

GABRIEL ANDRES TAFUR GÓMEZ

**IMUNIZAÇÃO DE BOVINOS COM DOIS PEPTÍDEOS RECOMBINANTES
DERIVADOS DO PEPTÍDEO SBm7462[®]. RESPOSTA DE LINFONODOS E
ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO INTESTINO DO CARRAPATO
Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

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

T

T124i
2011
Tafur Gómez, Gabriel Andres, 1984-
Imunização de bovinos com dois peptídeos recombinates
derivados do peptídeo SBm 7462[®]: resposta de linfonodos e
alterações histológicas do intestino do carrapato
Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) /
Gabriel Andres Tafur Gómez. – Viçosa, MG, 2011.
xiv, 78f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Joaquín Hernan Patarroyo Salcedo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 69-78

1. Imunologia veterinária. 2. Proteínas recombinates.
3. Vacinas. 4. Carrapato - Controle.
5. *Rhipicephalus microplus*. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0896079

GABRIEL ANDRES TAFUR GÓMEZ

**IMUNIZAÇÃO DE BOVINOS COM DOIS PEPTÍDEOS RECOMBINANTES
DERIVADOS DO PEPTÍDEO SBm7462[®]. RESPOSTA DE LINFONODOS E
ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO INTESTINO DO CARRAPATO *Rhipicephalus*
(Boophilus) microplus (Canestrini, 1887)**

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

APROVADA: 21 de fevereiro de 2011.

Prof^a. Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Co-orientadora)

Dr. Sidimar Sossi
(Co-orientador)

Dr. John Furlong

Prof. Joaquin H. Patarroyo Salcedo
(Orientador)

*A mi familia,
Mis padres: Gloria y José Uriel.
Mis Hermanos: Fabián y Marcela.
A todos mis compañeros y amigos que han creído en mí.
Dedico este trabajo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por me apoiarem sempre, por acreditarem em mim. Aos meus irmãos, por estarem sempre me apoiando de várias maneiras.

À Universidade Federal de Viçosa, pelo ensino oferecido e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos professores *Joaquín Patarroyo* e *Marlene*, pela amizade, confiança, paciência, colaboração e a importante orientação durante o decorrer do meu mestrado.

À minha estagiária *Vanessa*, pela disponibilidade e vontade de me ajudar e trabalhar, inclusive nos momentos mais difíceis.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária, que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, principalmente ao *José de Oliveira, Adão, Claudio* e *Cauzinho*.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia e controle de hematozoários e Vetores (BIOAGRO) *Sidimar Sossai, Elizangela, Ana Paula, Karlos, Stephany, Isabela, Leandro, Vitor* e *Marcinho*, pela amizade e ajuda em cada momento.

Também agradeço a todos os meus amigos e companheiros que sempre acreditaram em mim, por sua presença, fortaleza e apoio que tornaram agradável cada momento como também o trabalho realizado.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE GRÁFICOS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPITULO I.....	3
RESPOSTA IMUNE CELULAR EM LINFONODOS DE BOVINOS IMUNIZADOS COM DOIS PEPTÍDEOS RECOMBINANTES DERIVADOS DO PEPTÍDEO SINTÉTICO Sbm7462 [®] EXPRESSOS EM <i>Pichia Pastoris</i>	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1. carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> e suas implicações	7
2.2. Vacinas anti <i>R. microplus</i>	9
2.3. A vacina sintética SBm7462 [®]	11
2.4. A vacinas recombinantes <i>rBmseq1</i> e <i>rBmseq4</i>	14
2.5. Sítios de glicosilação e resposta imune	15
2.6. Papel dos agregados protéicos na resposta imune	16
2.7. Resposta imune em linfonodos.....	18
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Animais Utilizados.....	22
4.2. Imunógenos	22
4.3. Esquema de imunização	23
4.4. Histologia dos linfonodos de bovinos	23
4.5. Imunohistoquímica para identificação do antígeno vacinal <i>in situ</i>	24
4.6. Análise estatística	25

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1.	Avaliação histológica dos linfonodos pré-escapulares	26
5.2.	Imunohistoquímica para detecção dos peptídeos <i>rBmseq1</i> e <i>rBmseq443</i>	43
6.	CONCLUSÕES.....	49
CAPITULO II.....		50
ALTERAÇÕES HISTOLOGICAS DO CARRAPATO <i>Rhipicephalus microplus</i> (Canestrini, 1887) INDUZIDAS POR DOIS PEPTÍDEOS RECOMBINANTES DERIVADOS DO PEPTÍDEO SINTETICO SBm7462®		50
1.	INTRODUÇÃO	52
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	54
3.1.	Relação hospedeiro-parasita	54
3.2.	Indução de alterações intestinais com antígenos ocultos	56
3.3.	A vacina recombinante rSBm7462	57
3.	OBJETIVOS	58
3.4.	Objetivo geral.....	58
3.5.	Objetivos específicos	58
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1.	Desafio	59
4.2.	Histologia do intestino de carrapatos	59
4.3.	Imunoperoxidase Indireta para detecção de anticorpos anti-proteína Bm86 em cortes de intestino de teleóginas	60
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1.	Alterações histológicas no epitélio intestinal de <i>R. microplus</i>	62
5.2.	Imunoistoquímica para detecção de anticorpos <i>in situ</i>	65
6.	CONCLUSÕES.....	68
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS		69

LISTA DE FIGURAS

	Página.
Figura 1. Microfotografia de linfonodos de Bovinos. H&E. Barra de escala de 50 μ m. (A) Folículos linfóides 7 dias após imunização com <i>rBmseq1</i> . (B) CM 7 dias após imunização com <i>rBmseq1</i> . (C) Centro germinal (CG) 15 dias após imunização com <i>rBmseq1</i> . (D) CM 15 dias após imunização com <i>rBmseq1</i> . (E) Folículos linfóides sem imunização. (F) Cordões medulares (CM) sem imunização.	27
Figura 2. Microfotografia de linfonodos de Bovinos. H&E. Barra de escala de 50 μ m (A) região paracortical 15 dias após imunização com <i>rBmseq4</i> . (B) Cordões medulares (CM) 15 dias após imunização com <i>rBmseq4</i> . (C) Centro Germinal (CG) 35 dias após imunização com <i>seq4</i> . (D) CM 35 dias após imunização com <i>seq4</i> . (E) CG 45 dias após imunização com <i>rBmseq4</i> . (F) CM 45 dias após imunização com <i>rBmseq4</i> .	33
Figura 3. Microfotografia de linfonodos de Bovinos imunizados com <i>rBmseq1</i> . H&E. Barra de escala de 50 μ m. (A) Centro germinal (CG) 35 dias após imunização. (B) Cordões medulares (CM) 35 dias após imunização. (C) Detalhe CG 35 dias após imunização. (D) Detalhe CM 35 dias após imunização. (E) CG 45 dias após imunização, 320 μ m. (F) CM 45 dias após imunização.	35
Figura 4. Microfotografia de linfonodos de Bovinos imunizados com <i>rBmseq4</i> . H&E. Barra de escala de 50 μ m. (A) Centro Germinal (CG) 65 dias após imunização. (B) Cordões medulares (CM) 65 dias após imunização. (C) Centro Germinal (CG) 75 dias após imunização. (D) CM 75 dias após imunização. (E) Detalhe CG 75 dias após imunização. (F) Detalhe CM 75 dias após imunização.	38
Figura 5. Microfotografia de linfonodos de Bovinos imunizados com <i>seq1</i> . H&E. H&E. Barra de escala de 50 μ m. (A) Centro germinal (CG) 65 dias após imunização. (B) Cordões medulares (CM) 65 dias após imunização, 320 μ m. (C) CG 72 dias após imunização. (D) CM 72 dias após imunização.	42

- Figura 6. Microfotografia de linfonodos bovinos imunizados com *rBmseq1* pela técnica Peroxidase – Anti – Peroxidase (PAP). Barra de escala de 50 µm. (A) Células PAP em Centro Germinal (CG) sete dias após imunização. (B) Células PAP em Cordões Medulares (CM) sete dias após imunização. (C) Células PAP na região Paracortical (PC) 35 dias após imunização. (D) Células PAP na região PC 65 dias após imunização. (E) Células PAP em (CM) 65 dias após imunização. (F) Controle negativo. 44
- Figura 7. Microfotografia de linfonodos bovinos imunizados com *rBmseq4* pela técnica Peroxidase – Anti – Peroxidase (PAP). Barra de escala de 50 µm. (A) Células PAP na região paracortical 15 dias após imunização. (B) Células PAP em Cordões Medulares (CM) 15 dias após imunização. (C) Células PAP em Centro Germinal (CG) 35 dias após imunização. (D) Células PAP na região paracortical 65 dias após imunização. (E) Células PAP em CM 35 dias após imunização. (F) Controle negativo. 45
- Figura 8. Epitélio intestinal de *Rhipicephalus microplus*, coloração de Giemsa lento. Barra de escala de 50 µm. (A) sem decorrência da resposta imune. (B) Células intestinais após imunização com *rBmseq1*. (C) Células intestinais após imunização com *seq4*. (D) Detalhe das células intestinais após imunização com *rBmseq4*. (1) Desprendimento de núcleo. (2) Vacuolização citoplasmática. (3) Erosão de membrana basal. (4) Erosão celular. (5) Perda de núcleo celular. (6) Cromatólise (7) Debris celulares. 64
- Figura 9. Epitélio intestinal de *R. microplus* pela técnica de H&E. Barra de escala de 50 µm. (A) sem decorrência da resposta imune. (B) células intestinais após imunização com *rBmseq1*. (C) Células intestinais após imunização com *rBmseq4*. (1) Erosão de membrana basal. (2) Erosão celular. (3) Desprendimento de núcleo. 66
- Figura 10. Epitélio intestinal de *R. microplus* pela técnica de Imunoperoxidase indireta. Barra de escala de 50 µm. (A) Células intestinais de *R. microplus* com soro de bovinos sem imunização. (B) Imunomarcção de células intestinais de *R. microplus* com soro de bovinos imunizados com *rBmseq1*. (C) Imunomarcção de células intestinais de *R. microplus* com soro de bovinos imunizados com *rBmseq4*.

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Histomorfometria de Centros Germinais (CG) com campo de 640µm de linfonodos de bovinos. Média de diâmetros e desvios padrões de CG após imunização com <i>rBmseq1</i> ..	36
Gráfico 2. Histomorfometria de Centros Germinais (CG) com campo de 640µm de linfonodos de bovinos. Média de diâmetros e desvios padrões de CG após imunização com <i>rBmseq4</i> .	37
Gráfico 3. Histomorfometria de Centros Germinais (CG) com campo de 640µm de linfonodos de bovinos, após segunda imunização com estrato bruto de <i>Pichia pastoris</i> .	43

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: Microgramas
µL: Microlitros
µm: Micrômetros
µM: Micromolar
APCs: Antigen presentation cells
B.O.D.: Estufa microprocessada
BIOAGRO: Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária
Bm86: Glicoproteína intestinal isolada de uma amostra de carrapato
Bm95: Proteínas similar a Bm86
CD: *Cluster differentiation*
CGs: centros germinativos
CM: Cordões Medulares
DAB: Diaminobenzedina
DCs: *Dendritic cells*
DNA: Ácido desoxirribonucléico
DVT: Departamento de Veterinária
EGF: fator de crescimento epidérmico
FAO: *Food and Agriculture Organization*
FRC: Celulas reticulares foliculares
g: gramas
H&E: Hematoxilina-eosina
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HEV: Veia endotelial alta
IFN-γ: Interferon gamma
IgG: Imunoglobulina G
IL-2, 4, 10: Interleucinas 2, 4 e 10, respectivamente
INF-γ: Interferon gama
IPI: Immunoperoxidase indireta
kDa: Kilodaltons
LBCHV: Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores
mg: Miligrama
MgSO₄: Sulfato de magnésio
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
Milli – Q: água super purificada.
Na₂HPO₄: Fosfato de sódio monohidratado
Na₂S₂O₃: Tiosulfato de sódio
NaCl: Cloreto de sódio
NaH₂PO₄: Fosfato de sódio diidratado
NaHCO₃: Bicarbonato de sódio
ng: Nanogramas
°C: Graus centígrados
PAP: Peroxidase-anti-peroxidase
pb: Pares de bases
PBs: células plasmáticas de curta duração
PBS: Tampão fosfato de sódio
PCs: células plasmáticas de longa duração

pH: Potencial hidrogeniônico
pK: Ponto isoelétrico de proteínas
PLGA: Poliésteres derivados dos ácidos láctico e glicólico
pMHC: Peptido no complexo principal de histocompatibilidade
rBm7462: Peptídeo recombinante derivado da SBm7462®
SBm7462®: Vacina sintética derivada da proteína Bm86
SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
T reg: Célula T reguladora
TCR: T cell receptor
TGF-β: Fator de Crescimento Tumoral Beta
Th: Células T ajudadoras
Tαβ: Célula T alfa - beta
Tγδ: Célula T gamma - delta
UFV: Universidade Federal de Viçosa
WC: *Workshop cluster*

RESUMO

TAFUR GÓMEZ, Gabriel Andres M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Imunização de bovinos com dois peptídeos recombinantes derivados do peptídeo sbm7462[®]. Resposta de linfonodos e alterações histológicas do intestino do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (canestrini, 1887)** Orientador: Joaquín Hernan Patarroyo Salcedo. Co-orientadores: Marlene Isabel Vargas Vilorio e Sidimar Sossai.

Devido à sua capacidade de transmitir diversos agentes infecciosos, os carrapatos são importantes para a saúde pública e a produção animal. Dentre estes se destaca o carrapato *Rhipicephalus microplus*, responsável por perdas econômicas nos países das regiões tropicais e subtropicais. Entre as medidas de controle deste ectoparasito, o controle imunológico se tornou uma alternativa viável, que além de não gerar populações de carrapatos resistentes oferece inocuidade aos produtos de origem animal. A vacina sintética SBm7462[®], cuja eficácia já foi demonstrada em bovinos, contém três epítomos imunogênicos (4822, 4824 e 4823) derivados da proteína Bm86. Análises genéticas mostraram que o fragmento correspondente ao peptídeo SBm7462[®] está conservado nas populações do *R. microplus* de diferentes regiões da América do Sul. Para avaliar os eventos de imunidade celular em bezerros e as alterações histológicas em fêmeas do *R. microplus*. Previamente foram desenhados e construídos dois genes que se expressaram na levedura *Pichia pastoris* cepa Km71. O gene *rBmseq1* foi desenhado para produzir os epítomos imunogênicos em *tandem* e o gene *rBmseq4* para produzir a sequência sem repetições. Os peptídeos expressos se recuperaram do meio extracelular e se caracterizaram por SDS-PAGE e *Western blotting*. Esses peptídeos recombinantes foram inoculados três vezes com intervalos de 30 dias em 4 bezerros *Bos taurus taurus*, na dose de 2 mg mais 1,5 mg de saponina. Em seguida, os linfonodos foram coletados e processados para análise

histológica. Os cortes foram submetidos à coloração por Hematoxilina-eosina (H&E) e imunistoquímica por peroxidase - anti - peroxidase (PAP), demonstrando que foi induzida uma resposta T- dependente, com desenvolvimento da imunidade nos animais imunizados. Além disso, se observaram claras estruturas que conferem afinidade e imunidade nos animais inoculados com o *rBmseq4*. Aos 21 dias após a última imunização, foi feito o desafio com 4500 larvas de *R. microplus* por animal. Com o começo da caída das fêmeas aos 21 dias, foram escolhidas, aleatoriamente, teleóginas de cada grupo. As fêmeas do *R. microplus*, alimentadas em bovinos do grupo *rBmseq1* apresentaram conservação da integridade do epitélio intestinal, similar ao grupo controle. No entanto, alças intestinais de teleóginas, alimentadas em bovinos do grupo *rBmseq4* mostraram desnudamento da membrana basal e erosão celular. Demonstrou-se que o peptídeo *rBmseq4* possui maior capacidade de gerar uma resposta imune com habilidade para induzir reações adversas nos carrapatos *R. microplus*.

ABSTRACT

TAFUR GOMEZ, Gabriel Andres M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Cattle immunization with two recombinant peptides derived from peptide SBm7462[®]. Lymph node response and gut histological changes of tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887).** Adviser: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo. Co-adviser: Marlene Isabel Vargas Vilorio and Sidimar Sossai.

Ticks are important to public health and animal production because of their ability to transmit various infectious agents. Among ticks, *Rhipicephalus microplus* is responsible for economic losses in tropical and subtropical countries. Among the ways to control this ectoparasite, the immune option is viable, which doesn't generate resistant tick populations and offers safety to the animal products. The synthetic vaccine SBm7462[®] contains three immunogenic epitopes (4822, 4824 and 4823) derived from the Bm86 protein. Genetic analysis showed that the fragment corresponding to the SBm7462[®] is conserved in the population of *R. microplus* from different regions on South America. To evaluate the events of cellular immunity in calves and histology changes in female *R. microplus*. Previously were designed and constructed two genes expressed in *Pichia pastoris* Km71 strain. The *rBmseq1* gene was designed to express immunogenic epitopes in tandem and *rBmseq4* gene designed expressed this without repetitions. The recombinant peptides were recovered from the extracellular medium and were characterized by SDS-PAGE and Western blotting. These peptides were inoculated three times at intervals of thirty days in five *Bos taurus taurus* calves at doses of 2 mg plus 1.5 mg saponin. Afterwards, the lymph nodes were collected and processed histologically. Histological sections were stained by (H&E) and immunohistochemical staining for

peroxidase-anti-peroxidase (PAP). It was shown that they developed a T-dependent response with immunity induction in animals immunized. Hence, showed clear structures which confers immunity and affinity in animals immunized with *rBmseq4*. However, 21 days after the last immunization, the challenge was made with *R. microplus* 4500 larvae per animal. At 21 days with the beginning of fallen females, these were randomly selected from each group. *R. microplus* females fed on animal's *rBmseq1* group showed integrity of the intestinal epithelium, similar to control group. However, guts of ticks fed on animal's *rBmseq4* group showed denudation and erosion of basal membrane cell. It demonstrates the peptide *rBmseq4* peptide has a great ability to generate immune responses which induce adverse reactions in *R. microplus*.

INTRODUÇÃO GERAL

Pela capacidade de transmitir agentes infecciosos, os carrapatos merecem importância tanto para a saúde pública como para a produção animal. Dentre os artrópodes de maior importância na medicina veterinária, destaca-se o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, responsável por perdas econômicas nos países das regiões tropicais e subtropicais. A dependência exclusiva de compostos químicos para o controle do *R. (B.) microplus* tornou-se uma das maiores preocupações científicas e econômicas da atualidade, como consequência, pesquisas para o desenvolvimento de vacinas vêm adquirido grande relevância.

Buscando uma forma alternativa para o controle do parasito, foi desenvolvida a vacina sintética anti *R.(B.) microplus* (SBm7462[®]). Esta vacina contém determinantes imunogênicos da proteína do intestino do carrapato, a Bm86. Quando usada em conjunto com saponina e testada sobre bovinos de várias raças, este imunógeno alcançou uma eficácia de 81,05%, tendo como parâmetros redução no número e do peso de fêmeas adultas, redução do peso médio dos ovos e diminuição da fertilidade (PATARROYO, *et al.* 2002).

Para diminuir os empecilhos da síntese química de peptídeos, a produção recombinante do peptídeo SBm7462[®], por fermentação em leveduras *Pichia pastoris*, se apresenta como uma estratégia promissória para garantir grandes volumes vacinais por baixo custo. Com tudo, no presente estudo os peptídeos recombinantes dos clones *rBmseq1* e *rBmseq4* derivados do peptídeo SBm7462[®], obtidos através de processos fermentativos em *P. pastoris*, foram empregados para avaliar os eventos de resposta imune

induzidos em bovinos *Bos taurus taurus*. Depois, foram analisadas as alterações histológicas em *R. (B) microplus* provocadas pela decorrência da resposta imune ao parasitar os bovinos imunizados.

CAPITULO I

RESPOSTA IMUNE CELULAR EM LINFONODOS DE BOVINOS IMUNIZADOS COM DOIS PEPTÍDEOS RECOMBINANTES DERIVADOS DO PEPTÍDEO SINTÉTICO Sbm7462[®] EXPRESSOS EM *Pichia Pastoris*.

TAFUR GÓMEZ, Gabriel Andres M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Imunização de bovinos com dois peptídeos recombinantes derivados do peptídeo sbm7462[®]: resposta de linfonodos e alterações histológicas do intestino do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus (canestrini, 1887)*** Orientador: Joaquín Hernan Patarroyo Salcedo. Co-orientadores: Marlene Isabel Vargas Vilorio e Sidimar Sossai.

