www.nature.com/biotechnology. 1-6. 2005.

MASON, H. S. LAM, D. M., ARNTZEN, C. J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, p. 11745 – 11749, 1992.

MAYA-MONTEIRO, C. M., ALVES, L. R., PINHAL, N., ABDALLA, D. S. P., OLIVEIRA, P. L. HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 81–87, 2004.

MEDEIROS, C. L., MENDONÇA, B. G., CYRINO, L. T., SOSSAI, S., Carvalho, G. D., PECONICK, A. P., PATARROYO, J. H. Elaboração e avaliação de um candidato à vacina de DNA, utilizando-se genes sintéticos derivados do peptídeo sbm7462 contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 30-34, 2008.

MEI, H., TAO, S., YUAN-GANG, Z., ZHI-GANG, A. Research Advances on Transgenic Plant Vaccines. **Acta Genetica sinica**, v.33, n.4, p. 285 – 293, 2006.

MINARÉ, REGINALDO. 2006. Qual o futuro da agricultura molecular no Brasil? www.anbio.org.br. Acesso em 10 de maio de 2006, hora: 20:30.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Estratégia Nacional de Biotecnologia – Política de Desenvolvimento da Bioindústria. **Fórum de Competitividade de Biotecnologia**. Brasília, 2006.

MODELSKA, A., DIETZSCHOLD, B., SLEYSH, N., STEPLEWSKI, K., HOOPER, D. C. Immunization against rabies with plant-derived antigen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.5, p. 2481-2485, 1998.

MURRELL, A., CAMPBELL, N. J. H., BARKER, S. C. Phylogenetic analyses of Rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.16, n.1, p. 1-7, 2000.

MURRELL, A., CAMPBELL, N. J. H., BARKER, S. C. A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 21, n. 2, p. 244-258, 2001.

NALIN, D. R. Evidence based vaccinology. **Vaccine**, v.20, p.1624 – 1630, 2002.

NEURATH, A. R., KENT, S. B. H. Requirements for successful synthetic peptide vaccines. **Anais Instituto Pasteur Virologia**, v.137E: p.513-514, 1986.

NUNES, E. T., BECHARA, G. H., SAITO, K. C., DENARDI, S. E., OLIVEIRA, P. R., MATHIAS, M. I. C. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). **Mícron**, v. 36, p. 437–447, 2005.

NUNES, E. T., MATHIAS, M. I. C., BECHARA, G. H. *Rhipicephalus(Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): Acid phosphatase and ATPase activities localization in salivary glands of females during the feeding period. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 109-117, 2006.

NUÑEZ. J. L., MUÑOZ, C. M. E., MOLTEDO, H. L. *Boophilus microplus*: La garrapata comum del ganado vacuno. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 184p., 1982.

NUTTALL, P. A., TRIMNELL, A. R., KAZIMIROVA, M., BABUDA, M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 155-163, 2006.

OLIVEIRA, R. C. Avaliação experimental do peptídeo sintético 4912 como imunógeno para o controle de carrapato *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887). **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 72p. 1998.

OLIVEIRA-SIQUEIRA, T. C. G., OLIVEIRA, M. C. S., ARAUJO Jr., J. P. AMARANTE, A. F. T. PCR- based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 105 – 111, 2005.

PAN, L., ZHANG, Y., WANG, Y., WANG, B., WANG, W., FANG, Y., JIANG, S., LV, J., WANG, W., SUN, Y., XIE, Q. Foliar extracts from transgenic tomato plants expressing the structural polyprotein, P1-2A, and protease, 3C, from foot-and-mouth disease virus elicit a protective response in guinea pigs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.121, p. 83-90, 2008.

PATARROYO, J. H. Babesiose bovina: controle de vetores com vacinas a base de peptídeos sintéticos. **Revista de Patologia Tropical**, v.23, p.145-146, 1994.

PATARROYO, J. H., PORTELA, R. W., DE CASTRO, R. O., COUTO PIMENTEL, J., GUZMAN, F., PATARROYO, M. E., VARGAS, M. I., PRATES, A. A., DIAS MENDES, M. A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 88, p. 163 – 172, 2002.

PATARROYO, J. H., Vargas, M.I., GONZÁLES, C. Z., GUZMÁN, F., MARTINS-FILHO, O. A., AFONSO, L. C. C., VALENTE, F. L., PECONICK, A. P., PATARROYO, A. M., SOSSAI, S. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462[®] against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 333-339, 2009.