RESUMO– O *Rhipicephalus microplus* é o principal ectoparasito de importância médico veterinária, estando aproximadamente 80% dos rebanhos bovinos do mundo se encontram expostos ao artrópode. É responsável por perdas no mundo e no Brasil superiores aos oito e dois bilhões de dólares anuais, respectivamente. Com a descoberta dos *Concealed antigens*, incluindo a glicoproteína Bm86, demonstrou-se que a vacinação com estes antígenos podem gerar uma resposta imune protetora em bovinos contra *R. microplus*. A vacina sintética SBm7462[®], cuja eficácia já foi demonstrada em bovinos, contém três epítopos imunogênicos (4822, 4824 e 4823) derivados da proteína Bm86. Análises genéticas mostraram que o fragmento correspondente ao peptídeo SBm7462[®] está conservado nas populações do *R. microplus* de diferentes regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. Para avaliar os eventos de imunidade celular em bezerros foram construídos dois genes sintéticos com base na sequência do peptídeo SBm7462[®] que se expressaram na levedura *Pichia*

pastoris cepa Km71. O gene *rBmseq1* foi desenhado com os epítomos imunogênicos repetidos três vezes e o gene *rBmseq4* com a mesma sequência sem repetições. Os peptídeos expressos foram recuperados do meio extracelular, sendo caracterizados por SDS-PAGE e *Western blotting*. Esses peptídeos recombinantes foram inoculados em quatro bezerros *Bos taurus taurus*, na dose de 2 mg mais 1,5 mg de saponina por três vezes com intervalos de 30 dias. Os linfonodos foram coletados e processados histologicamente, os respectivos cortes histológicos foram submetidos à coloração por Hematoxilina-eosina (H&E) e imunistoquímica por peroxidase-anti-peroxidase (PAP). Quinze dias após a primeira imunização, os grupos vacinais *rBmseq1* e *rBmseq4* se destacaram pela presença de hiperplasia nas regiões paracorticais e pouca formação de centros germinais (CGs). Aos 35 dias após a primeira imunização, se evidencia nos grupos vacinais, alta formação de folículos com CGs, os quais se diferenciaram em regiões claras e escuras, obtendo-se maior reatividade do grupo *rBmseq4*. Ao mesmo tempo foram observadas células PAP positivas em menor preponderância na região paracortical e com maior marcação nos cordões medulares, especialmente no grupo *rBmseq4*. Conclui-se, que existe uma resposta T-dependente preponderante, com desenvolvimento da imunidade nos animais inoculados com o produto da *rBmseq4*.

1. INTRODUÇÃO

O processo de vacinação permanece como o método mais efetivo para prevenir diferentes tipos de infecções, e representa a contribuição mais proeminente da imunologia para a saúde pública. As vacinações realizadas com sucesso no decorrer da história da humanidade, demonstram a significância desta ferramenta para aumentar a qualidade de vida, assim como a oferta de proteína animal. Além disso, a vacinação se coloca como uma alternativa importante para prevenir parasitoses causadas por protozoários e ectoparasitos.

A idéia de que a imunidade naturalmente adquirida envolve diversos mecanismos sem excluir o repertório de possibilidades imunes, fez com que a pesquisa de antígenos vacinais contra *R. microplus* se voltasse para a procura de antígenos ocultos (*concealed antigens*). A exposição natural das diferentes formas de interação carrapato-hospedeiro, além de não prevenir as alterações sobre o hospedeiro, é incapaz de gerar imunidade adquirida. Com base nessa idéia, foi possível obter imunidade contra *R. microplus* após imunização com antígenos provenientes do intestino médio do ectoparasito (OPDEBEECK *et al.*, 1988). Depois, vários antígenos ocultos derivados do intestino de *R. microplus* foram identificados, dentre estes se destacam Bm86, Bm91, Bm95 e BmPRM, que já foram utilizados de maneira separada ou conjunta (DE LA FUENTE & KOCAN, 2006; NUTTALL *et al.*, 2006).

Os estudos vacinais contra *R. microplus* foram estabelecidos com base nas glicoproteínas Bm86 e Bm95, as quais, foram produzidas em massa sob sistemas de recombinação baseados tanto em *Echerichia coli* como em *Pichia pastoris*. No entanto, diferentes graus de proteção e eficácia com

várias amostras de *R. microplus* foram reportados, a variabilidade na sequência das proteínas entre diferentes amostras de carrapatos foi relacionada com a eficácia variável dessas vacinas (DE LA FUENTE *et al.*, 2000; SOSSAI *et al.*, 2005).

Por meio da predição computacional de sítios imunogênicos da proteína Bm86, PATARROYO *et al.* (2002), descreveram os epítomos 4822, 4824 e 4823, que levaram ao desenvolvimento do peptídeo SBm7462[®], formado por 43 aminoácidos e massa molecular de 5,5 KDa, correspondente ao 6,6% da proteína Bm86. Posteriores análises genéticas mostraram, que o fragmento correspondente ao peptídeo SBm7462[®] encontra-se conservado nas diferentes populações de *R. microplus* das regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (SOSSAI *et al.*, 2005; PECONICK *et al.*, 2008). A capacidade imunogênica do peptídeo SBm7462[®] foi demonstrada em bovinos quando se geraram anticorpos protetores (IgG1) com eficácia vacinal variando, nos estudos realizados na espécie alvo, de 53% a 81%, dependendo de como o experimento foi delineado (COUTO-PIMENTEL, 2002; PATARROYO *et al.*, 2002).

Visando resolver as dificuldades da síntese química de proteínas, foram construídos quatro genes sintéticos com base na sequência de epítomos do peptídeo SBm7462[®] (4822, 4824 e 4823). Esses genes foram otimizados para a expressão protéica na levedura *Pichia pastoris* cepa Km71. Os peptídeos recombinantes produzidos por fermentação em *P. pastoris* demonstraram capacidade de induzir eficientemente uma resposta imune T-dependente em animais experimentais (SOSSAI, 2009; TAFUR, 2008), o que permite dar continuidade as análise da resposta imune em bovinos. No presente estudo os peptídeos recombinantes dos clones *rBmseq1* e *rBmseq4* derivados do peptídeo SBm7462[®], obtidos através de processos fermentativos de *P. pastoris*, foram utilizados para avaliar os eventos de imunidade celular envolvidos em bovinos *Bos taurus taurus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Carrapato *Rhipicephalus microplus* e suas implicações

Postula-se que os carrapatos membros da família Ixodidae desenvolveram-se como parasitos obrigatórios de répteis em climas quentes e úmidos. Supõe-se que quando esses répteis ramificaram-se em numerosas formas de vida, preenchendo nichos aquáticos e terrestres, seus carrapatos mais primitivos evoluíram em duas principais famílias, Argasidae e Ixodidae (HOOGSTRAAL, 1985).

Mesmo o *R. microplus* não sendo de origem autóctone, ou seja, um artrópode naturalmente originado do continente americano, os cinco séculos que tem transcorrido desde sua possível chegada, com os primeiros animais dos colonizadores europeus, permitiu desenvolver um alto grau de adaptação ao ambiente, se tornando em pragas para muitos países do continente. Este está amplamente distribuído no norte da Argentina, Paraguai, Uruguai, leste da Bolívia, Colômbia e Venezuela, além do Brasil, com especial atenção às regiões Sudeste e Centro-Oeste e toda a costa brasileira, obviamente pelas boas condições de umidade e temperatura e pela exploração pecuária mais intensa (ESTRADA – PEÑA, 1999).

O gênero *Boophilus* compreende carrapatos monoxenicos. É originário do sudeste da Ásia e, através do tráfego de bovinos entre os continentes, foi amplamente espalhado pelo mundo. Trabalhos moleculares para estudo de filogenia têm demonstrado que o gênero *Boophilus* é parafilético com os carrapatos do gênero *Rhipicephalus*, levando alguns autores a proporem a mudança de classificação, passando de *Boophilus microplus* para *Rhipicephalus microplus* (MURREL *et al.*, 2000; MURREL *et al.*, 2001; OIE,

2007) e adotando a seguinte classificação taxonômica, atualizada de SONENSHINE (1991):

Filo: Arthropoda
Classe: Arachnida
Ordem: Parasitiformes
Subordem: Ixodida
Familia: Ixodidae
Subfamilia: Rhipicephalinae
Genero: *Rhipicephalus*
Sub-Genero: *Boophilus*
Especie: *Rhipicephalus microplus*

Levantamento, realizado pelo ministério da agricultura no ano de 1983, demonstrou que o carrapato *R. microplus* está presente em 96% dos municípios informantes (75,37% dos municípios brasileiros), sendo muito frequente em 80% deles (BRASÍLIA, 1985).

Os prejuízos causados pelo *R. microplus* são evidenciados pela ingestão de fluidos corporais podendo ingerir entre 0,5 a 3,0 mL de sangue, perdas na qualidade do couro, devido cicatrizes irreversíveis, ocasionadas durante a alimentação e transmissão de agentes patogênicos como *Babesia bovis* e *B. bigemina*; tendo, também, a participação na epidemiologia de *Anaplasma marginale* e da *Theileria equi* em equinos (PATARROYO, 1994, GUIMARÃES *et al.*, 1998; GOMES, 2000).

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), os prejuízos causados pela infestação por carrapatos e as doenças, por eles transmitidas, ultrapassam 8 bilhões de dólares anuais. No Brasil, estudos realizados por GRISI *et al.* (2002), indicaram prejuízos da ordem de 2 bilhões de dólares anuais. Na Argentina, país que adotou uma campanha

nacional de erradicação do carrapato bovino, as perdas superam 100 milhões de dólares anuais (SIGNORINI, 1991). No México, calcularam em 30 kg de carne por animal/ano (WOODHAN *et al.* 1983). É estimado que cada teleógina seja responsável pela queda de produção diária de 8,9 mL de leite e de 1,0 g de peso corporal (JONSSON *et al.* 1998).

O controle do *R. microplus* se processa quase que exclusivamente, pela utilização de produtos químicos durante a sua fase parasitária, o que corresponde a apenas a 5% do total da população de carrapatos no ambiente (FURLONG, 1998; FRISCH, 1999).

O uso de acaricidas sem critérios pré-estabelecidos tem levado a um interminável aparecimento de carrapatos resistentes a essas drogas. Com o aparecimento de resistência para uma classe de acaricidas, tentou-se aliviar o problema com a introdução no mercado de uma nova classe, havendo hoje cepas de *R. microplus* resistentes a muitas classes de acaricidas, sendo isto um dos principais limitações para a pecuária bovina (GEORGE *et al.*, 2009).

Dentre alternativas para o controle do carrapato *R. microplus*, encontram-se a utilização de pastagens que agem na fase não parasitária do parasito (THOMPSON *et al.*, 1978), emprego de predadores naturais (LIPA, 1971; DE LA VEGA *et al.*, 1982; BRANCO *et al.*, 1987), cruzamentos interespecíficos para geração de machos inférteis e vacinas (WILLADSEN *et al.*, 1996; RODRIGUEZ *et al.*, 1994; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000; PATARROYO *et al.*, 2002).

2.2. Vacinas anti *R. microplus*

Em 1989, foi isolada e purificada uma proteína intestinal da cepa australiana Yeerongpilly que gerava as mesmas patologias no intestino de *R. microplus* que os extratos brutos do parasito, quando estes artrópodes se alimentavam sobre bovinos imunizados (WILLADSEN *et al.*, 1989). Essa

proteína foi denominada Bm86, com peso estimado de 89 kDa e p.I de 5,5. Entre tanto, RAND *et al.* (1989) clonaram e sequenciaram o gene dessa proteína, caracterizando as sequências nucleotídicas e aminoacídicas, além disso, foi determinado que essa proteína estava composta por 650 aminoácidos (aa), revelando muitas similaridades entre algumas de suas regiões com precursor do fator de crescimento epidérmico (EGF) e outras repetições tipo EGF. Também, WILLADSEN *et al.* (1989) acrescenta que a glicoproteína pode se encontrar em pequenas quantidades no intestino do carrapato.

Com a finalidade de obter um antígeno mais seguro e de maneira mais cômoda, foi realizada a clonagem do gene *bm86* em *E. coli*, em *Aspergillus nidulans* e em *Baculovirus* (TURNBULL *et al.*, 1990; TELLAM *et al.*, 1992). Em 1994 foi lançada a primeira vacina comercial contra carrapatos denominada TickGard[®] (Hoeschst Animal Health, Austrália), com o clonagem do gene *bm86* isolado da amostra Yeerongpilly em *E. coli*, produzindo a proteína Bm86 recombinante (SMITH *et al.*, 1995).

Nesse mesmo ano, foi desenvolvida a vacina cubana GAVAC[®] (Heber Biotec AS, Havana, Cuba) através de recombinação do gene da glicoproteína Bm86 (estoque cubano da amostra Yeerongpilly) na levedura *Pichia pastoris*. Em experimentos a campo foi mostrado que este imunógeno não apenas afetou a redução do número de carrapatos, mas também a redução do peso das teleóginas ingurgitadas, diminuição da postura e viabilidade dos ovos (RODRIGUEZ *et al.* 1994)

Análises conduzidos com cepa Argentina de *R. microplus*, resultaram em mínima eficiência à vacina GAVAC[®], o resultado levou ao isolamento da amostra, permitindo o surgimento de uma nova proteína muito similar à Bm86, denominada Bm95. Esta proteína foi expressa em *P. pastoris* e utilizada como antígeno vacinal apresentando melhor eficácia na população insensível à Bm86 recombinante (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000). As

vacinações de bovinos com a Bm95 recombinante (GAVAC- PLUS[®]), em algumas populações de carrapatos no sul do Brasil apresentaram resultados insignificantes. Somado isto, foi demonstrado que as populações de *R. microplus* em “São Gabriel” e “Butiá”, ambas do Rio Grande do Sul, foram altamente insensíveis à nova formulação recombinante. Nos estudos de polimorfismo feitos por SOSSAI (2004), essas populações apresentaram polimorfismos genéticos na expressão de aminoácidos (aa) de 4,18% e 3,42% com referência à Bm86 e 1,9% e 1,14% com referência à Bm95, respectivamente.

Alguns fatores podem ser responsáveis pelas falhas vacinais vistas com o uso das vacinas recombinantes compostas por Bm86 e Bm95, tais como: o alto número de determinantes imunogênicos existentes na proteína vacinal levando a uma “sobrecarga” de atuação dos MHC da classe II no momento do processamento e apresentação dos antígenos às células T CD4⁺. Isso levaria a uma alta produção de anticorpos, porém com baixa afinidade, não sendo capazes de causarem os danos necessários para os efeitos vacinais desejados. Outro fator de importância seria o referente ao tamanho da proteína, sendo que os determinantes imunogênicos mais importantes da proteína estariam escondidos devido à conformação quaternária adquirida pela proteína vacinal; e por último, devido a polimorfismos na proteína “in vivo” nas populações de *R. microplus*, principalmente naquelas regiões alvos dos anticorpos protetores, que fatalmente diminuiriam os efeitos deletérios dessas moléculas nas proteínas intestinais do carrapato (SOSSAI *et al.*, 2005; PECONICK *et al.*, 2008).

2.3. A vacina sintética SBm7462[®]

Baseando-se no fato de que a estrutura primária determina a estrutura terciária, alguns pesquisadores desenvolveram modelos matemáticos que levam em consideração algumas propriedades das proteínas como antigenicidade (HOOP e WOODS, 1981), potencialidade de alfa e beta

hélice e *Beta Sheet* (CHOU & FASMAN, 1978), hidrofobicidade e hidrofiliçidade (KYTE & DOOLITTLE, 1982) para prediçãõ de possíveis sítios imunogênicos da proteína integra.

Fazendo-se uso as ferramentas computacionais, pesquisadores do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (BIOAGRO) e do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – MG desenharam três sequencias peptídicas denominadas 4822 (aa. 398 – 411), 4823 (aa. 21 – 35) e 4824 (aa. 132 – 145). A junção das sequencias de aminoácidos dos três peptídeos na ordem anterior, originou o antígeno vacinal SBm 7462[®].

PORTELA (2000) e PATARROYO *et al.* (2002) testaram três imunógenos derivados dos epítotos 4822, 4823 e 4824. Os peptídeos SBm4912 (c – 4822 – 4823 – 4824 – c), SBm 19733 (c – 4822 – KEK – 4823 – KEK – 4824-c) e o peptídeo SBm7462 (c-4822 – 4824 – 4823- c). Entre estes, o peptídeo Sbm19733 possuía pontes lisina-acido glutamico-lisina (KEK) cuja finalidade era aumentar a solubilidade em água. Os peptídeos foram utilizados como imunógeno vacinal em bovinos mantidos em isolamento à prova de ectoparasitos na dose de 2 mg, junto ao adjuvante saponina[®] por três doses. O desafio dos animais com 6000 larvas de *R. microplus* após a terceira inoculação revelou que o peptídeo SBm7462 mostrou melhor eficácia (81,05%) quando comparado com o SBm19733 (35,87%) e SBm4912 (72,40%).

A partir deste estudo, o peptídeo SBm7462[®] foi eleito como o imunógeno a ser utilizado como candidato a uma vacina comercial contra o carrapato *R. microplus*. Esse peptídeo foi patenteado no México, EUA, Austrália e Comunidade européia.

COUTO PIMENTEL (2002) realizou o teste com o peptídeo sintético SBm746^{2®} em condições extremamente diferentes que as anteriores e na

concentração de 2,0 mg com o adjuvante saponina. Foram utilizados neste trabalho 30 bovinos *Bos taurus taurus*, da raça Holandesa, mantidos em pastagens previamente infestadas com larvas de *R. microplus*. Nesse estudo foi alcançada uma eficácia final de 53,29% para o grupo vacinado com 2,0 mg do peptídeo SBm7462[®].

De acordo com os achados de COUTO-PIMENTEL (2002) e PATARROYO *et al.* (2002), a eficácia do peptídeo SBm7462[®] em estábulo se mostra superior a maioria dos testes realizados com rBm86 na mesma situação e produz uma resposta imune protetora contra o *R. microplus*, mesmo sob condições de estresse, devido ao manejo, com uma eficácia equiparada aos demais ensaios com rBm86 sob condições apenas de estábulo (RODRIGUEZ *et al.*, 1994; PENICHET *et al.*, 1994; FRAGOSO *et al.*, 1995; MASSARD *et al.*, 1995).

SALES-JÚNIOR (2005) estudando a resposta imune celular em camundongos BALB/c inoculados com o peptídeo sintético SBm7462[®] associado ao adjuvante saponina e com o liberador lento PLGA (polylactideco-glycolide) que são polímeros biodegradáveis, mostrou que a resposta celular a esses imunógenos se caracterizaram por hiperplasia folicular com a formação de centros germinativos (CGs) associada a hiperplasia dos cordões de Billroth e das bainhas periarteriolas do baço. A associação peptídeo/saponina apresentou resposta celular mais precoce que a associação com PLGA que mostrou resposta mais tardia. Na avaliação da resposta imune induzida em bovinos pelo SBm7462[®], PATARROYO *et al.* (2009) demonstraram que o SBm7462[®] estimulou a produção de imunoglobulinas antígeno-específicas, com predominância estatisticamente diferente do isotipo IgG1 sobre o isotipo IgG2. De acordo com esses achados, se considerou que o peptídeo sintético SBm7462[®] induzia eficientemente uma resposta imune antígeno-específica que envolvia mecanismos imunes tanto celular quanto humoral. A resposta imune induzida pelo SBm7462[®] se caracterizava nos tecidos linfóides, pela

formação típica de estruturas que conferiam especificidade e memória aos quinze dias após a primeira imunização com a indução de apoptose em células linfocíticas residentes em linfonodos.

2.4. As vacinas recombinantes *rBmseq1* e *rBmseq4*

Diferente das vacinas que se derivaram da proteína Bm86, as quais utilizavam a proteína íntegra (650 aminoácidos), a vacina sintética SBm7462[®] caracterizou-se como um peptídeo de 43 aminoácidos que contem três epítópos derivados da proteína Bm86 e polimerizados com cisteínas nas extremidades C e N -terminais. Além disso, pesquisas realizadas por PATARROYO *et al.* (2002), demonstraram que a porção 4824 é a mais hidrofílica do peptídeo SBm7462, sendo responsável pela maior produção dos anticorpos IgG1 protetores dessa vacina. Por conta disso, SOSSAI *et al.* (2005) através de estudos de polimorfismos de DNA determinou que a porção 4824 mostrava-se conservada entre populações de *R. microplus* brasileiras, argentinas, colombianas, uruguaias e venezuelanas, o que deixou o imunógeno SBm7462[®] em situação de ser utilizado como imunógeno universal em populações de *R. microplus*. Após alinhamento entre as proteínas Bm86 e Bm95 foi observado que apenas duas mudanças ocorrem dentro das sequências que constituem a SBm7462[®]. Acredita-se que essas sequências se mantiveram conservadas durante a evolução deste parasito (SOSSAI *et al.*, 2005). Confirmando o parecer de antígeno universal, PECONICK *et al.* (2008) demonstraram conservação nas porções 4822 e 4823 do peptídeo SBm7462[®].

Visando resolver as dificuldades que acarreta a produção de proteínas sintéticas em massa e propor uma alternativa à produção do peptídeo sintético Sbm7462[®], SOSSAI (2009) utilizou quatro genes que foram desenhados tendo como base a sequência de aminoácidos do peptídeo sintético SBm7462[®], otimizando-os para uso na levedura *Pichia pastoris* km71. O gene *rBmseq1* foi desenhado de tal forma que o peptídeo

SBm7462[®] foi repetido em *tandem* por três vezes e o gene *rBmseq4* desenhou-se com o intuito de amplificar a sequência original de 45 aminoácidos do peptídeo SBm7462[®]. Os produtos desses genes foram recuperados do meio extracelular para os ensaios laboratoriais e vacinais. Na avaliação da resposta imune produzida pelos peptídeos recombinantes em camundongos BALB/c foi comprovada a estimulação da resposta imune tanto humoral quanto celular, detectada através da análise cinética de anticorpos (IgG) e pela formação de centros germinais após a vacinação (TAFUR, 2008; SOSSAI, 2009).