PECONICK, A. P., SOSSAI, S., GIRÃO, F. A., RODRIGUES, M. Q. R., SOUZA E SILVA, C. H., GUZMAN, F., PATARROYO, A. M., VARGAS, M. I., PATARROYO, J. H. Synthetic vaccine (SBm7462[®]) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic

determinants in different strains from South America. **Experimental Parasitology**, v.119, p.37–43, 2008.

PEREIRA, M. C. ***Boophilus microplus*: Revisão Taxionômica e Morfo-Biológica**. Rio de Janeiro: Quimo Divisão Veterinária. 1982.

POLAR, P., KAIRO, M. T. K., MOORE, D., PEGRAM, R., JOHN, S. A. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. **Mycopathologia**, v. 160, p. 151-157, 2005a.

POLAR, P., MURO, M. A., KAIRO, M. T. K., MOORE, D., PEGRAM, R., JOHN, S. A., ROACH-BENN, C. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 159–167, 2005b.

PRABHAKAR, V., LOTTGERT, T., GIGOLASHVILI, T., BELL, K., FLUGGE, U. I., HAUSLER, R. E. Molecular and functional characterization of the plastid-localized Phosphoenolpyruvate enolase (ENO1) from *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, v. 583, n. 6, p. 983-991, 2009.

PRATA, M. C. A., FACCINI, J. L. H., DAEMON, E. Biologia da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) de origem caprina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 8, n. 2, p. 107-111, 1999.

PRUETT, J. H., UNTALAN, P. M., DAVEY, R. B. Identification and partial purification of serologically defined *Boophilus microplus* larval antigens by natural ectoparasite exposure. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p.148-157, 2006.

PUJOL, M., RAMÍREZ, N. I., AYALA, M., GAVILONDO, J. V., VALDÉS, R., RODRÍGUEZ, M., BRITO, J., PADILLA, S., GÓMEZ, L., REYES, B., PERAL, R., PÉREZ, M., MARCELO, J. L., MILÁ, L., SÁNCHEZ, R. F., PÁEZ, R., CREMATA, J. A., ENRÍQUEZ, G., MENDOZA, O., ORTEGA, M., BORROTO, C. An integral approach towards a practical application for a plant-made monoclonal antibody in vaccine purification. **Vaccine**, v. 23, p. 1833-1837, 2005.

RICE, J., AINLEY, W. M., SHEWEN, P. Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 2, p. 199–209, 2005.

RIGANO, M. M., ALVAREZ, M. L., PINKHASOV, J., JIN, Y., SALA, F., ARNTZEN, C. J., WALMSLEY, A. M. Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Rep**, v. 22, p. 502-508, 2004.

RIGANO, M. M., DREITZ, S., KIPNIS, A. P., IZZO, A. A., WALMSLEY, A. M. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine. **Vaccine**, v. 24, p. 691–695, 2006.

RODRIGUES, S. M. Expressão ectópica de um aldeído desidrogenase de soja em *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* confere tolerância a estresse abióticos. 80f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2005.

RODRÍGUEZ, M., RUBIERA, R., PENICHER, M., MONTESINO, R., CREMATA, J., FALCÓN, V., SÁNCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOBÉS, C., VALDÉS, M., LEONART, R., HERRERA, L., DE LA FUENTE, J. High-level expresión of the *Boophilus microplus* BM86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal of Biotechnology**, v. 33, p.135-146, 1994.

RUIZ, P. M. G., PASSOS, L. M. F., RIBEIRO, M. F. B. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. **Veterinary Parasitology**, n.128, p. 325 – 331, 2005.

RUNGE, C. F., RYAN, B. The Global Diffusion of Plant Biotechnology: International Adoption and Research in 2004. <http://www.apec.umn.edu/faculty/frunge/globalbiotech04.pdf>. Acesso em 13 de março de 2008, hora: 9:02. 2004.

RYBICKI, E. P. Plant-produced vaccines: promise and reality. **Drug Discovery Today**, v. 14, p. 16-24, 2009

SALES-JUNIOR, P. A., GUZMAN, F., VARGAS, M. I., SOSSAI, S., PATARROYO, A. M. V., GONZÁLEZ, C. Z. L., PATARROYO, J. H. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* synthetic vaccine SBm742. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.107, p. 281 – 290, 2005.