Congruente com o determinado para SBm7462[®], os peptídeos recombinantes induziram produção preferencial do isotipo IgG1, que é o isotipo protetor. Além disso, a resposta imune celular em linfonodos de camundongos BALB/c se caracterizou pela formação de estruturas típicas que conferem alta afinidade e memória imunológica, comprovando-se uma resposta T-dependente com estruturas similares às observadas com o peptídeo sintético SBm7462[®] (TAFUR, 2008; SOSSAI, 2009).

2.5. Sítios de glicosilação e resposta imune

A glicosilação protéica proporciona um papel importante tanto na biossíntese como na atividade das glicoproteínas envolvidas no reconhecimento antigênico, os açúcares jogam um significativo *rol*, controlando a qualidade do dobramento e ensamble das proteínas. Além disso, os pontos de glicosilação ajudam ao dobramento correto de proteínas no retículo endoplasmático, permitindo a montagem de peptídeos no MHC I e influenciando também aos peptídeos gerados na via endossômica para apresentação pelo MHC II (RUDD *et al.*, 2001).

Por virtude do seu tamanho, a glicosilação pode proteger grandes regiões das superfícies das proteínas, permitindo assim, uma preservação à atividade das proteases nas moléculas imunes. Os sítios de glicosilação com

grande peso molecular podem determinar a orientação e localização da ligação proteica (KUTTNER-KONDO *et al.*, 1996). Além disso, os glicanos podem prevenir as interações não específicas entre proteínas, restringindo assim a formação de agregados na superfície celular (RUDD *et al.*, 1997).

Na sinapse imunológica, os oligossacarídeos apresentam o papel de transportar o peptídeo ligado a MHC (pMHC) para o centro da articulação onde estão confinados os TCR (GRAKOU *et al.*, 1999). O tamanho e localização dos glicanos evitam as interações não específicas entre proteínas, como também a agregação dos TCR na membrana, para estabilizar as moléculas da sinapse imunológica. Em glicoproteínas restritas a MHC, os grandes números de glicanos mostraram uma diminuição para reconhecer as células T $\alpha\beta$, no entanto, apresentaram uma tendência à indução de células T $\gamma\delta$ com reconhecimento nominal do antígeno (RUDD *et al.*, 2001).

2.6. Papel dos agregados protéicos na resposta imune

Os medicamentos protéicos viraram de uso comum na prática médica. Por seus usos promissórios, muitos produtos biofarmacêuticos se encontram em fase de desenvolvimento (JOGERSEN *et al.*, 2006). Os produtos biomédicos são suscetíveis a agregação em resposta a uma ampla variedade de estresse que podem ocorrer durante sua produção, conservação e aplicação aos pacientes. Em consequência, os agregados de proteínas terapêuticas podem comprometer a segurança e eficácia dos produtos biomédicos (ROSENBERG, 2006). Os agregados de proteínas terapêuticas podem induzir respostas imunes com consequências que levam tanto a diminuição da eficácia do produto como a morte do paciente, que podem se considerar como características negativas destes produtos (FRADKIN *et al.*, 2009).

Durante as análises da expressão recombinante de dois imunógenos anti *R. microplus*, se descreveu que uma possível explicação para a formação de bandas adicionais resultantes no SDS-PAGE, era a formação de aglomerados protéicos originários das interações hidrofóbicas, principalmente, pelo elevado número de pontes dissulfetos formados entre os resíduos de cisteína das proteínas. Foi descrito que o peptídeo *rBmseq1* possuía 19 resíduos de cisteína, no entanto, o peptídeo *rBmseq4* apresentou apenas seis. As análises do perfil eletroforético dos peptídeos demonstraram que a *rBmseq1* apresentou três bandas distintas (5,5, 15 e 50 kDa), enquanto o perfil da *rBmseq4* mostrou apenas uma banda (SOSSAI, 2009).

A formação de pontes de dissulfetos provavelmente seja a principal via química de indução de agregação protéica. Os resíduos de cisteínas livres das proteínas podem ser facilmente oxidados para formar pontes dissulfetos, unindo ou iniciando intercâmbios tio-dissulfetos, resultando em polimerização protéica. A troca tio-dissulfeto começa a partir do ânion tiolate que formará um grupo tiol ionizado. A diversidade das interações tio-dissulfeto depende do grau de ionização do tiol nucleofílico, portanto, este geralmente aumenta à medida que o pH da solução aumenta até que o pK do grupo tiol nucleofílico é ultrapassado. Além disso, sem a existência de cisteínas livres, as pontes dissulfetos das proteínas podem ainda sofrer agregação através eliminação- β das mesmas (WANG, 2005).

Os agregados protéicos em muitos casos podem apresentar ou não atividade biológica. Com respeito à resposta imune, os agregados protéicos podem ser capturados facilmente pelas APCs, induzindo maturação das anteriores e aumento da resposta T-dependentes. Além disso, esses podem gerar um *cross-linking* dos receptores das células B para ativar a proliferação destas células, levando a proteína pela via lisosomal e induzindo uma eficiente ativação das células Th, dando uma característica positiva aos agregados protéicos. (DE GROOT & SCOTT, 2007).

Estudos voltados ao análise da capacidade de indução da resposta imune pelos diferentes tipos de agregados protéicos, mostraram que é possível esperar que pequenas quantidades de agregados possam gerar uma forte resposta imune às proteínas estranhas. Assim, os agregados de proteínas com abundância relativamente baixa, potencialmente podem desencadear respostas imunes fortes, enquanto que os agregados protéicos de alta abundância podem ter uma capacidade limitada para induzir respostas imunes, explicando a questão da dose resposta. (ROSENBERG, 2006).

2.7. Resposta imune em linfonodos

A formação de centros germinativos (CG) nos folículos linfóides de linfonodos constitui o berço dos linfócitos B de memória. Os CG são induzidos por antígenos, no marco de uma resposta imune celular de tipo T-dependente e se originam a partir da rápida expansão clonal de poucas células formadoras (LIU & ARPIN, 1997). As respostas de anticorpos T-dependentes começam, quando algumas células T e B específicas para determinado grupo antigênico interatuam entre a região de folículos celulares B e a zona de células T, em ligações cognatas (OKADA, 2005).

Vários estudos foram necessários para sugerir que através dos processos de proliferação clonal, hipermutação somática e seleção, e maturação de alta afinidade dos linfócitos B, se desenvolvem os centros germinativos. No entanto, os CGs não se mostraram absolutamente prescindíveis para a maturação de afinidade, porém eles são um local especializado que suporta os eventos necessários para uma eficiente maturação de afinidade (ALLEN *et al.*, 2007b).

A organização e cinética dos CGs são induzidas por células B específicas para um antígeno estranho poucos dias após o começo da resposta imune, as células B ativadas se movimentam inicialmente ao centro

do folículo linfóide dos órgãos linfóides secundários proliferando em interação com as células apresentadoras de antígeno (KOLSCO-VILBOIS, 2003).

O modelo clássico de função e maturação de afinidade descreveu que a maturação dos CGs ocorre em dois compartimentos principais, esses compartimentos foram descritos como região clara e escura com base nos estudos histológicos. Segundo esse modelo a região clara é ocupada por células apresentadoras de antígeno (APCs) em processo, estendendo-se uma pequena parte do processo de apresentação antigênica à região escura, onde os linfócitos são encerrados num pacote (ALLEN *et al.*, 2007b).

Neste modelo, os linfócitos B tanto da região escura como da região clara foram definidos historicamente como centroblastos e centrócitos respectivamente. Foi sugerido que estas células podem sofrer um processo de rápida proliferação e hipermutação somática, atravessando um processo de seleção celular. Também, propôs-se que os centroblastos saiam do ciclo celular expressando anticorpos na sua superfície e se transformavam em centrócitos que viajavam a zona clara, assim os centrócitos adquiriam a capacidade de interagir com as células apresentadoras de antígeno nesta região. Além disso, foi sugerido que os centrócitos selecionados podem apresentar antígeno às células Th na região clara, aumentando assim a sobrevivência e promoção da diferenciação de células plasmáticas ou de células B de memória (ALLEN *et al.*, 2007b).

No entanto, recentes evidências experimentais e simulações em computador contradisseram aspectos que permaneceram em incógnito do modelo clássico e o mecanismo pelo qual ocorre a seleção nos CGs. Utilizando essas metodologias foi possível determinar movimento das células B desde a região clara para a região escura, controvertendo a idéia clássica de migração celular unidirecional desde a região escura para a região clara. Também, determinaram-se morfologias e velocidades iguais

das células B tanto na região clara como na escura. Além disso, imagens em tempo real mostraram que a divisão, proliferação e morte celular ocorrem tanto na região clara como na escura, e não apenas na região escura como postulava o modelo clássico, este modelo ajuda ao entendimento da resposta imune em relação à dose resposta e as interações celulares (ALLEN *et al.*, 2004; ALLEN *et al.*, 2007a,b).

Recentes estudos de anatomia dos folículos linfóides, que se basearam tanto nas metodologias clássicas como nas modernas técnicas moleculares e de microscopia, descreveram que a zona clara se encontra estrategicamente posicionada nos órgãos linfóides secundários em direção à fonte de antígenos estranhos. Esta zona se encontra posicionada perto ao espaço subcapsular que recebe a drenagem linfática aferente da pele, mucosa ou víscera. Essa orientação da zona clara concorda com as evidências que os antígenos geralmente são transportados rapidamente ao CG na forma de complexos imunes e as células B foliculares talvez tenham o papel em esse processo de transporte (PHAN *et al.*, 2007; ALLEN *et al.*, 2007a).

As vesículas linfáticas aferentes podem coletar linfa de diferentes lugares de drenagem, cada lóbulo linfóide é potencialmente exposto a diferentes grupos de antígenos, assim, o resultado da estimulação imunogênica é variável. Os lóbulos de um linfonodo podem ter diferentes níveis de atividade imunológica e o compartimento cortical, paracortical e medular não necessariamente devem ter uma aparência uniforme (WILLARD-MACK, 2006). O que ajudará a entender os eventos imunes em bovinos *Bos taurus taurus* que podem se produzir em resposta aos peptídeos *rBmseq1 rBmse4*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar a resposta imune celular em bovinos imunizados com os peptídeos recombinantes *rBmseq1* e *rBmseq4*, derivados do peptídeo sintético SBm7462[®] expressos em *Pichia pastoris*.

3.2. Objetivos específicos

Identificar o desenvolvimento cronológico da resposta imune em linfonodos de bovinos imunizados com os peptídeos recombinantes *rBmseq1* e *rBmseq4*.

Estudar a dinâmica das alterações microscópicas dos folículos linfóides e centros germinais nos linfonodos dos animais imunizados.

Identificar a presença do antígeno nos linfonodos dos animais imunizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais Utilizados

Todos os procedimentos experimentais que envolveram a manipulação dos animais utilizados, no experimento foram realizados seguindo rigorosamente as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV, estando registrado e aprovado no Comitê de Ética da instituição.

Foram utilizados 17 bovinos *Bos taurus taurus* da raça Holandesa, com idade entre 6 e 10 meses, oriundos de fazendas leiteiras do município de Viçosa-MG e mantidos desde o nascimento no isolamento do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários do Instituto de Biotecnologia Aplicada À Agropecuária do Departamento de Veterinária (LBCHV/BIOAGRO/DVT) da Universidade Federal de Viçosa, livres da infestação por carrapatos, moscas e outros ectoparasitos. Os animais foram identificados por meio de brincos auriculares numerados. A alimentação foi baseada em ração balanceada e de volumoso (feno) com 17% de proteína, com quantidade definida de volume, oferecida às 7 horas da manhã e às 3 horas da tarde, e água *ad libitum*. Um animal macho *Bos taurus taurus* foi utilizado para a manutenção da colônia de carrapatos *R. microplus*.

4.2. Imunógenos

Fundamentando-se na metodologia de vacinologia reversa, foram desenhados dois genes sintéticos com base no peptídeo SBm7462[®]. Esses genes foram otimizados e sintetizados pela companhia Entelechon

(Alemanha) para uso na levedura *Pichia pastoris* cepa km71. O gene *seq1* de 438 pb foi desenhado de tal forma que os epítomos imunogênicos foram repetidos três vezes e o gene *rBmseq4* de 171pb foi desenhado com o intuito de codificar a seqüência original de 45 aa; posteriormente os genes foram clonados no vetor de expressão extracelular pPic9 (Invitrogen USA).

Pela técnica de *blotting* de colônia foram escolhidos dois clones de *P. pastoris*. Depois de analisar vários clones. Foram selecionados os clones 9.1.8 (pPIC9-*seq1*-clone 8) e 9.4.5 (pPIC9-*seq4*-clone 5) para expressão em pequena escala dos peptídeos recombinantes. Após o processo de ultrafiltração das fermentações dos clones 9.4.5 (*seq4*) e 9.1.8 (*seq1*), os peptídeos recombinantes foram caracterizados por SDS-PAGE. Após isso, as bandas observadas no SDS-PAGE foram confirmadas como peptídeos recombinantes *rBmseq1* e *rBmseq4* pela técnica de *western blotting*.

4.3. Esquema de imunização

- Grupo I: Quatro animais inoculados com 1,5 mg de saponina mais 2 mg da proteína *rBmseq 1* em 4 mL de água água milli Q estéril, administrada via subcutânea nos dias zero, trinta e sessenta.
- Grupo II: Quatro animais inoculados com 1,5 mg de saponina mais 2 mg da proteína *rBmseq 4* em 4 mL de água água milli Q estéril, administrada via subcutânea nos dias zero, trinta e sessenta.
- Grupo III: (Controle *P. pastoris*): Quatro animais inoculados com 2 mg de extrato bruto de *P. pastoris* diluídos em 4 mL de água água milli Q estéril.

4.4. Histologia dos linfonodos de bovinos

Os linfonodos pré-escapulares bovinos foram removidos cirurgicamente com uma pequena incisão da pele, os linfonodos dos animais imunizados com o peptídeo do *rBmseq 1* foram coletados nos dias -1, 7, 15, 35, 45 65 e 72 após a primeira inoculação, e os linfonodos dos animais

imunizados com o peptídeo do *rBmseq 4* foram coletados dos dias -1, 15, 35, 45 65 e 72 após a primeira inoculação. Os fragmentos seccionados longitudinalmente dos linfonodos foram fixados durante 8 h em paraformaldeído a 4% pH 7,2, e desidratados por 24 horas em soluções alcólicas crescentes (70%, 80%, 90% e 100% I e II), posteriormente os fragmentos foram diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast Plus[®] (Sigma[®]) (PROPHET *et al.*, 1992).

Os cortes histológicos foram realizados a 5 µm de espessura em micrótomo de rotação LEICA, os quais se coraram segundo as técnicas de Hematoxilina-Eosina (H&E). As lâminas se analisaram com auxílio de microscópio óptico binocular ECLIPSE E600³.

4.5. Imunohistoquímica para identificação do antígeno vacinal *in situ*

Para detecção de antígenos *in situ* foi utilizada a técnica de Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) (PROPHET *et al.*, 1992). O meio de inclusão foi retirado por duas passagens em xilol de 30 minutos cada, sendo hidratados em soluções alcólicas decrescentes (100% I e II, 90%, 80% e 70%) por 5 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio metanólico 3%, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados duas vezes, durante 5 minutos cada, com PBS pH 7,4 (1,48 g de Na₂HPO₄, 0,43 g de NaH₂PO₄, 7,2 g de NaCl e água deionizada q.s.p. 1000 mL). Foi feita a digestão enzimática dos cortes utilizando-se tripsina 1 mg/mL em PBS pH 7,4 durante 10 minutos a 37°C.

Em seguida, os cortes foram cobertos com soro normal de cabra diluído a 1:10 em PBS pH 7,4 e incubados em câmara úmida durante 45 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, o excesso de soro foi enxugado evitando a secagem dos cortes e se colocou o anticorpo primário (soro de coelho anti-SBm7462), diluído a 1:20 em PBS pH 7,4, os cortes foram incubados durante 24 horas em câmara úmida a 4°C. Posteriormente,

os cortes foram lavados três vezes com PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada e em seguida cobertos com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho), diluído a 1:10 em PBS 7,4.

Após incubação em câmara úmida, durante 45 minutos a 37°C, os cortes foram lavados três vezes, 5 minutos cada, com PBS pH 7,4 e posteriormente cobertos com o complexo PAP produzido em coelho (SIGMA[®]), diluído a 1:200 de acordo com especificação do fabricante e imediatamente incubados em câmara úmida, durante 45 minutos a 37°C. Os cortes foram lavados novamente em PBS pH 7,4 durante 10 minutos e imediatamente colocados em solução reveladora recém preparada (25 mg de diaminobenzidina (DAB), 200 µL de H₂O₂ (30V) em 100 mL de PBS pH 7,4) durante 5 minutos. Finalmente os cortes foram lavados por mais 5 minutos em PBS pH 7,4 e contra corados com Hematoxilina de Harris diluída a 1:10 em PBS pH 7,4 durante 20 segundos, sendo em seguida desidratados em álcool, diafanizados em xilol e montados com Entellan[®] entre lâmina e lamínula. As lâminas foram analisadas por meio de microscópio óptico binocular.

4.6. Análise estatística

As análises histomorfométricas, foram realizadas nos cortes de linfonodos corados pela técnica H&E, os quais foram analisados com auxílio do programa Micrometrics[™]. Os centros germinais (CGs) foram mensurados pela ferramenta de diâmetro, traçando-se uma linha ao redor dos mesmos. Foram selecionados os melhores cortes de cada coleta mensurando-se vinte campos de 640 µm por corte, após isso, foram obtidas as médias aritméticas e os desvios padrões de cada amostra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação histológica dos linfonodos pré-escapulares

Na histologia diferencial H&E, as observações dos cortes de linfonodos de animais imunizados com a *rBmseq1*, obtidos sete dias após imunização, revelaram hiperplasia das regiões paracorticais e interfoliculares com baixa reação de centros germinais (CGs), além de uma ligeira hiperplasia da região medular (Figura 1A e 1B). Em concordância com essas observações, FU *et al.* (2000), afirmaram que em linfonodos sensibilizados a hiperplasia das zonas T faz parte dos primeiros eventos observados. OKADA (2005) menciona que as respostas T-dependentes começam quando as células T e B afins para um grupo antigênico interagem entre a região de folículos celulares B e a zona de células T, em ligações cognatas, razões que podem explicar a hiperplasia das regiões paracorticais e interfoliculares.

Esses achados, guardam estreita relação com as observações feitas por PATARROYO *et al.* (2009) ao utilizar o peptídeo sintético SBm7462[®] sete dias após a primeira imunização, que de acordo com as descrições feitas por BOUSSO (2009) sugere nos linfonodos, a possível presença de interações entre as células T *naive* e as células apresentadoras de antígeno (APCs) mediadas pelo TCR e o pMHC para o *priming* das células T. Indicando que a sinapse imunológica, pode-se desempenhar talvez de forma similar com o peptídeo recombinante *rBmseq1* e com o peptídeo sintético SBm7462[®].