SAMISH, M., GLAZER, I. Entomophatogenic Nematodes for the biocontrol of ticks. **TRENDS in Parasitology**, v. 17, n. 8, p. 368-371, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequence with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. USA, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANGSTER, N. C. Managing parasiticidaes resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 98, p. 89 – 109, 2001.

SANTI, L., HUANG, Z., MASON, H. Virus-like particles production in green plants. **Methods**, v, 40, p. 66–76, 2006.

SANTOS, T. R. B., GONZALES, J. C., CHIES, J. M., FARIAS, N. A. R. Transmissão transovariana de *Babesia bigeminal*, (SMITH 7 KILBORNE, 1893)

por partenóginas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n. 1, p. 7-10, 1998.

SCHILLBERG, S., TWYMAN, R. M., FISHER, R. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants – technology assessment. **Vaccine**, v.23, p.1764 – 1769, 2005.

SHARMA, A. K., SHARMA, M. K. Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, n. 27, p. 811–832, 2009.

SHIN, S. M. H., DORAN, P. M. Foreign protein production using plant cell and organ cultures: Advantages and limitations. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 1036–1042, 2009.

SINGH, N. K. GHOSH, S. Experimental immunization of crossbred cattle with glycoproteins isolated from the larvae of *Hyalomma anatolicum* and *Boophilus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 31, p. 297 – 314, 2003.

SMITH, D. R., HUNGERFOD, J., WILLADSEN, J. The development of TickGard – a commercial vaccine against the cattle tick *R. (B.) microplus*. **Indooroopilly: Biotec Australia-CSIRO**, 17 p. 1995.

SOJIKUL, P., BUEHNER, N., MASON, H. S. A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. **Applied Biological Sciences**, v.100, n.5, p. 2209 – 2214, 2003.

SOSSAI, S. Expressão de quatro peptídeos recombinantes derivados do peptídeo sintético SBm7462 em *Pichia pastoris* e avaliação da resposta imunológica induzida em camundongos. **Tese (doutorado). Viçosa: UFV**, 96p. 2009.

SOSSAI, S., PECONICK, A. P., SALES-JUNIOR, P. A., MARCELINO, F. C., VARGAS, M. I., NEVES, E. S., PATARROYO, J. H. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental & Applied Acarology**, v. 37, p. 199–214, 2005.

STREATFIELD, S. J. HOWARD, J. A. Plant-based vaccines. **International Journal for Parasitology**, v.33, p. 479 – 493, 2003.

STREATFIELD, S. J. Oral hepatitis B vaccine candidates produced and delivered in plant material. **Immunological and Cell Biology**, v. 83, p. 257-262, 2005a.

STREATFIELD, S. J. Plant-based vaccines for animal health. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, v. 24, n. 1, p. 189-199, 2005b.

STREATFIELD, S. J., LANE, J. R., BROOKS, C. A., BARKER, D. K., POAGE, M. L., MAYOR, J. M., LAMPHEAR, B. J., DREES, C. F., JILKA, J. M., HOOD, E. E., HOWARD, J. A. Corn as a protective system for human and animal vaccines. **Vaccine**, v.21, p. 812-815, 2003.

SUTHERST, R. W. The vulnerability of animal and human health to parasites under global change. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 933 - 948, 2001.

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**, n. 36, p. 193–200, 2006.

TAVARES, E. Maior controle de carrapatos em Goiás. **Revista Balde Branco**, v. 500, p. 69-72, 2006.

TAYLOR, M. A. Recent Developments in Ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**, v.161, p. 253-268, 2001.

The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v.408 p. 796-816, 2000.

TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI /Embrapa-CNPQ, 2v. (510; 354p.), il., 1999.

TRIMNELL, A. R., HAILS, R. S., NUTTALL, P. A. Dual action ectoparasite vaccine targeting “exposed” and “concealed” antigens. **Vaccine**, v. 20, p. 3560-3568, 2002.

TURNI, C., LEE, R. P., JACKSON, L. A. A comparasion of the immunosuppressive effects of salivary gland extracts from two laboratory strains of *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 833 – 838, 2004.

UMEZAWA, T., FUJITA, M., FUJITA, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Plant biotechnology**, .17, p. 113 -122, 2006.

VASCONCELOS, V. O., FURLONG, J., FREITAS, G. M., DOLINSKI, C., AGUILLERA, M. M., RODRIGUES, R. C. D., PRATA, M. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA Strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 94, p. 201–206, 2004.