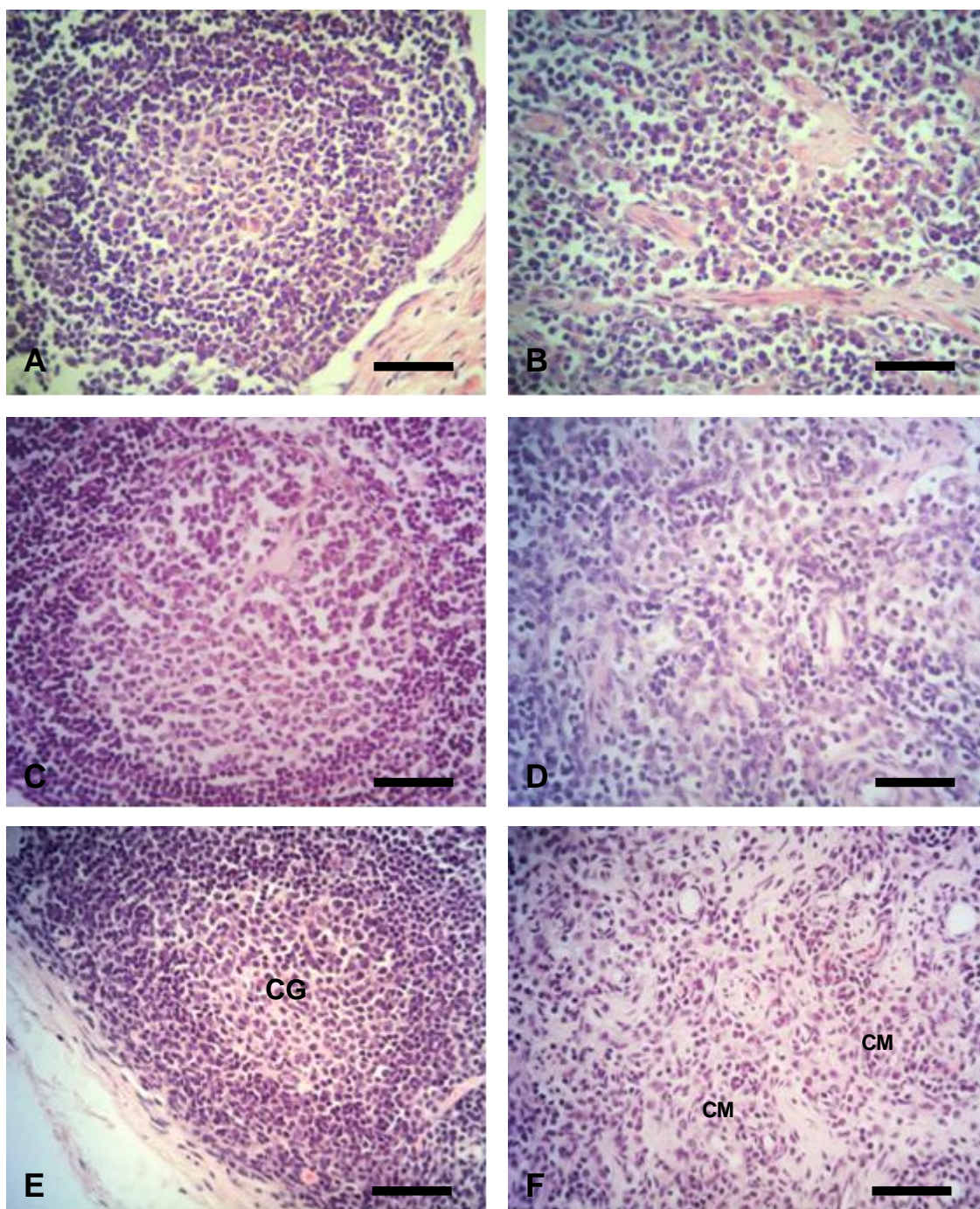


Figura 1. Microfotografia de linfonodos de Bovinos. H&E. Barra de escala de 50 µm. (A) Folículos linfóides 7 dias após imunização com *rBmseq1*. (B) CM 7 dias após imunização com *rBmseq1*. (C) Centro germinal (CG) 15 dias após imunização com *rBmseq1*. (D) CM 15 dias após imunização com *rBmseq1*. (E) Folículos linfóides sem imunização. (F) Cordões medulares (CM) sem imunização.

A ligeira hiperplasia dos cordões medulares pode se relacionar com reações plasmositárias extrafoliculares, dependendo do estágio da resposta imune, nos cordões medulares podem se encontrar células plasmáticas de curta e longa duração (FOOKSMAN *et al.*, 2010). Essas afirmações estão em conformidade com LUTHER (2010), ao descrever que as células plasmáticas finais de longa duração são um produto importante de respostas T- dependentes. O que em harmonia com GASPAL *et al.* (2004) quando se caracterizou a resposta de centros germinais (CGs) em dependência das células T-*helper* e CD 40, levanta a sugestão do desenvolvimento de uma amplificação clonal de baixa afinidade, que pode estar relacionada com a geração de células plasmáticas de curta duração. Esses eventos imunes podem estar presentes ao utilizar o peptídeo recombinante *rBmseq1* como ao utilizar o peptídeo sintético SBm7462[®] segundo as observações feitas por PATARROYO *et al.* (2009).

Pela histologia diferencial H&E, quinze dias após a primeira imunização, os cortes de linfonodos dos animais imunizados com a *rBmseq1* apresentaram, alta reação de CGs delimitados por uma população linfocítica, com diferenciação em regiões clara e escura (Figura. 1 C). No entanto, nesse mesmo período, os tecidos dos animais imunizados com a *rBmseq4*, apresentaram hiperplasia da região paracortical sem reação de CGs (Figura 2 A).

Esses achados em relação com estudos prévios mostram que a formação dos CGs cronologicamente começa desde os quatro e oito dias após imunização (LIU & ARPIN, 1997; SMITH, 2000; WILLARD-MACK, 2006). Em conformidade com isso, PATARROYO *et al.* (2009) demonstraram a formação de CGs quinze dias após imunização com o peptídeo sintético SBm7462[®]. Embora, observações deste experimento ao utilizar o peptídeo *rBmseq1* concordam com as observações anteriores, discrepam das observações feitas com o imunógeno *rBmseq4*.

Para explicar os eventos que podem estar envolvidos nas diferentes respostas induzidas pelos peptídeos recombinantes, KOLSCO-VILBOIS (2003) ilustra que a organização dos CGs começa depois que as B células ativadas por um antígeno são movimentadas ao centro do folículo linfóide. Em relação com isso, ALLEN *et al.* (2007b) demonstraram que ocorre uma interação entre as células T e B nas bordas dos folículos após estimulação. No entanto, para que ocorram as interações descritas anteriormente, é necessário que ocorram interações entre as células APCs e as células T como foi mencionado anteriormente.

Pesquisas voltadas ao estudo do *priming* das células T demonstraram que houve redução da proliferação das células T com baixas concentrações de peptídeo, isso se relacionou com a baixa probabilidade de ligações entre as células T e os antígenos apresentados pelas DCs, assim, os encontros entre as células T *naive* e DCs em ótimas densidades de antígeno resultaram em contactos estáveis (BOUSSO & ROBEY, 2003). Além disso, SCHELLEKENS (2002) mencionou que a dose e quantidade total de uma proteína de fines terapêuticos têm sido relacionadas com a imunidade. Em relação com os relatos anteriores, as diferentes concentrações dos peptídeos recombinantes com base na sequência original do SBm7462[®], faz relação com diferentes densidades antigênicas, o *rBmseq1* possui a sequência original repetida três vezes com 133aa, e o *rBmseq4* possui a sequência original sem repetições com 45aa, isso indica maiores densidades antigênicas para o *rBmseq1* e menores para o *rBmseq4* ao utilizar 2 mg de dose por cada imunógeno. Que em concordância com os descritos anteriores sugere uma menor proliferação das células T com o *rBmseq4* e uma maior proliferação com o *rBmseq1*, essas sugestões se reforçam ainda, quando se observou forte resposta de CGs com *rBmseq1* e apenas hiperplasia de região cortical com o *rBmseq4*.

Levando em conta que os diversos níveis de proliferação das células T se devem a variabilidade na densidade antigênica, KIM *et al.*, (2001)

demonstrou que a presença das células T nos CGs é importante para que as células B recebam os sinais de progressão apropriados para sua diferenciação. Além disso, os pesquisadores sugeriram que as células T dos CGs auxiliam as células B e ajudam à revisão dos receptores das células T (TCR). Essas análises sugerem que os animais imunizados com *rBmseq1* podem induzir uma forte proliferação das células T que ao interagir no CGs estimularam uma forte resposta deste, enquanto o *rBmseq4* induz uma baixa proliferação das células T que não alcança progredir na estimulação dos CGs num primeiro momento imune.

Tendo em conta que neste experimento pode ocorrer uma relação das densidades antigênicas com as variações das ligações entre as células T *naive* e APCs. Para elucidar essas afirmações, foram tidos em conta vários estudos a fim de entender os sinais de ativação liberados durante o *priming* células T em linfonodos. Esses estudos demonstraram, que os contatos sucedidos entre as células T e as DCs, notavelmente exibem diferentes durações e estabilidades. Foram descritos três modelos prototípicos de interações: interações transitórias, interações de longa duração e amontoamento ou *Swarming* (BREART & BOUSSO, 2006). O que leva a asseverar que o *rBmseq1* induz interações de longa duração, enquanto o *rBmseq4* induz interações transitórias.

Em consonância com os mecanismos de afinidade e maturação dos CGs citados anteriormente, é importante denotar que o novo modelo de afinidade e maturação dos CGs determinou que há movimento das células B desde a região clara para a região escura, controvertendo a idéia clássica de migração celular unidirecional desde a região escura para a região clara. Além disso, imagens em tempo real mostraram que ocorrem divisão, proliferação e morte celular tanto na região clara como na escura, e não apenas na região escura como postulava o modelo clássico (ALLEN *et al.*, 2004; ALLEN *et al.*, 2007a,b). Fatos que podem esclarecer a forte reação de CGs observados com o *rBmseq1* neste período. No entanto, abrem a

possibilidade da hipermutação somática com *rBmseq4* em lugares extrafoliculares.

Além das possíveis diferenças da densidade antigênica e das doses utilizadas neste experimento, as plausíveis variações da estrutura protéica dos imunógenos, podem auxiliar a explicação das variações da resposta imune. Foi revelado que a estrutura da proteína afeta a imunogenicidade dos fármacos protéicos (SCHELLEKENS, 2002). Adicionalmente, observações feitas por SOSSAI (2009) durante as análises da expressão recombinante dos imunógenos anti *R. microplus* sugeriram maior quantidade de interações hidrofóbicas com o *rBmseq1* do que com o *rBmseq4*. O mesmo autor descreveu ainda, que o peptídeo *rBmseq1* possuía dez e nove resíduos de cisteína, no entanto, o peptídeo *rBmseq4* apresentava apenas seis. Somado isto, a formação de pontes dissulfetos provavelmente é a principal via química de indução da agregação protéica (WANG, 2005).

A agregação protéica tem sido associada por décadas com aumento da antigenicidade, inclui proteínas de alto peso molecular compostas de múltiplos de conformação nativa ou monômeros desnaturados (ROSEMBERG, 2006). Embora os mecanismos imunes não sejam entendidos cabalmente, se propôs que a agregação protéica reforça a resposta de células T- dependente, aumentando a ligação antigênica com os receptores de células B. (ROSEMBERG, 2006). Esses fatos ajudam a explicar a maior indução de CGs com *rBmseq1* e baixa reatividade de CGs com *seq4* em relação aos potenciais níveis de agregação protéica de cada peptídeo.

Em relação à resposta imune dos agregados protéicos, GROOT & SCOTT (2007) sugeriram que estes podem se capturar facilmente pelas APCs, induzindo maturação das anteriores e aumento da resposta T- dependente. Além disso, os agregados de proteínas podem gerar um *cross-linking* com os receptores das células B para ativar a proliferação destas

células, levando a proteína pela via lisosomal e induzindo uma eficiente ativação das células T *helper* (GROOT & SCOTT, 2007). Sugerindo que além da densidade antigênica os plausíveis níveis de agregação podem permitir o surgimento de interações de longa duração para o *rBmseq1* e interações transitórias para o *rBmseq4*, que podem ter relação com a hipermutação somática.

Além dos possíveis níveis de agregação protéica que podem estar presentes nos imunógenos recombinantes, outra característica que pode influenciar os níveis de antigenicidade é a presença de sítios de glicosilação. Segundo CEREGHINO (2000) o sistema de expressão protéico em *Pichia pastoris* possui a capacidade de induzir pontes de glicosilação N e O. Além disso, estudos de predição da expressão protéica feitos por SOSSAI (2009), revelaram que ao expressar peptídeos recombinantes anti *R. microplus* em *P. pastoris*, estes apresentariam três sítios de N glicosilação para o *rBmseq1* e um sítio para o *rBmseq4*. Na sinapse imunológica, os oligosacarídeos apresentam o papel de transportar o peptídeo ligado a MHC (pMHC) para o centro da articulação onde estão confinados os TCR (GRAKOUUI *et al.*, 1999). O tamanho e localização dos glicanos evitam as interações não específicas entre proteínas, como também a agregação dos TCR na membrana, para estabilizar as moléculas da sinapse imunológica. Em glicoproteínas restritas da MHC, os grandes números de glicanos mostraram uma diminuição para reconhecer as células T $\alpha\beta$, no entanto, apresentaram uma tendência à indução de células T $\gamma\delta$ com reconhecimento nominal do antígeno (RUDD *et al.*, 2001). Isso pode levar a indicar que os sítios de glicosilação estariam favorecendo a apresentação antigênica e talvez estimulando outras células apresentadoras de antígeno como as T $\gamma\delta$ de importância preponderante para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa em bovinos (PRICE *et al.*, 2010).

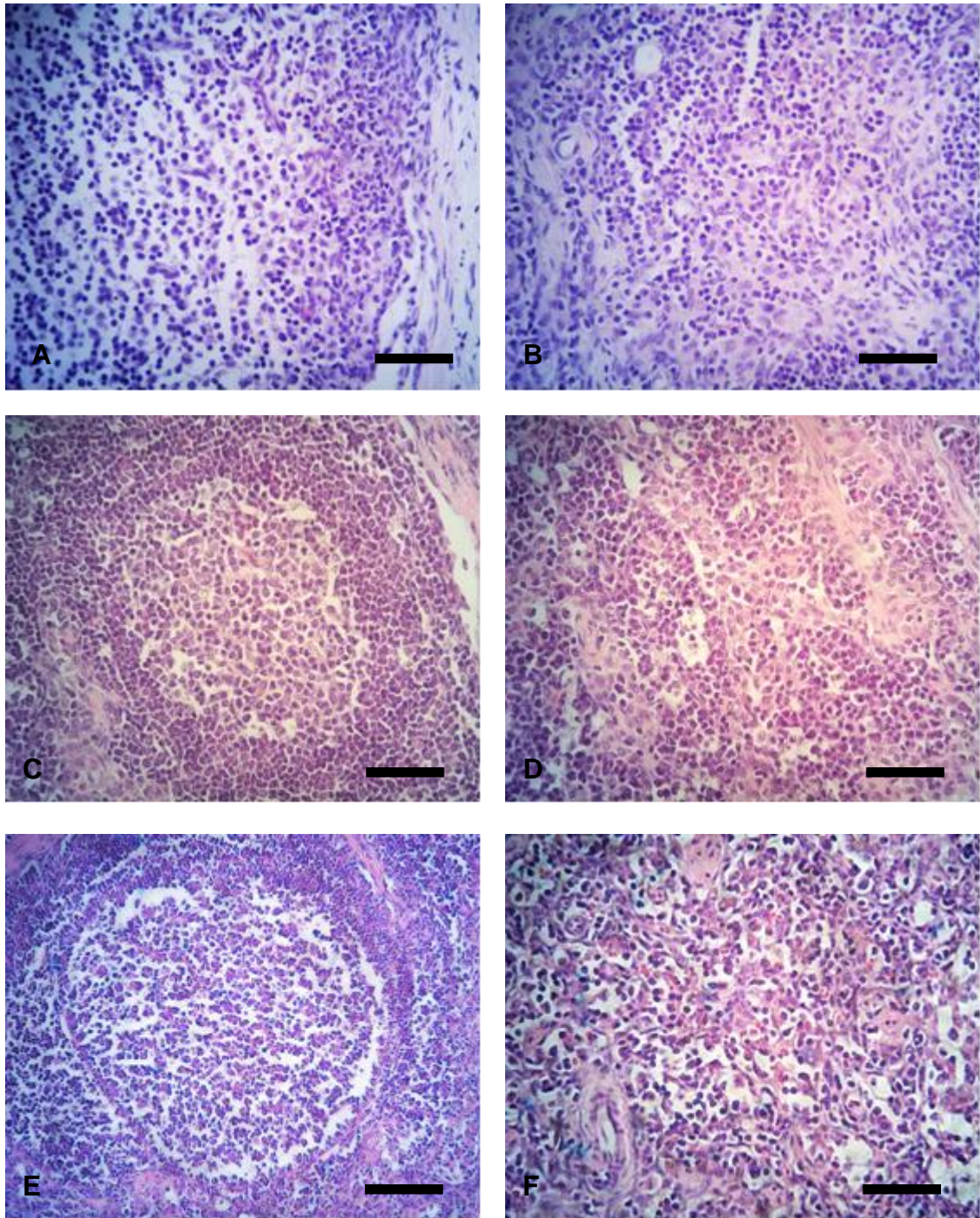


Figura 2. Microfotografia de linfonodos de Bovinos. H&E. Barra de escala de 50 μ m (A) região paracortical 15 dias após imunização com *rBmseq4*. (B) Cordões medulares (CM) 15 dias após imunização com *rBmseq4*. (C) Centro Germinal (CG) 35 dias após imunização com *seq4*. (D) CM 35 dias após imunização com *seq4*. (E) CG 45 dias após imunização com *rBmseq4*. (F) CM 45 dias após imunização com *rBmseq4*.

Pela coloração diferencial de H&E, foram observados outros achados relevantes aos quinze dias após imunização com o *rBmseq1*. Foi possível determinar hiperplasia dos cordões medulares, com presença evidente de células plasmáticas (Figura 1D). No entanto, nesse mesmo período, os tecidos dos animais imunizados com a *rBmseq4*, apresentaram baixa hiperplasia da região medular (Figura 2 B).

Tendo em conta as observações anteriores, a proliferação das células B locais (blásticas) nas respostas T-dependente, antes da diferenciação em células plasmáticas de curta duração (PBs) e células plasmáticas de longa duração (PCs), pode passar por duas vias de diferenciação celular: a via extrafolicular que fornece uma onda inicial de PCs (> 3 dias), e a via folicular que fornece uma onda tardia e bem sustentada de PCs (> 7 dias), que tipicamente produz anticorpos de maior afinidade (MACLENNAN *et al.*, 2003; TARLINTON *et al.*, 2008). Em concordância com esses achados, ALLEN *et al.* (2007b) demonstraram que após a interação entre as células T e B na zona T do linfonodo, algumas células se diferenciam em células de curta duração formadoras de anticorpos, porém, outras células B ativadas junto com algumas células T antígenos afins migram aos folículos para formar os centros germinais CGs. O que indica que pode ocorrer uma forte indução de células plasmáticas de alta afinidade com o *rBmseq1*, entretanto, essas pesquisas sugerem a plausível formação de células de curta duração com o *rBmseq4* no primeiro momento imune.

As PBs cíclicas são as precursoras das PC, as PBs são altamente migratórias e se movimentam desde fora da zona T aos cordões medulares dos linfonodos (CYSTER, 2003). Nesse local, as células PBs se diferenciam em células PC não cíclicas que residem por vários dias antes de entrar em apoptose. No entanto, as células plasmáticas PC derivadas dos CGs saem desse local como PBs para a medula óssea ou para as superfícies de mucosas onde persistem por vários anos, e mantêm a memória humoral (LUTHER, 2010).

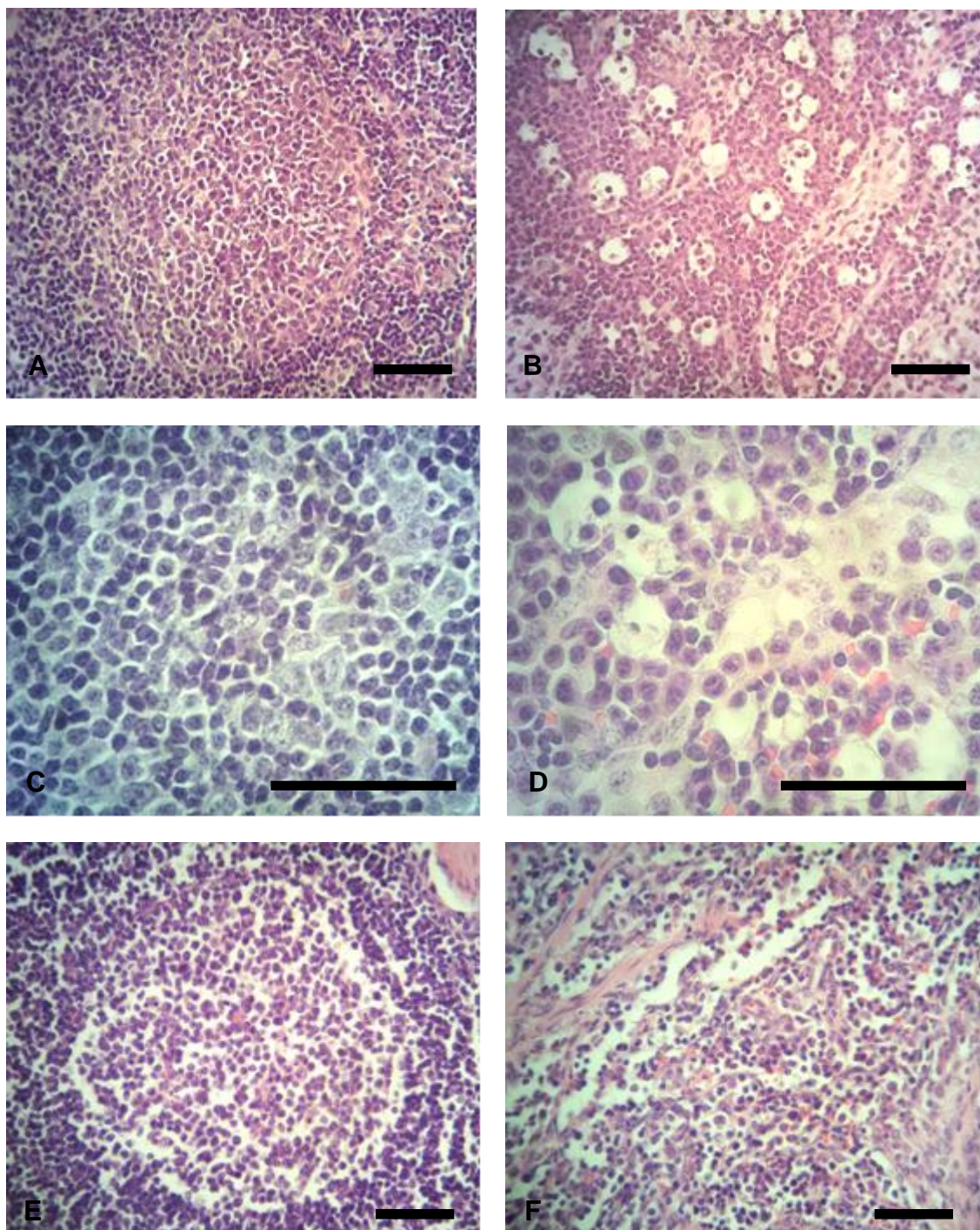


Figura 3. Microfotografia de linfonodos de Bovinos imunizados com *rBmseq1*. H&E. Barra de escala de 50 μ m. (A) Centro germinal (CG) 35 dias após imunização. (B) Cordões medulares (CM) 35 dias após imunização. (C) Detalhe CG 35 dias após imunização. (D) Detalhe CM 35 dias após imunização. (E) CG 45 dias após imunização, 320 μ m. (F) CM 45 dias após imunização.

Ao analisar os cortes de linfonodos pela coloração diferencial H&E trinta e cinco dias após a primeira imunização, nos animais imunizados com a *rBmseq1* foi observado diminuição da reação de CGs com abundante presença de monócitos na região cortical e paracortical, incluindo a região clara e escura dos CGs (Figura 3 A e C). Além disso, através da histomorfometria foi revelada diminuição do tamanho dos CGs (Gráficos 1 e 2).

Embora isso, nos cordões medulares, na região próxima a zona T, se observou corpos apoptóticos com abundante presença de monócitos (Figura 3 B e C). No entanto, nos cortes histológicos dos animais imunizados com a *rBmseq4*, foi evidenciado uma forte reação de CGs delimitados por uma população linfocítica (Figura 2C). Adicionalmente, foi observada hiperplasia dos cordões medulares, com presença evidente de células plasmáticas (Figura 2D).

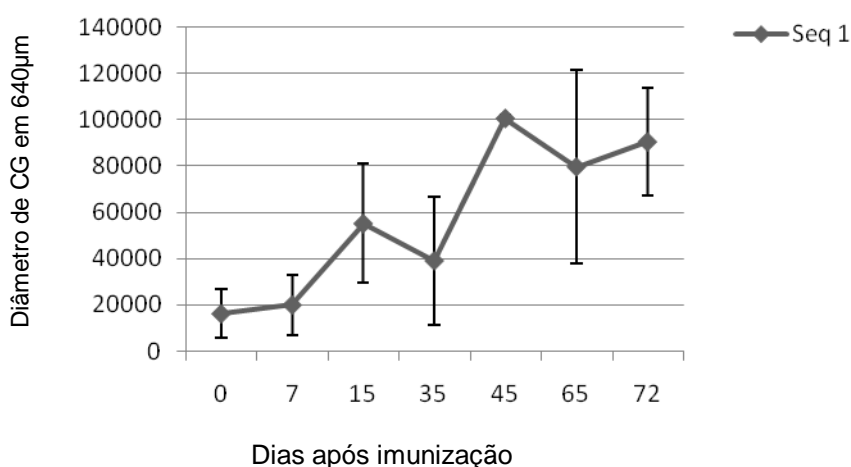


Gráfico 1. Histomorfometria de Centros Germinais (CG) com campo de 640µm de linfonodos de bovinos. Média de diâmetros e desvios padrões de CG após imunização com *rBmseq1*.

Levando em consideração que a segunda imunização se realizou trinta dias após a primeira, HENRICKSON & VON ADRIAN (2007) sugerem que pode ser considerado como “dose” de antígeno recebido por uma célula T a

soma de muitas variáveis, incluindo a densidade do antígeno apresentado pelas DCs, a afinidade do antígeno para o TCR e a duração da disponibilidade antigênica. Em conformidade com esses estudos, foram sugeridas maior densidade antigênica, maiores possibilidades de agregação e maiores pontos de glicosilação para o peptídeo *rBmseq1*, os quais se relacionaram com o plausível surgimento de interações de longa duração, como também, com o possível favorecimento da apresentação antigênica e o estímulo de outras células apresentadoras de antígeno como as T $\gamma\delta$. Isso sugere que as possíveis propriedades inerentes do peptídeo *rBmseq1* lhe conferem capacidades de estímulo imunológico comparado com o peptídeo *rBmseq4*, porém, não sugere capacidade de manter a sinal imunológica.

Não obstante, um velho conceito do estado biológico das células T, afirma que níveis antigênicos sobre o limite superior pode induzir tolerância, causada pela interrupção de respostas efetoras desencadeadas pela ativação da morte celular induzida (CRITCHFIELD *et al.*, 1994). Os pesquisadores reportaram ainda, que a apoptose induzida por doses altas, apresenta uma sequência de eventos que sugere, que após da ativação das células T e a síntese de citocinas de crescimento, se segue pela progressão do ciclo celular e finalmente o reengajamento do TCR.

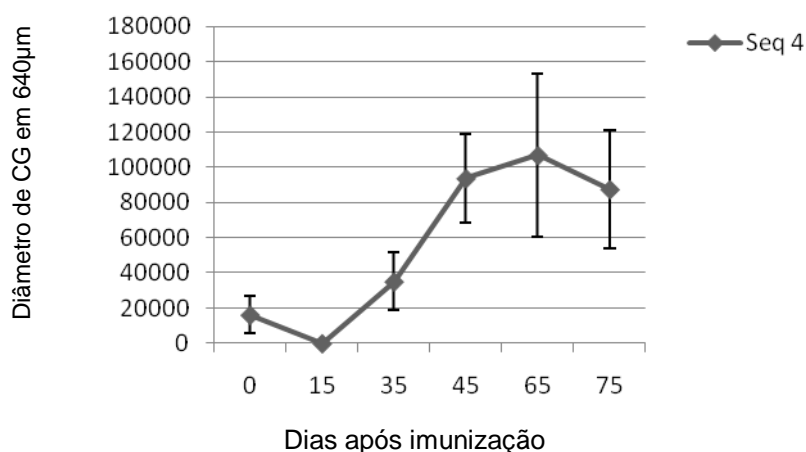


Gráfico 2. Histomorfometria de Centros Germinais (CG) com campo de 640µm de linfonodos de bovinos. Média de diâmetros e desvios padrões de CG após imunização com *rBmseq4*.

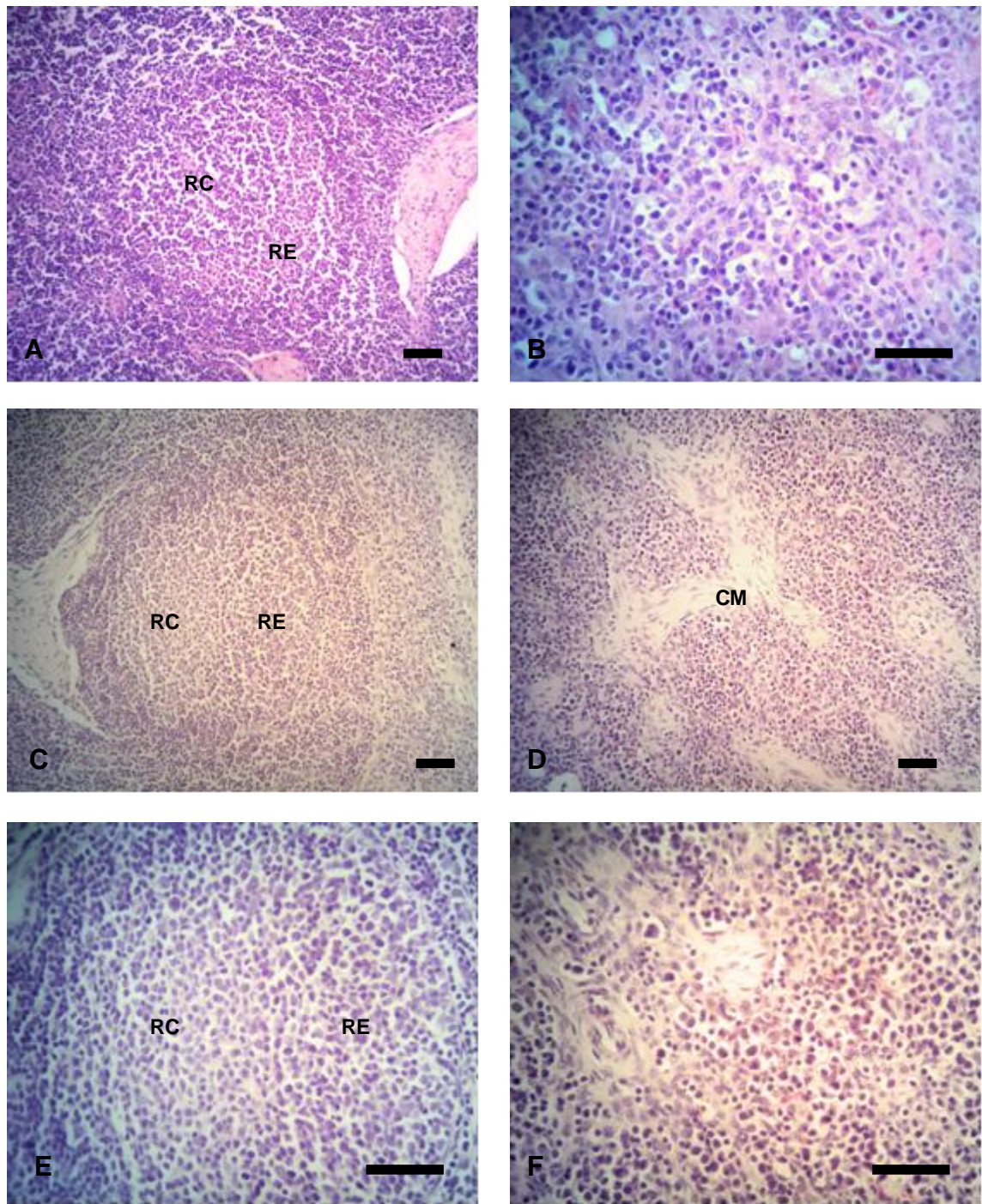


Figura 4. Microfotografia de linfonodos de Bovinos imunizados com *rBmseq4*. H&E. Barra de escala de 50 µm. (A) Centro Germinal (CG) 65 dias após imunização. (B) Cordões medulares (CM) 65 dias após imunização. (C) Centro Germinal (CG) 75 dias após imunização. (D) CM 75 dias após imunizaçã. (E) Detalhe CG 75 dias após imunização. (F) Detalhe CM 75 dias após imunização.

Essas sequências de eventos podem ajudar a explicar a presença de monócitos nos CGs e a existência de corpos apoptóticos cinco dias após a segunda imunização com o *rBmseq1*. Não obstante, ANDERSON & WRAITH (2002) afirmaram que há uma relação inversa entre a dose antigênica e a afinidade de TCR: baixas afinidades dos TCRs podem resultar de altas doses antigênicas, e vice versa.

ROTHOEFT *et al.* (2006) demonstraram que células DCs maduras e ativadas com altas doses de antígeno se polarizaram em maior afinidade para as células T, permitindo o estabelecimento de interações de longa duração e a montagem de uma resposta proliferativa, com uma forte indução de IFN- γ . No entanto, em presença de baixas quantidades de antígeno, se estabeleceram interações de curta duração, se reduziu a polarização das DCs e se diminuiu a produção de IFN- γ . Porém, vários estudos sugerem que as interações estáveis entre as células T e DC são necessárias, mas não são suficientes para uma ótima ativação das células T (BOUSSO, 2009). Além disso, HUGUES *et al.*, (2004) sugerem que contatos estáveis das células T são requeridos para a ativação celular, não obstante, posteriores interações breves entre as células DC-T são características da indução de tolerância celular.

Tendo em conta as análises de HUGUES *et al.* (2004) pode-se explicar a indução de apoptose nos linfonodos cinco dias após a segunda imunização com *rBmseq1*. Esses autores demonstraram que, apesar da primeira via resultar em contatos individuais de longa duração entre as DC-T, várias sinais breves liberadas pelas DCs podem resultar em indução de tolerância das células T. Além disso, DAVIS (2009) relatou que ilhas de células T reg foram observadas interagindo com as DCs, alterando a dinâmica das interações entre as células T CD4⁺ e DCs. Assim, os mecanismos da função das células T reg variam de acordo com as circunstâncias, e alteram a dinâmica das interações entre as células T e DCs, o que pode ser uma forma de estabelecer tolerância antigênica.

HUGUES *et al.* (2004) afirmaram que algumas DCs totalmente maduras e apresentadoras de antígeno, podem ser suficientes para a ativação celular, no entanto, para a indução da tolerância periférica podem se requer um numero maior de DCs apresentadoras de antígeno. Entretanto, as funções das células T $\gamma\delta$ de bovinos permaneçam pouco definidas, se menciona que possuem capacidade de reconhecer antígenos protéicos (WELSH *et al.*, 2002), de apresentarem antígenos às células T CD4⁺ (COLLINS *et al.*, 1998) e de participarem na maturação das células dendríticas (LESLIE *et al.*, 2002). Sugerindo, que está população celular pode estar envolvida na indução de apoptose observada no experimento.

Não obstante, observações feitas em camundongos não relataram presença significativa de corpos apoptóticos ao utilizar o peptídeo *rBmseq1* (TAFUR, 2009). Além disso, as células T $\gamma\delta$ murinas se relacionaram com regulação imune, modulação de respostas autoimunes e homeostasia epitelial (CHEN & LETVIN, 2003). As células T $\gamma\delta$ de bovinos jovens compreendem mais do setenta por cento dos leucócitos circulantes e se implicaram na resposta adaptativa desta espécie (PRICE *et al.*, 2010).

Por outro lado, o aparecimento de estruturas que conferem imunidade aos trinta e cinco dias após imunização com o peptídeo *rBmseq4*, sugere interações transitórias. Durante esses contactos, as células T não param completamente, porém, rolam na superfície das DCs e se afastam rapidamente. Ao repetir esse processo, as células T podem se ligar em cortas interações seriadas com várias DCs (BREART & BOUSSO, 2006). Além disso, vários estudos notaram que as interações transitórias foram mais relevantes ao início da resposta para um antígeno, seguidas pela formação de conjugados estáveis entre as células T-DC (HUGES *et al.*, 2004; MILLER *et al.*, 2004). Somado ao anterior, HENRICHSON *et al.* (2008) observaram que, na fase inicial de ativação das células T, as células T CD 8⁺ formaram interações transitórias com as DCs ao receber baixas

concentrações peptídicas, porém, estabeleceram contatos estáveis com as DCs quando receberam maiores quantidades de peptídeo. Isso pode ajudar a entender o aparecimento de estruturas que conferem imunidade cinco dias após a segunda imunização com o *rBmseq4*.

Observações realizadas neste experimento mostram que, há um incremento da resposta adaptativa com os dois peptídeos aos 45 dias após imunização (Gráfico. 1 e 2. Figura. 2E e F. Figura. 3E e F). Em relação com esses achados, PATARROYO *et al.* (2009) com o peptídeo SBm7462[®] observou crescimento da resposta adaptativa depois da diminuição em sangue periférico das células T $\gamma\delta$ WC1⁺, sugerindo que estas células podem ter um papel duplo que promova a resposta imune adaptativa ao SBm7462[®]. Além disso, ROGERS *et al.* (2005) sugere que a ativação das células T $\gamma\delta$ em bovinos, pode ser especialmente útil para direcionar respostas imunes adaptativas com vacinas de subunidades. Adicionalmente, PRICE *et al.* (2010) indica que estas células podem ter um papel significativo na resposta imune adaptativa através de interações iniciais com as células dendríticas DCs, resultando na secreção de quantidades significativas de IFN γ .

Os achados deste experimento aos cinco dias após a terceira imunização, corroboraram a presença de estruturas que conferem afinidade e memória imunológica com o peptídeo *rBmseq4* (Figura. 4), sugerindo, que o imunógeno se encontrou na densidade apropriada para estimular e manter a sinal imunológica. Entre tanto, observações feitas neste mesmo período, demonstram que houve uma diminuição de tamanho dos CGs após imunização com o *rBmseq1* (Gráfico. 1 e 2. Figura. 5A e B). Esses achados sugerem uma relação com as observações realizadas cinco dias após a segunda imunização com o mesmo peptídeo. O que demonstra que pode ser provável uma redução da resposta imune com a reestimulação. Em relação ao anterior, CRITCHFIELD *et al.* (1994) mencionaram que altas doses de antígeno paradoxalmente podem suprimir a resposta imune. Segundo eles, a redução da resposta imune produzida por altas doses de

antígeno, é um tipo de tolerância denominada supressão de dose elevada ou tolerância de zona alta, o que envolve mecanismos extratímicos na maturação dos linfócitos T.

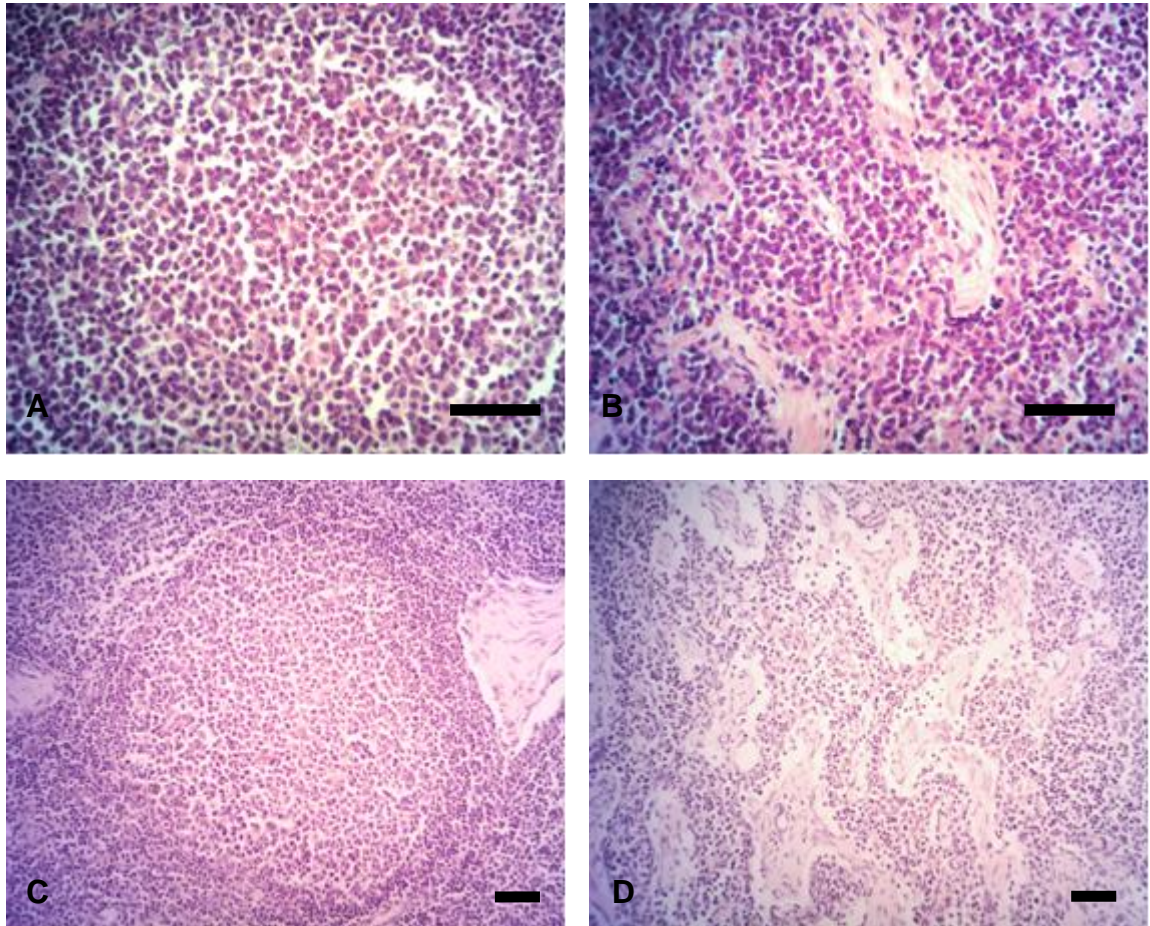


Figura 5. Microfotografia de linfonodos de Bovinos imunizados com *seq1*. H&E. Barra de escala de 50 μ m. (A) Centro germinal (CG) 65 dias após imunização. (B) Cordões medulares (CM) 65 dias após imunização, 320 μ m. (C) CG 72 dias após imunização. (D) CM 72 dias após imunização.