VATHIPADIEKAL, V., UMASANKAR, P. K., PATOLE, M. S., RAO, M. Molecular cloning, over expression, and activity studies of a peptidic HIV-1 protease

inhibitor: Designed synthetic gene to functional recombinant peptide. **Peptides**, v. 31, p. 16–21, 2010.

VERÍSSIMO, C. J., OTSUK, I. P., ZEITLIN, A. Z., BECHARA, G. H. Infestação por carrapatos *Boophilus microplus* (acari: ixodidae) em vacas Jersey. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p. 630-632, 2004.

VERMELHO, A. B., PEREIRA, A. F., COELHO, R. R. R., SOUTO-PADRÓN, T. Práticas de Microbiologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 239 p., il., 2006.

WALBOT, V. A green chapter in book life. **Nature**, v.408, p.794-795, 2000.

WALMSLEY, A. M., ARNTZEN, C. J. Plant cell factories and mucosal vaccines. **Current Opinion Biotechnology**, v.14, p. 145-150, 2003.

WANG, L., WEBSTER, D. E., CAMPBELL, A. E., DRY, I. B., WESSELINGH, S. L., COPPEL, R. L. Immunogenicity of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 4/5 produced in transgenic plants. **International Journal of Parasitology**, v. 38, p. 103-110, 2008.

WHO, World Health Organization. Meeting report: WHO informal consultation on scientific basis for regulatory evaluation of candidate human vaccines from plants, Geneva, Switzerland, 24–25 January 2005. **Vaccine**, v. 24, p. 4271-4278, 2006.

WIGDOROVITZ, A., CARRILLO, C., DUS SANTOS, M. J., TRONO, K., PERALTA, A., GÓMEZ, M. C., RÍOS, R., FRANZONE, P. M., SADIR, A. M., ESCRIBANO, J. M., BORCA, M. V. Induction of a Protective Antibody Response to Foot and Mouth Disease Virus in Mice Following Oral or Parenteral Immunization with Alfafa Transgenic Plants Expressing the Viral Structural Protein VP1. **Virology**, v.255, p. 347-353, 1999.

WIKEL, S. K., ALARCON-CHAIDEZ, F. J. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. **Veterinary Parasitology**, v.101, p. 275–287, 2001.

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

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, v. 129, p. 367-387, 2004.

WILLADSEN, P. Tick control: Thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, v.138, p.161 -168, 2006.

WILLADSEN, P., JONGEJAN, F. Immunology of the Tick–Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. **Parasitology Today**, v.15, p.258-262, 1999.

WILLADSEN, P., RIDING, G. A., MCKENNA, R. V., KEMP, D. H., TELLAM, R. L., NIELSEN, J. N., LAHNSTEIN, J., COBON, G. S., GOUGH, J. M.

Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *R. (B.) microplus*. **Journal Immunology**, v.143, n.4, p.1346-1351, 1989.

WILLADSEN, P., SMITH, D., COBON, G., MCKENNA, R. Comparative vaccination of cattle against *R. (B.) microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. **Parasitology Immunology**, v.18, p. 241-246, 1996.

WU, H., SINGH, N. K., SCISSUM-GUNN, K., GIAMBRONE, J. J. Expression of immunogenic VP2 protein of infectious bursal disease virus in *Arabidopsis thaliana*. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 787-792, 2004.

YANG, Z. Q., LIU, Q. Q., PAN, Z. M., YU, H. X., JIAO, X. A. Expression of the fusion glycoprotein of newcasstle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. **Vaccine**, v. 25, p. 591-598, 2007.

ZANELLA, J. e SILVEIRA, O. Terceira Geração. www.unesp.br/aci/jornal/182/capa.htm. Acesso: 20 de outubro de 2008, hora: 9:43, 2008.

ZHANG, D., PIRTLE, I. L., PARK, S. J., NAMPAISANSUK, M., NEOGI, P., WANJIE, S. W., PIRTLE, R. M., CHAPMAN, K. D. Identification and expression of a new delta-12 fatty acid desaturase (FAD2-4) gene in upland cotton and its functional expression in yeast and *Arabidopsis thaliana* plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 462-471, 2009.

ZHANG, H. LIU, M., LI, Y., ZHAO, Y., HE, H., YANG, G., ZHENG, C. Oral immunogenicity and protective efficacy in mice of a carrot-derived vaccine candidate expressing UreB subunit against *Helicobacter pylori*. **Protein Expression and Purification**, v. 69, p. 127–131, 2010.