Por outro lado, os achados da histomorfometria nos animais imunizados com o extrato bruto de *P. pastoris* revelaram que houve um crescimento do tamanho dos centros germinais quinze dias após a segunda imunização, porém diminuiram de tamanho cinco dias após a terceira imunização (Gráfico. 3). Essas observações sugerem que o extrato bruto de

P. pastoris pode ter um potencial adjuvante. No entanto, estudos subseqüentes são necessários para comprovar sua eficácia

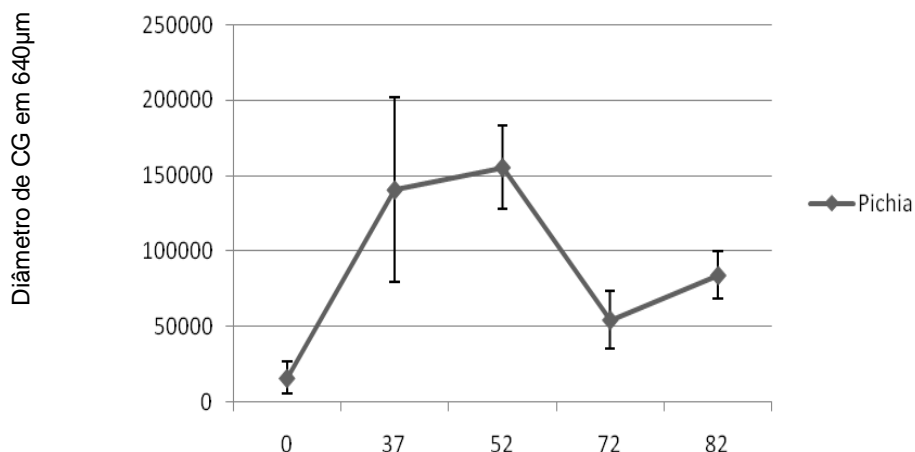


Gráfico. 3

Histomorfometria de Centros Germinais (CG) com campo de 640µm de linfonodos de bovinos, após segunda imunização com estrato bruto de *Pichia pastoris*.

5.2. Imunohistoquímica para detecção dos peptídeos *rBmseq1* e *rBm seq4*

Nos animais imunizados com o peptídeo *rBmseq1* foram encontradas células PAP positivas nos CGs e nos cordões medulares sete dias após imunização (Figura. 6A e B). Cinco dias após a segunda e terceira imunização foi observada uma forte marcação das células PAP na região paracortical (Figura. 6C e D). Além disso, foi possível observar forte marcação nos cordões medulares, cinco dias após a terceira imunização (Figura. 6E).

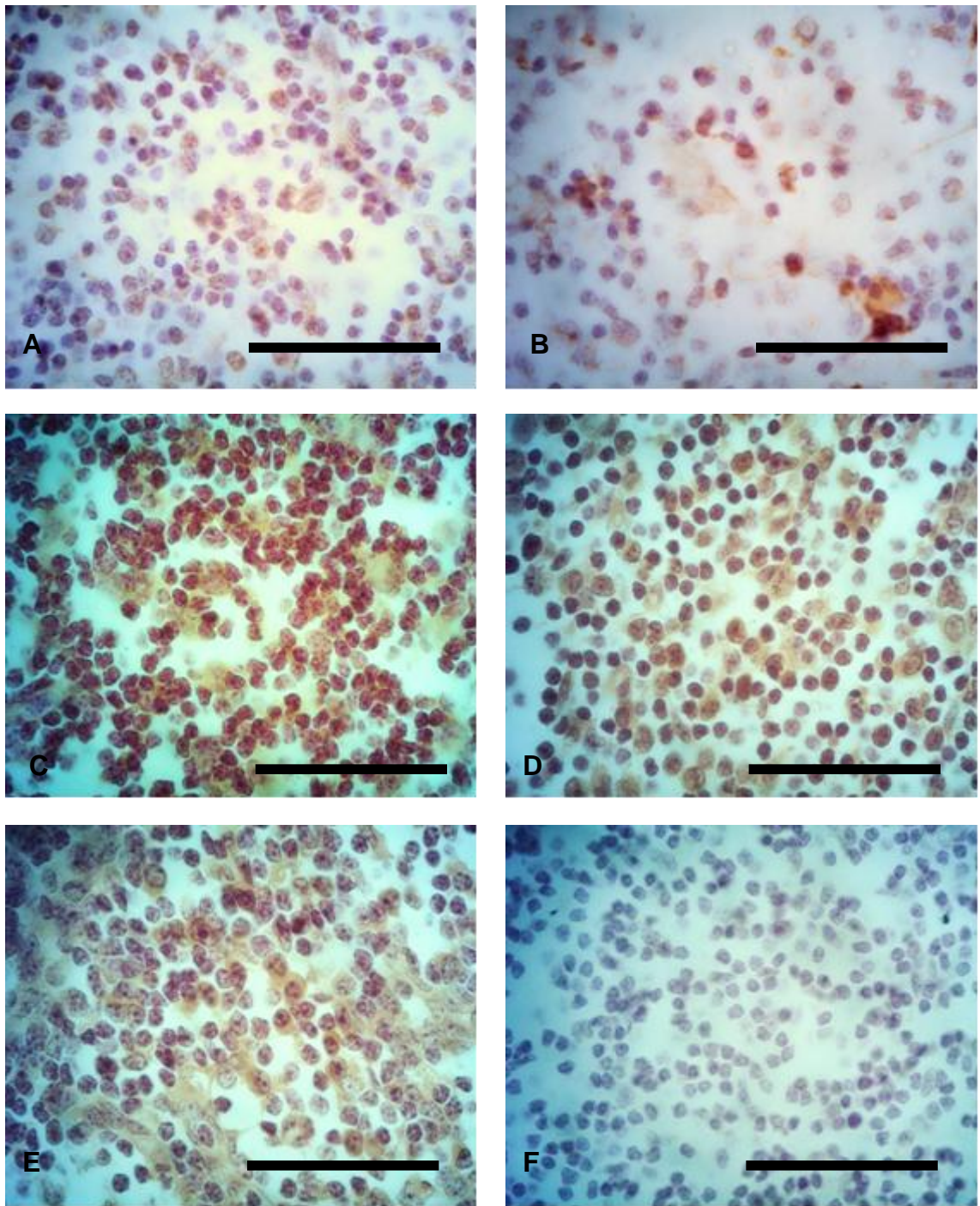


Figura. 6 Microfotografia de linfonodos bovinos imunizados com *rBmseq1* pela técnica Peroxidase – Anti – Peroxidase (PAP). Barra de escala de 50 μ m. (A) Células PAP em Centro Germinal (CG) sete dias após imunização. (B) Células PAP em Cordões Medulares (CM) sete dias após imunização. (C) Células PAP na região Paracortical (PC) 35 dias após imunização. (D) Células PAP na região PC 65 dias após imunização. (E) Células PAP em (CM) 65 dias após imunização. (F) Controle negativo.

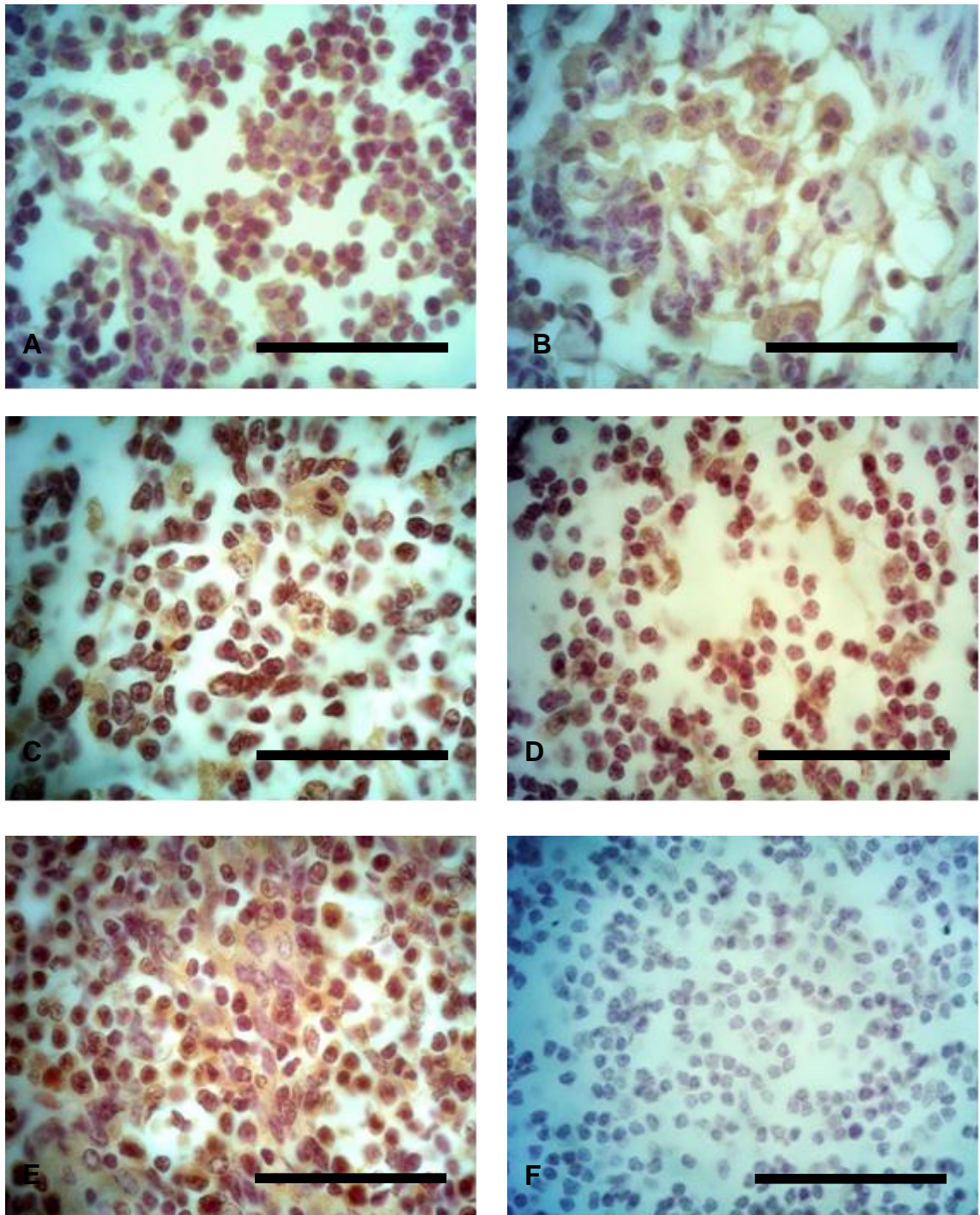


Figura. 7 Microfotografia de linfonodos bovinos imunizados com *rBmseq4* pela técnica Peroxidase – Anti – Peroxidase (PAP). Barra de escala de 50 μm . (A) Células PAP na região paracortical 15 dias após imunização. (B) Células PAP em Cordões Medulares (CM) 15 dias após imunização. (C) Células PAP em Centro Germinal (CG) 35 dias após imunização. (D) Células PAP na região paracortical 65 dias após imunização. (E) Células PAP em CM 35 dias após imunização. (F) Controle negativo.

Nos animais imunizados com o peptídeo *rBmseq4* foram encontradas células PAP positivas na região paracortical e nos cordões medulares desde os 15 dias após imunização (Figura 7 A e B). Também foram encontradas células PAP positivas nos CG aos 5 dias após a segunda e terceira imunização (Figura. 7C e D). Neste mesmo período, houve uma forte marcação dos cordões medulares. (Figura 7E).

As células PAP positivas observadas durante os primeiros eventos de resposta imune sugerem, que os peptídeos recombinantes foram capturados e retidos pelas células DCs, transportados através da rede do *conduit* para realizarem interações iniciais com as células T. Explicando a hiperplasia observada nas áreas de resposta T-dependentes. De acordo com RANDOLPH *et al.* (2005) as DCs são altamente móveis e estão posicionadas na periferia como sentinela, frequentemente encontram antígenos estranhos, e se deslocam rapidamente para os órgãos linfóides secundários, particularmente linfonodos, onde se posicionam de maneira ideal ao encontro com as células T *naive* ou de memória central. O tráfego das DCs para os linfonodos através dos vasos linfáticos aferentes é fundamental para o exercício das suas funções. Além disso, as DCs que transportam antígenos pela drenagem linfática para o linfonodo, não estão associadas com os condutos FRC. Essas células penetram à região paracortical e se congregam ao redor HEVs (BAJENOFF *et al.*, 2006).

Não obstante, WILLARD-MACK (2006) mencionaram que as áreas das células T em linfonodos são permeadas por uma rede de ramificações de fibras de colágeno, revestida por células estromáticas conhecidas como FRCs. Além disso, HENRICKSON & VON ANDRIAN (2007) indicam que os canais microscópicos formados pelas células FRCs são acessíveis a pequenas moléculas no seio subcapsular, os quais estabelecem um *conduit* pelo qual os antígenos transportados na linfa e as moléculas bioativas são transportados às imediações das HEVs na região cortical. Em relação isto, algumas células dendríticas endógenas estão fortemente associadas com a

rede estromal e coletam antígenos transportados dos condutos de FRCs (SIXT *et al.*, 2005).

A forte marcação observada na região paracortical cinco dias após a segunda e terceira imunização com o *rBmseq1*, sugere aumento de intensidade e velocidade da resposta ao antígeno, que pode se dever, ao processo de maturação das células dendríticas ocorrido entre a primeira e a segunda imunização. Essa sugestão se relaciona com as observações realizadas por BENVENUTI, *et al.* (2004) em relação ao estado de maturação das células dendríticas, que demonstraram através dum estudo *in vitro* que as DCs imaturas estabelecem contatos mais curtos que as DCs maduras. Além disso, os contatos de longa duração sugerem interações posteriores de curta duração com capacidade de induzir tolerância imune.

Tendo em conta que a metodologia de PAP não permite diferenciar os diferentes tipos de células apresentadoras de antígeno, é provável que entre a forte marcação descrita anteriormente, estejam envolvidas células T $\gamma\delta$ WC1 ou linfócitos B capacitados na apresentação antigênica (ALLEN, 2007b). Foi descrito que as células T $\gamma\delta$ WC1 além de estar envolvidas no reconhecimento e apresentação antigênica estão relacionadas com o amadurecimento das células dendríticas (LESLIE *et al.*, 2002) o que as relacionaria com a indução de fortes interações entre as DC-T.

Por outro lado, a forte marcação observada nos cordões medulares cinco dias após a segunda imunização com o *rBmseq4* se relaciona, com as observações realizadas por PATARROYO *et al.* (2009), sugerindo crescimento dos cordões medulares e aumento da expansão clonal de alta afinidade nas células B. A presença de células PAP positivas, somada à formação CGs de alta afinidade com o *rBmseq4*, explica o *continuum* da resposta imune, indicando a existência de uma expansão clonal de alta afinidade além dos CGs.

O uso de saponina como adjuvante ajuda a captura dos peptídeos pelas DCs, para o início da resposta imune (ROSENTHAL & ZIMMERMAN, 2006). Além disso, foi sugerido por PORTELA (2000) que a hidrofobicidade é um fator importante para os imunógenos que usam a saponina como adjuvante.

6. CONCLUSÕES

- A resposta induzida pelos peptídeos recombinantes foi caracterizada nos tecidos linfóides pela formação de estruturas que conferem afinidade e memória imunológica.
- Pela imunoistoquímica com diferentes níveis de imunomarcacão foi possível detectar os peptídeos recombinantes no decorrer do experimento.
- Existe uma resposta imune preponderante ao desenvolvimento da imunidade nos bovinos imunizados com o peptídeo *rBmseq4*.

CAPITULO II

ALTERAÇÕES HISTOLOGICAS DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) INDUZIDAS POR DOIS PEPTÍDEOS RECOMBINANTES DERIVADOS DO PEPTÍDEO SINTETICO SBm7462[®]

TAFUR GÓMEZ, Gabriel Andres M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Imunização de bovinos com dois peptídeos recombinantes derivados do peptídeo sbm7462[®]. Resposta de linfonodos e alterações histológicas do intestino do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (canestrini, 1887)** Orientador: Joaquín Hernan Patarroyo Salcedo. Co-orientadores: Marlene Isabel Vargas Vilorio e Sidimar Sossai.

RESUMO - O processo de vacinação é o método que apresenta a melhor relação custo-benefício para prevenir perdas econômicas e aumentar a qualidade de vida tanto na saúde animal como na saúde pública. A dependência exclusiva de compostos químicos para o controle do *Rhipicephalus microplus* tornou-se uma das maiores preocupações científicas e econômicas da atualidade, em consequência pesquisas para o desenvolvimento de vacinas vêm adquirido grande relevância. Com o intuito de analisar a eficácia vacinal de bovinos em fêmeas do *R. microplus*, foram desenhados e construídos dois genes sintéticos com base na sequência do peptídeo SBm7462[®] que se expressaram na levedura *Pichia pastoris* cepa Km71. O gene *seq1* foi desenhado com os epítomos imunogênicos repetidos três vezes e o gene *seq4* com a mesma sequência sem repetições. Os peptídeos expressos foram recuperados do meio extracelular, sendo caracterizados por SDS-PAGE e *Western blotting*. Esses peptídeos recombinantes foram inoculados em 05 bezerros *Bos taurus taurus* por sequencia, na dose de 2mg mais 1,5mg de saponina por três vezes com intervalos de 30 dias. Após 28 dias da última imunização, foi feito o desafio com 4500 larvas por animal de *R. microplus* livres de hematozoários e

provenientes da colônia mantida em estufa B.O.D. Aos 21 dias com o começo da caída das fêmeas, foram escolhidas aleatoriamente teleóginas de cada grupo. Através da dissecção se coletaram e fixaram alças intestinais, que foram processadas histologicamente. Os respectivos cortes histológicos dos grupos vacinais *seq1* e *seq4* foram corados com (H&E), giemsa lento e imunistoquímica por imunoperoxidase indireta (IPI). As fêmeas do *R. microplus* alimentadas em bovinos do grupo *seq1* apresentaram conservação da integridade do epitélio intestinal, similar ao grupo controle. No entanto, alças intestinais de teleóginas, alimentadas em bovinos do grupo *rBmseq4* mostraram desnudamento da membrana basal e erosão celular. Somado a isso, através do giemsa lento foi possível observar erosão da membrana basal, vacuolização celular e cromatólise. Na imunistoquímica os vacúolos digestivos apresentaram reatividade com intensa marcação ao soro procedente dos bezerros do grupo *seq4* demonstrando produção de anticorpos anti-proteína total *in situ*. As análises dos parâmetros biológicos mostraram correlação com os achados nos cortes histológicos.

1. INTRODUÇÃO

As perdas de produção resultantes das atividades alimentícias do *Rhipicephalus microplus*, e ao mesmo tempo, os custos que acarretam o controle tanto do parasito como das infecções ele transmitidas, representam o maior bloco de perdas monetárias da indústria bovina. Vários programas de controle do artrópode foram incorporados na moderna produção de gado, a fim de contrariar os efeitos adversos destes carrapatos. O uso de acaricidas químicos atualmente é a estratégia de controle mais utilizada, porém, os resíduos dos acaricidas têm sido implicados tanto com contaminação ambiental como de alimentos de origem animal, além disso, o uso desses químicos induz nos carrapatos o aparecimento de resistência.

Investigações sobre métodos imunológicos para o controle de *R. microplus* foram realizadas em tudo o mundo e constituem uma importante alternativa biológica para evitar os inconvenientes dos produtos químicos. Em muitas espécies, a imunidade adquirida pela infestação de carrapatos reduz mais não impede a parasitemia inclusive após exposição repetida dos carrapatos. Por isso, a resposta imune induzida pelos antígenos expostos não oferece proteção suficiente para serem eficazes (NUTTALL *et al.*, 2006). A baixa imunidade nas infestações naturais foi associada com alta concorrência antigênica, foi demonstrado que durante a infestação por *R. microplus* foram liberados pelo menos 44 antígenos, que desenvolveram respostas imunes independentes (BARRIGA, 1999).

Não obstante as vacinas baseadas em antígenos ocultos se diferenciam notavelmente das vacinas fundamentadas em antígenos expostos, embora os antígenos ocultos não induzam uma resposta imune durante a fixação e alimentação do carrapato, eles induzem imunidade ao

serem inoculados artificialmente. A vacinação com antígenos ocultos induz imunoglobulinas afins que são ingeridas na alimentação do parasito, se for dirigida contra certos antígenos derivados do intestino, os anticorpos interagiram com o antígeno oculto da superfície do intestino causando ruptura do epitélio intestinal (WILLADSEN, 2004).

No presente capítulo, as alterações histopatológicas desencadeadas pela vacinação com os antígenos ocultos *rBmseq1* e *rBmseq4* foram analisadas no intestino do *R. microplus* após o desafio em bovinos *Bos taurus taurus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Relação hospedeiro-parasita

Vários avanços no estudo da imunologia das interações carrapato-hospedeiro permitem elucidar que o tipo de resposta induzida pelo *R. microplus* depende de mecanismos envolvidos na seleção dos artrópodes, o estágio parasitário e a raça bovina infestada (BROSSARD & WIKEL, 2004; RODRIGUEZ-VALLE *et al.*, 2010). Em relação com isto, ainda existe um desconhecimento no que respeita o impacto da seleção de *R. microplus* na modulação da resposta imune.

Somado ao anterior, RODRIGUEZ-VALLE *et al.*, (2010) demonstraram que o *R. microplus*, na hora de se alimentar, expressa proteínas diferencialmente da forma como mudam os estágios de vida. Foi observado que as larvas influenciadas pelo hospedeiro expressaram um número maior de proteínas envolvidas na fixação do carrapato, não obstante, ao progredir a alimentação na fase adulta, um novo conjunto de proteínas foi expresso, incluindo proteínas de ligação de imunoglobulinas e proteínas de cutícula, como também altas expressões com funções similares às expressas durante a fase larval.

Além disso, CARVALHO *et al.* (2010) não estabeleceram o efeito dos diferentes estágios de desenvolvimento do *R. microplus* na hemóstase local *in vivo*, e demonstraram que as infestações destes carrapatos podem alterar o tempo de coagulação do sangue coletado no local de alimentação. Corroborando isso, as propriedades anti-hemostáticas dos compostos da saliva dos carrapatos (MARITZ-OLIVIER *et al.*, 2007).

As variações da resposta imune natural do *R. microplus* com relação à raça foram descritas de forma ampla na literatura. Recentes estudos demonstraram diferenças significativas da expressão genética em ligação com a resposta imune induzida pelos artrópodes, tanto nos hospedeiros adaptados (*Bos indicus*) como em suscetíveis (*Bos taurus*). Além disso, PIPER *et al.* (2010) demonstraram em bovinos Holstein-Friesain e Brahma que a expressão genética e a histologia dos cortes da pele diferem durante a fixação das larvas de *R. microplus*, sugerindo que a secreção de imunoglobulinas na pele de bovinos Holstein-Friesain infestados por carrapatos, em presença do complemento e células inflamatórias, podem agir para estabelecer uma patologia crônica que facilita a alimentação do carrapato. Segundo os pesquisadores, essa resposta inflamatória crônica dos hospedeiros suscetíveis se diferencia da hipersensibilidade dos hospedeiros *B. taurus* como foi reportado em estudos prévios.

Entretanto, CONSTANTINOIU *et al.* (2010), ao colocarem maior número de larvas do *R. microplus* em animais *B. indicus* que em animais *B. taurus*, só observaram lesões nos bovinos *B. taurus*, sugerindo que as células T $\delta\gamma$ além de ter um rol na resistência, podem ter um papel na diminuição do processo de inflamação e preservação da homeostase da pele em *B. indicus*. Adicionalmente, os pesquisadores observaram infiltração granulocítica de forma preponderante em *B. taurus*, o que sugeriu uma associação de longo prazo entre o ectoparasito e os bovinos *B. indicus* que induziu desenvolvimento de tolerância de adaptação. Isto em concordância com PIPER *et al.* (2010), demonstra que essa tolerância se caracteriza por uma resposta inflamatória menos vigorosa no local de fixação das larvas em bovinos *B. indicus*, que inclui, redução do fluxo tecidual e granulócitos na lesão, o que reduz o êxito da alimentação do carrapato.

Levando em conta que o sucesso da alimentação do *R. microplus* depende do tipo resposta imune induzida pelo hospedeiro, mecanismos de evasão da resposta imune do parasito foram identificados em diferentes

espécies de carrapatos, foram citados fatores imunossupressores, inibidores do sistema de complemento, citotoxicidade de células T, resposta inflamatória e interleucinas (BARRIGA, 1999). Além disso, foi demonstrado que a evasão da resposta imune pelo carrapato permite infecção de patógenos vetorizados (WIKEL, 1999). No entanto, a falta de contato entre os antígenos ocultos e o sistema imunológico dos bovinos, deixa o carrapato sem possibilidade de desenvolver mecanismos de evasão da resposta imune contra esses antígenos, por conseguinte a resposta imune induzida pelos antígenos ocultos será mais eficiente que a resposta provocada pelos antígenos expostos (WILLADSEN, 2004).

3.2. Indução de alterações intestinais com antígenos ocultos

Diferentes antígenos ocultos dos carrapatos foram descritos. No entanto, os antígenos derivados do intestino tiveram maior preponderância no desenvolvimento de vacinas. A vacinação com antígenos ocultos induziu imunoglobulinas que quando foram ingeridas pelo parasito, tiveram capacidade de interagir com o antígeno oculto da superfície do intestino, originando ruptura do epitélio intestinal (WILLADSEN, 2004). Além disso, a digestão do carrapato ocorre nas células do intestino médio por um processo denominado heterofagia. Como resultado, algumas imunoglobulinas passam intactas desde o intestino médio ao hemocele, onde pode ocorrer adsorção de imunoglobulinas na hemolinfa, essas imunoglobulinas podem agir com os órgãos internos produzindo danos no carrapato (WANG & NUTTALL, 1999).

Antígenos derivados de Bm86 e Bm95 na forma recombinante geraram imunoglobulinas, que após alimentação interagiram com a parede do intestino, causando lise intestinal, interferiram com a digestão e a subsequente produção de ovos. Além disso, fortes respostas de anticorpos foram prejudiciais para a sobrevivência de carrapatos adultos sem induzir hipersensibilidade. No entanto, a imunidade protetora induzida por esses

antígenos foi de curta duração e as vacinações de manutenção foram requeridas por intervalos de seis meses (NUTTAL *et al.*, 2006).

3.3. A vacina recombinante rSBm7462

Baseando-se nos estudos de predição computacional de sítios imunogênicos da proteína Bm86, se desenharam três sequências peptídicas denominadas 4822 (aa. 398-411), 4823 (aa. 132-145) e 4824 (aa. 132-145). A junção dessas sequências na ordem descrita originou o peptídeo sintético SBm7462[®], cuja eficácia foi comprovada em bovinos (PATARROYO *et al.*, 2002).

Com a idéia de resolver os problemas da síntese química do peptídeo SBm7462[®], SOSSAI (2009) utilizou quatro genes que foram desenhados tendo como base a sequência de aminoácidos desse imunógeno. Esses genes foram otimizados para uso na levedura *Pichia pastoris* Km71 e clonados no vetor de expressão extracelular pPic9. Posteriormente, os ensaios laboratoriais e vacinais mostraram que os peptídeos recombinantes conservavam as características do peptídeo sintético. Além disso, a produção recombinante dos imunógenos pela fermentação em leveduras se mostrou como uma estratégia promissória para garantir grandes volumes vacinais a baixo custo. (SOSSAI, 2009).

3. OBJETIVOS

3.4. Objetivo geral.

Analisar as alterações histológicas do *Rhipicephalus microplus* provocadas pela imunização de bovinos com dois peptídeos recombinantes expressos em *Pichia pastoris*.

3.5. Objetivos específicos.

Avaliar as alterações histológicas presentes no intestino dos carrapatos devido ao repasto sanguíneo em animais vacinados com os imunógenos.

Análise do reconhecimento da proteína Bm86 íntegra com o soro dos animais imunizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Desafio.

Após 21 dias da última inoculação, os animais foram desafiados com larvas de *R. microplus* livres de hematozoários, provindas de colônia mantida em estufa B.O.D., na quantidade de 1.500 larvas por dia, durante três dias. O desafio seguiu o seguinte esquema:

Dia 1 - Região do peito e barbela

Dia 2 - Região escapular e entre os membros anteriores

Dia 3 - Região escrotal e adanal.

Os animais foram avaliados a partir do 7º dia após o desafio quanto ao volume globular e quanto à presença de hemoparasitos, através de teste de hematócrito e esfregaço sanguíneo corado pelo método de Giemsa.

4.2. Histologia do intestino de carrapatos.

Com a finalidade de se avaliar os efeitos da ligação de anticorpos anti-Bm86 com as células do epitélio intestinal do carrapato *R. microplus*, realizou-se a dissecação de teleóginas desprendidas dos animais dos grupos do experimento e posterior obtenção de cortes histológicos do intestino de cada carrapato.

Aos 21 dias com o começo da caída das fêmeas, foram escolhidas aleatoriamente cinco teleóginas por grupo. Estas foram submetidas a metodologia de dissecação proposta por MORA HERNANDEZ (1996), e

modificada para as condições do LBCHV. As teleóginas foram inoculadas com 0,4ml de formaldeído 10% através dos peritremos e do sulco anal, e deixadas em repouso por 30 minutos. Após esse período, em uma lupa estereoscópica no aumento de 15 vezes, procedeu-se a dissecação, realizando-se uma pequena incisão no sulco marginal, continuando-se essa incisão pelo sulco cervical até o ângulo cervical. As alças intestinais foram separadas com a ajuda de agulhas hipodérmicas e mergulhadas em solução de formaldeído 10% por 5 dias. Após esse período, realizou-se uma rápida desidratação em etanol, diafanização em xilol e inclusão em resina Paraplast.

Esses blocos foram cortados em micrótomo de rotação, na espessura de 4 μ m. Os cortes passaram por rápida hidratação em banhos sucessivos de etanol e foram corados com Hematoxilina-Eosina e Giemsa. Os cortes foram analisados em microscópio ópticos ECLIPSE E600.

4.3. Imunoperoxidase Indireta para detecção de anticorpos anti-proteína Bm86 em cortes de intestino de teleóginas.

Com a finalidade de identificar a presença da proteína Bm86 em cortes de intestino de fêmeas adultas *R. microplus*, utilizou-se o teste de Imunoperoxidase Indireta, aproveitando-se do alto grau de sensibilidade descrito por WERNER *et al.* (1996). Os cortes histológicos de intestino utilizados foram processados com a mesma técnica descrita no item anterior.

Os cortes foram inicialmente deixados para equilibrar em tampão PBS pH 7,6 por 30 minutos. Então, aplico-se peróxido de hidrogênio 6% em água milliQ estéril, para bloqueio de peroxidase endógena, por 30 minutos. Após ligeira lavagem com PBS pH 7,6, cobriram-se os cortes com 100 μ L de soro normal de coelho diluído a 1:20 por 1 hora em temperatura ambiente. Retirou-se então o excesso de soro e secaram-se os cortes levemente, sem lavagem. Em seguida, colocaram-se sobre os cortes os soros teste dos animais do experimento diluídos a 1:40 em PBS pH 7,6 e deixou-se incubar

por 1 hora a temperatura ambiente. Lavaram-se criteriosamente os cortes com três lavagens com PBS pH 7,6 sob agitação e aplicou-se anticorpo secundário, representado por uma IgG de coelho anti IgG bovina conjugada com peroxidase, produzida e conjugada no LBCHV, diluída a 1:200 em PBS pH 7,6 incubando-se por 1 hora a temperatura ambiente. Repetiram-se então as três lavagens com PBS pH 7,6 sob agitação e aplicou-se solução reveladora, constituída de 20 mg de DAB (diamianobenzidine), 100 µL de H₂O₂ em 100 mL de PBS pH 7,6 por 20 minutos. Lavaram-se os cortes duas vezes com PBS pH 7,6 e realizou-se contra-coloração com Hematoxilina de Harris diluída a 1:7 em água destilada. Os cortes foram desidratados em soluções crescentes de etanol e diafanizados em xilol, depois do qual foram cobertos com lamínulas e balsamo do Canadá e observados em microscópio óptico ECLIPSE E600.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Alterações histológicas no epitélio intestinal de *R. micrplus*.

Ao analisar as alterações histológicas dos carrapatos em comparação com o grupo controle, foi encontrada uma forte correlação entre com os achados do grupo controle com as teleóginas que parasitaram os bovinos imunizados com o peptídeo *rBmseq1* (Figura 8A e B). Essas descrições demonstraram pequenos pontos de desnudamento epitelial, que em concordância com os achados prévios, se demonstra que a descamação celular do epitélio intestinal é um processo fisiológico normal que ocorre na digestão (SONENSHINE, 1991).

No entanto, foi possível descrever lesões de forma preponderante nos cortes de teleóginas provenientes dos animais imunizados com o peptídeo *rBmseq4*. Destaca-se a presença de alterações degenerativas no citoplasma e núcleo das células digestivas, acrescentadas de diversos graus de vacuolização no citoplasma dessas células. Além disso, foram observadas áreas com perda de células digestivas, debris celulares no lúmen intestinal e núcleos em degeneração, assim como erosão celular e descontinuidade epitelial, como desnudamento da membrana basal. Da mesma forma, foram observados núcleos livres no lúmen intestinal e uma forte condensação da cromatina (Figura 8C e D).

Essas patologias descritas são muito semelhantes àquelas encontradas por OLIVEIRA (1998) quando utilizou o peptídeo sintético 4912. Também corroboram os achados de PORTELA (2000), que utilizou o peptídeo sintético SBm7462[®] em microscopia óptica. No entanto, as alterações descritas em decorrência da resposta imune induzida pelo

rBmseq4 inferem uma ação patológica no epitélio intestinal, que concordam com as descrições realizadas por WILLADSEN (2004) quando se refere à ruptura do epitélio intestinal dos carrapatos pela interação com as imunoglobulinas induzidas pela vacinação com antígenos ocultos.

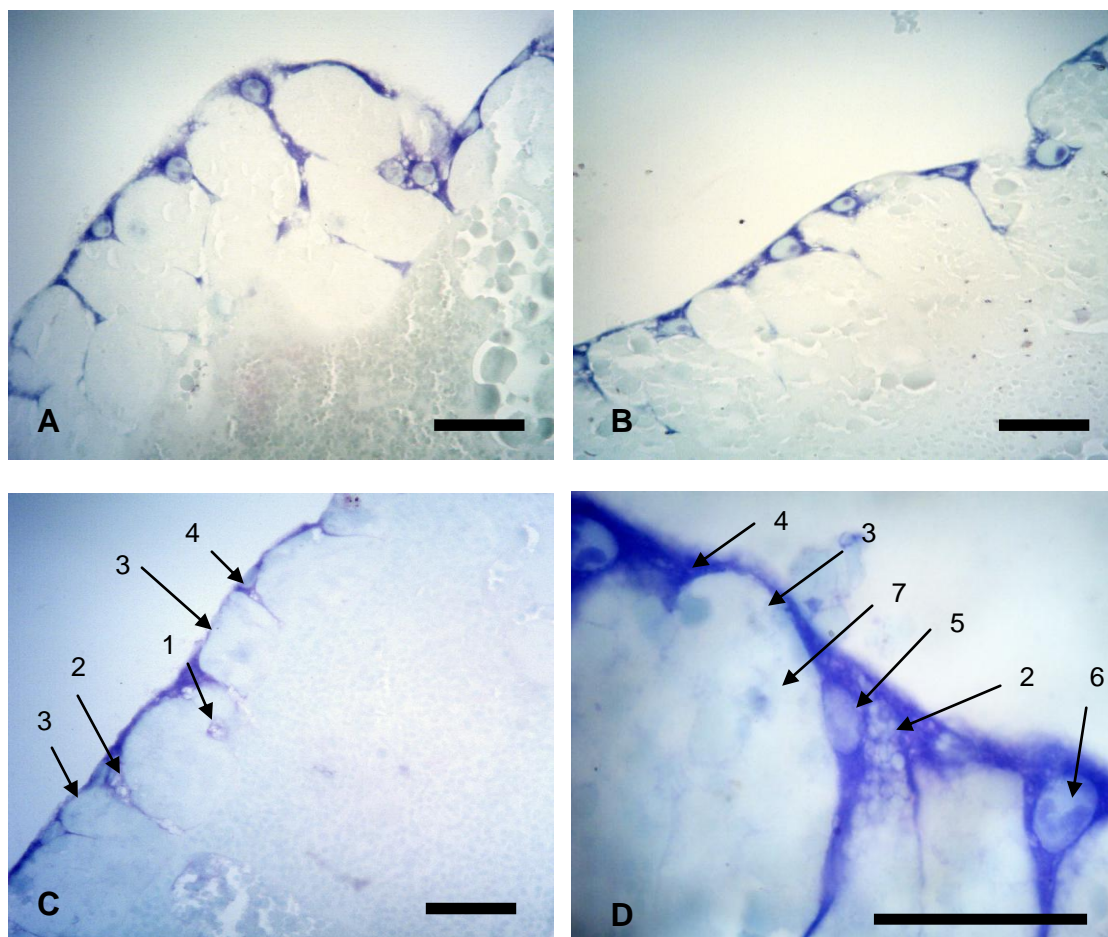


Figura 8. Epitélio intestinal de *Rhipicephalus microplus*, coloração de Giemsa lento. Barra de escala de 50 μ m. (A) sem decorrência da resposta imune. (B) Células intestinais após imunização com *rBmseq1*. (C) Células intestinais após imunização com *seq4*. (D) Detalhe das células intestinais após imunização com *rBmseq4*. (1) Desprendimento de núcleo. (2) Vacuolização citoplasmática. (3) Erosão de membrana basal. (4) Erosão celular. (5) Perda de núcleo celular. (6) Cromatólise (7) Debris celulares.

Histologicamente o epitélio intestinal dos carrapatos é composto por quatro tipos celulares diferentes, as células primordiais diferenciadas, chamadas *stem cell*, células digestivas, células secretoras e células basofílicas (SONENSHINE, 1991). Neste experimento, em concordância com PORTELA (2000) se observaram diferentes tipos celulares dispostos de forma linear ao longo do epitélio, ligados à membrana basal (Figuras 8 e 9). Entre tanto, as teleóginas submetidas à resposta imune induzida pelo *rBmseq4* apresentaram desnudamento do epitélio intestinal, com conseqüente erosão da membrana basal.

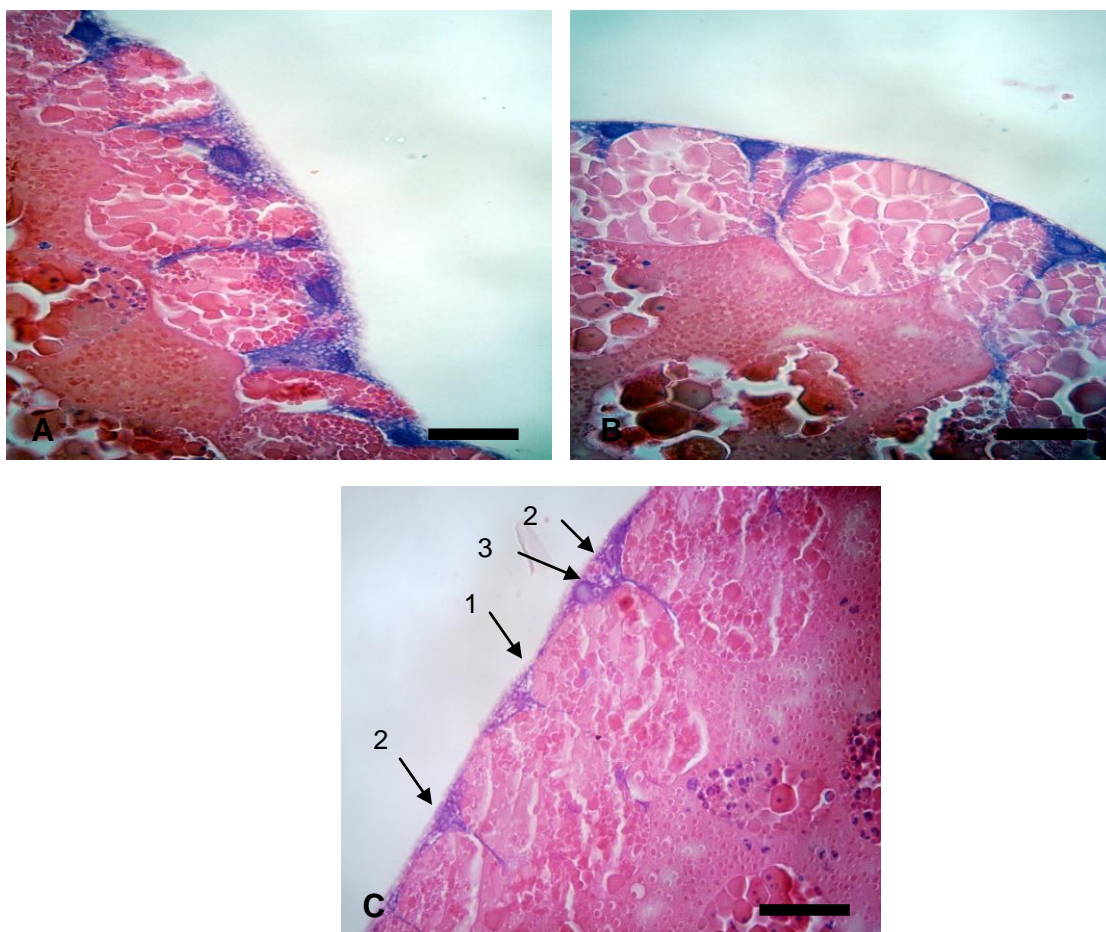


Figura 9. Epitélio intestinal de *R. microplus* pela técnica de H&E. Barra de escala de 50 μ m. (A) sem decorrência da resposta imune. (B) células intestinais após imunização com *rBmseq1*. (C) Células intestinais após imunização com *rBmseq4*. (1) Erosão de membrana basal. (2) Erosão celular. (3) Desprendimento de núcleo.

Demonstrado que os bovinos vacinados com o *rBmseq4* foram capazes de desenvolver imunoglobulinas altamente afins com capacidade de desencadear uma resposta imune contra *R. microplus*. O que se relacionou com os achados feitos por NUTTAL *et al* (2006) ao demonstrar que as imunoglobulinas após a alimentação do parasito, interagem com a parede do intestino, causando lise intestinal, interferindo com a digestão e a subsequente produção de ovos, o que em consequência prejudica a sobrevivência dos carrapatos. Somado isto, as alterações intestinais observadas nos carrapatos vacinados com o peptídeo *rBmseq4* se relacionam com os achados feitos por NEVES (2011) quando observou valores baixos em relação ao número de teleóginas desprendidas, peso médio, peso médio da oviposição das teleóginas desprendidas e relação peso larva/grama de ovos. No entanto, a pesquisadora demonstrou que esses valores descritos foram maiores ao utilizar o peptídeo *rBmseq1*, sugerindo que quando ocorrem interações dos anticorpos altamente afins com a proteína Bm86 se produzem alterações na endositose, produzindo falhas nutricionais e metabólicas no parasito, que afetam tanto o metabolismo do artrópode como a capacidade de oviposição nas fêmeas.

Embora os resultados obtidos com o peptídeo *rBmseq1* demonstram baixa eficácia vacinal em relação ao *rBmseq4*, levantam a possibilidade de desenhar uma nova formulação antigênica, com capacidade de gerar uma resposta imune de alta afinidade que talvez induza maiores alterações metabólicas no carrapato.

5.2. Imunoistoquímica para detecção de anticorpos *in situ*.

Através de está metodologia foi possível descrever uma forte reação na superfície das células do epitélio intestinal das teleóginas submetidos aos soros dos animais imunizados com o peptídeo *rBmseq4*, demonstrando-se uma forte marcação nos vacúolos digestivos (Figura 10). Essa forte reação

se relacionou com o fato de ter escolhido os soros quando os níveis de imunoglobulinas foram elevados. Em relação com WILLADSEN (1997), a forte marcação descrita com o peptídeo *rBmseq4* evidenciou que houve uma intensa reação no interior do vacúolo digestivo, sugerindo que as imunoglobulinas altamente afins ao peptídeo *rBmseq4* possuem capacidade de interagir com a proteína Bm86.

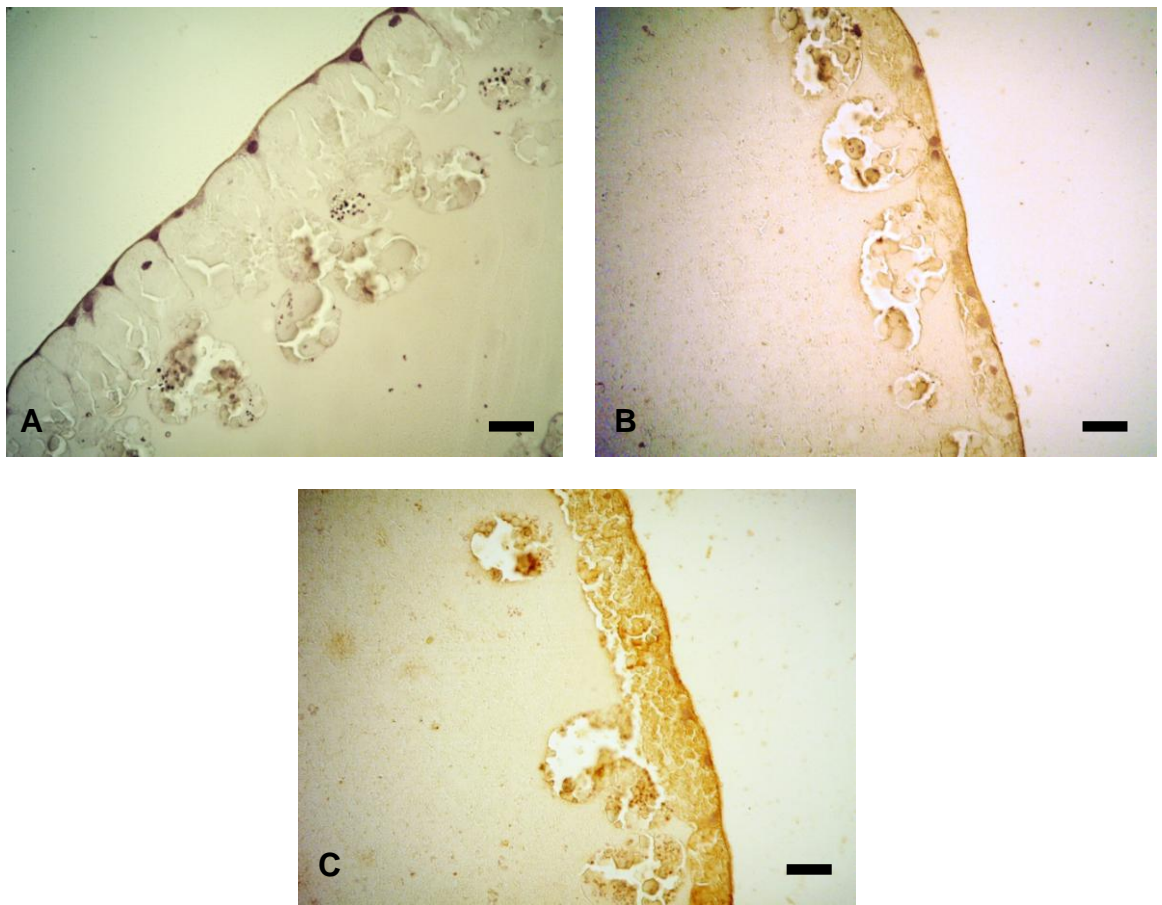


Figura 10. Epitélio intestinal de *R. microplus* pela técnica de Imunoperoxidase indireta. Barra de escala de 50 µm. (A) Células intestinais de *R. microplus* com soro de bovinos sem imunização. (B) Imunomarcação de células intestinais de *R. microplus* com soro de bovinos imunizados com *rBmseq1*. (C) Imunomarcação de células intestinais de *R. microplus* com soro de bovinos imunizados com *rBmseq4*.

Foi sugerido que a proteína Bm86 pode estar envolvida no processo de endocitose o que relacionaria estes fatos com as alterações observadas no item anterior, Além disso, a interação das imunoglobulinas com o antígeno

oculto da superfície do intestino originou alterações no epitélio intestinal (WILLADSEN, 2004). Entre tanto, como resultado da heterofagia digestiva, algumas imunoglobulinas passam intactas desde o intestino ao hemocele, onde pode ocorrer adsorção de imunoglobulinas na hemolinfa, essas imunoglobulinas podem agir com os órgãos internos produzindo danos no carrapato (WANG & NUTTALL, 1999).

6. CONCLUSÕES

- Os peptídeos *rBmseq4* e *rBmseq1* possuem a capacidade de gerar uma resposta imune que induzem reações adversas nos carrapatos *R. microplus*.
- Os anticorpos gerados pelos peptídeos reconhecem *in situ* à proteína Bm86 produzindo uma maior marcação nos soros dos animais imunizados com *rBmseq4*.
- Há um maior efeito vacinal *in situ* ao utilizar o *rBmseq4* como imunógeno contra *R. microplus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALLEN C. D., OKADA, T., & CYSTER, G. J. (2007b). Germinal-Center organization and cellular dynamics. **Immunity**. 27: 190-202.

ALLEN, C. D., OKADA, T., TANG, H.L., & CYSTER, J.G. (2007a). Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. **Science**. 315: 528–531.

ALLEN, C.D., ANSEL, K.M., LOW, C. 2004. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. **Nature immunology**. 5(9):943.

BAJENOFF, M., EGEN, J.G., KOO, L.Y., LAUGIER, J.P., BRAU, F., GLAICHENHAUS, N., GERMAIN, R.N. 2006. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. **Immunity**. 25:989-1001.

BARRIGA, O. O. 1999 Evidence and mechanisms of immunosuppression in tick infestations. **Genetic Analysis-Biomolecular Engineering**.15 (3-5):139-142.

BENVENUTI, F. 2004 Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. **J. Immunol**. 172: 292–301.

BOUSSO, P. 2009.T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. **Nature Rev. Immunol**. 8: 675–684.

BOUSSO, P.& ROBEY, E. 2003. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. **Nature Immunol**. 4:579–585.

BRANCO, F. P. A., PINHEIRO, A. C., MACEDO, J. B. R. 1987. Efeito da infestação pelo carrapato *B. microplus* no desenvolvimento ponderal das raças Hereford e Ibagé. **Coletânea de Pesquisas EMBRAPA/CNPO**, p. 229-234.

BRASÍLIA.1985. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. **Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos**, Brasília, Ministério da Agricultura.

BREART, B & BOUSSO P. 2006. Cellular orchestration of T cell priming in lymph nodes. **Current opinion in immunology**. 18(4):483-90.

BROSSARD M. & WIKEL S.M. 2004 Tick immunobiology. **Parasitology**129: 161–76.

CARVALHO, W.A., MARUYAMA, S.R., FRANZIN, A.M. 2010. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: clotting time in tick-infested skin varies according to local inflammation and gene expression patterns in tick salivary glands. **Experimental parasitology**. 124(4):428-35.

CASTRO OLIVEIRA, R. **Avaliação experimental do peptide sintético 4912 como imunogeno para o controle do carrapato Boophilus microplus (Canestrini, 1887) em Bovinos**. Dissertação de mestrado. Viçosa UFV. 1998.

CHOU, P, Y & FASMAN, G. D. 1978. Empirical Predictions of Protein Conformation. **Annual Review of Biochemistry**. 47: 251 -276.

CONSTANTINOIU, C., JACKSON, L., JORGENSEN, W.K. 2010. Local immune response against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **International journal for parasitology**. 40(7):865-75.

COUTO-PIMENTEL, J. C. 2002. **A vacina sintetica SBm7462 no controle do carrapato Boophilus microplus (Canestrini, 1887) em animais estabulados e a campo**. Dissertacao (mestrado). Vicosa: UFV, 87p.

CRITCHFIELD, J.M., RACKE, M.K., ZUNIGA-PFLUCKER, J.C., CANNELLA, B., RAINE, C.S., GOVERMAN, J., LENARDO, M.J. 1994. T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. **Science**. 263:1139-1143.

CYSTER, J.G. 2003. **Immunol. Rev.** 194, 48–60.

DE GROOT, A.S., SCOTT, D.W. 2007. Immunogenicity of protein therapeutics. **Trends in immunology**. 28(11):482-90.

DE LA FUENTE, J., KOCAN, K.M. 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. **Parasite Immunol**. 28: 275–283.

DE LA FUENTE, J., RODRIGUEZ, M., GARCIA-GARCIA, J.C. 2000 Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. **Ann N Y Acad Sci**, 916: 617–621.

DE LA VEGA, R. 1976. Contribucion al estudio de la biologia de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) en Cuba. Academia De Ciencias .**Cuba.Ser.Biologia**, 64:1-8.

ESTRADA-PEÑA, A & JONGEJAN, F. 1999. Ticks Feeding on Humans: A Review of Records on Human-Biting Ixodoidea with Special Reference to Pathogen Transmission. **Experimental and Applied Acarology**. 23: 685-715.

FOOKSMAN, D.R., SCHWICKERT, T., VICTORA G.D. 2010. Development and Migration of Plasma Cells in the Mouse Lymph Node. **Immunity**. 33(1):118-127.

FRADKIN, A.H., CARPENTER, J.F., RANDOLPH, T.W. 2009. Immunogenicity of Aggregates of Recombinant Human Growth Hormone in Mouse Models. **Area**. 98(9):3247-3264.

FRAGOSO, H., ORTIZ, M. RODRIGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. 1995. Evaluation of the efficacy of the recombinant vaccine (GavacTM) in cattle artificially infested with *Boophilus microplus* (Can). Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick. Habana: **Elpos Scientiae**, 280 p.

FRISCH, J. E. 1999. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **Int. J. Parasitol**, 29: 57-71.

FU, Y., SAINT-ANDRÉ., MARCHAL, I., MARCHAL, T., BOSQUET, G., PETAVY. 2000. Cellular immune response of lymph nodes from dogs following the intradermal injection of a recombinant antigen corresponding to a 66 kDa protein of *Echinococcus granulosus*. **Veterinary immunology and immunopathology**.74(3-4):195-208.

FURLONG, J. 1998. Carrapatos dos bovinos: conheça bem para controlar melhor. Juiz de Fora, MG: **Embrapa Gado de Leite**, 21p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 46).

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. 2000. Control of Ticks resistant to the immunization with BM86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *B. microplus*. **Vaccine**. 18: 2275-2287.

GEORGE, J.E., POUND, J.M., DAVEY RB. 2009. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**. May: 353-366.

GOMES, A. 2000. Carrapato-de-boi: Prejuízos e Controle. **Gado de Corte Divulga**, Mato Grosso do Sul, nº 42. ISSN 1516-5558.

GRAKOU, A., BROMLEY, S. K., SUMEN, S., DAVIS, M. M., SHAW, A. S., ALLEN, P. M., DUSTIN, M. L. 1999. The immunological synapse: a molecular mechanism controlling T-cell activation. **Science**. 285: 221-227.

GRISI, L., MASSARD, C. L., MOYA-BORJA, G. E., PEREIRA, J. B. 2002. Impacto economico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A hora veterinaria**, 21 (125): 8-10.

GUIMARÃES, A. M., LIMA, J. D., RIBEIRO, M. F., CAMARGOS, E. R. BOZZI, I. A. 1998. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult females *B. microplus* ticks. **Parasitol. Res.**, 84: 69-74.

HENRICKSON, S & VON, A. 2007. Single-cell dynamics of T-cell priming. **Current opinion in immunology**. 19(3):249-58.

HOOGSTRAAL, H. 1985. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Adv. Parasitol.** 24: 135 – 238.

HOOP, T. P., WOODS, K. R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 78(6): 3824 – 3828.

JACK, K., RUSSELL, F., DOOLITTLE, A. 1982. Simple method for displaying the hydrophobic character of a protein, **Journal of Molecular Biology**. 157: 105-132.

JONSSON, N. N., MAYER, D. G., MATSCHOS, A. L., GREEN, P. E., ANSELL, J. 1998. Production effects of cattle tick (*B. microplus*) infestation of high yielding dairy cows. **Vet. Parasitol.** 78: 65-77.

JORGENSEN, L., MOELLER, E.H., WEERT, M., VAN D.E., NIELSEN, H.M., FROKJAER, S. 2006. Preparing and evaluating delivery systems for proteins. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**. 29 (3-4):174-82.

KIM, C.H., ROTT, L.S., CLARK-LEWIS, I., CAMPBELL, D.J., WU, L., BUTCHER, E.C. 2001. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. **J. Exp. Med.** 193: 1373–1381.

KOSCO-VILBOIS, M.H. 2003. Are follicular dendritic cells really good for nothing? **Nat. Rev. Immunol.** 3: 764–769.

KUTTNER-KONDO, L., MEDOF, E.M., BRODBECK, W., SHOHAM, M. 1996. Molecular modeling and mechanism of action of human decay-accelerating factor. **Protein Eng.** 9(12): 1143-1149.

KYTE, J & DOOLITTLE, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**.157(1):105-132.

GASPAL, F.M., LANE, P.J., KIM, M.Y. 2004. Two sides of a cellular coin: CD4+CD3- cells regulate memory responses and lymph-node organization. **Nat. Rev. Immunol.** 5:655–60.

LESLIE, D.S., VINCENT, M.S., SPADA, F.M., DAS, H., SUGITA, M., MORITA, C.T., BRENNER, M.B. 2002. CD1-mediated gamma/delta T cell **Current opinion in immunology**. 12(4):280-90.

LIPA, J. J. 1971. Microbial control of mites and ticks. In: BURGESS, H. D., HUSSEY, N. W. **Microb. control of insects and mites**. 2. ed. London: Academic, p. 357-374.

LIU, Y.J., ARPIN, C. 1997. Germinal center development. **Immunol. Rev.** 156: 111–126.

LUTHER, S. 2010. Plasma cell precursors: long-distance travelers looking for a home. **Immunity**. 33(1):9-11.

MACLENNAN, I.C., TOELLNER, K.M., CUNNINGHAM, A.F., SERRE, K., SZE, D.M., ZUNIGA, E., COOK, M.C., VINUESA, C.G. 2003. Extrafollicular antibody

MARITZ-OLIVIER, C., STUTZER, C., JONGEJAN, F., NEITZ. 2007. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. **Trends in parasitology**.23(9):397-407.

MASSARD, C. L., FONSECA, A. H., BITTENCOURT, V. R. E. P., SILVA, K. M. M.1995. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm86 “GAVAC” contra o carrapato *B. microplus* no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**,17 (4):167-173.

MORA HERDÁNDZ, C. A. **Avaliação a campo do imunógeno recombinante rBm86 no controle do carrapato *Boophilus microplus***. Rio de Janeiro: UFRJ, 1996. 100p Tese (doutorado em parasitologia Veterinária)- Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.

MURRELL, A., CAMPBELL, N.J.H. AND BARKER, S.C. 2000. Phylogenetic analyses of the rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. **Mol. Phylogenet. Evol.** 16: 1–7.

MURRELL, A., CAMPBELL, N.J.H. AND BARKER, S.C. 2001. A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. **Mol. Phylogenet. Evol.** 21: 244–258.

NEVES DE SOUSA, E. 2011. **AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS VACINAS RECOMBINANTES rBm7462 – SEQ1 E rBm7462-SEQ4 CONTRA O CARRAPATO *Rhipicephalus microplus***. Dissertacao (mestrado). Vicosa: UFV, 87p

NUTTALL, P.A., TRIMNELL, A.R., KAZIMIROVA, M., LABUDA, M. 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tickborne diseases. **Parasite Immunol.** 28: 155–163.

OKADA, T., MILLER, M.J., PARKER, I., KRUMMEL, MF., NEIGHBORS, M., HARTLEY, S.B., O’GARRA, A., CAHALAN, M.D., CYSTER, J.G. 2005. Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. **PLoS. Biol.** 3: 150.

OPDEBEECK, J.P., WONG, J.Y.M., JACKSON, L.A., DOBSON, C. 1988. Hereford cattle immunized and protected against *Boophilus microplus* with soluble and membrane associated antigens from the midgut of ticks. **Parasite Immunol.** 63: 363–367.

PATARROYO, J. H. 1994. Babesiose bovina: controle de vetores com vacinas a base de peptídeos sintéticos. **Rev. Patol. Trop.**, v.23, n.2, p.145-146.

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. 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *B. microplus* gut protein (Bm86). **Vet. Immunol. Immunopathol.** 88: 163 – 172.

PATARROYO, J.H; VARGAS, M.I; GÓNZALEZ, C.Z; GUZMAN, F; MARTISNS-FILHO, O.A; AFONSO, L.C.C; VALENTE, F.L; PECONICK, A.P; MARCIANO, A.P; PATARROYO, A.M; SOSSAI,S. 2009. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462[®] against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, V. 166 P. 333-339.

PECONICK, A. P. 2008. **Conservacao de sequencias nucleotidicas do gene *bm86* e das sequencias peptidicas 4822 e 4823, constituintes da vacina sintetica SBm7462**. Dissertacao (mestrado). Vicosa:UFV. 81p.

PECONICK, A. P., SOSSAI, S., GIRAO, F. A., RODRIGUES, M. Q. R. B., SOUZA e SILVA, C. H., GUZMAN, F., PATARROYO, A. M., VARGAS, A. M., VARGAS, M. I., PATARROYO, J. H. 2008. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. **Experimental Parasitology**, 119: 37-43.

PENICHET, M., RODRIGUEZ, M., CASTELLANO, O., MANDADO, S., ROJAS, Y., RUBIERA, R., SANCHEZ, P., LLEONART, R., DE LA FUENTE,

J. 1994. Detection of Bm86 antigen in different strains of *B. microplus* and effectiveness of immunization with recombinant Bm86. **Parasite Immunology**, 16: 493–500.

PHAN, T.G., GRIGOROVA, I., OKADA, T., AND CYSTER, J.G. 2007. Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. **Nat. Immunol.** 10:1038-1494.

PIPER, E.K., JACKSON, L., BIELEFELDT-OHMANN. 2010. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **International journal for parasitology**.40(4):431-41.

PORTELA, R. W. D. 2000. **Comparação experimental de três peptídeos sintéticos como imunogeno no controle do carrapato *Boophilus microplus*** (Canestrini, 1887). Dissertacao (mestrado). Vicosa: UFV, 87p.

PROPHET, E.B., MILLS, B., ARRINGTON, J.B., SOBIN, L.H. 1992. **Laboratory Methods in hystotechnology**. Armmed Forces Institute of Pathology. Washington, 274p.

RAND, K. N., MOORE, T., SRISKANTHA, A., SPRING, K., TELLAM, R., WILLADSEN, P., COBON, S. 1989. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *B. microplus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 86(24): 9657-9661.

RANDOLPH, J., ANGELI, V., SWARTZ. A. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. **nature reviews immunology**. 5 : 617-628.
responses. **Immunol. Rev.** 194: 8–18.

RODRIGUEZ, M., RUBIERA, R., PENICHET, M., MONTESINOS, R., CRAMATA, J., FALCON, V., SÁNCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOVES, C., VALDES, M., LLEONART, R., HERRERA, L., DE LA FUENTE, J. 1994. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Mamm. Cell Genet. Divis.. J. Biotecnol.**, 33(2): 135 – 141.

RODRIGUEZ-VALLE, M., LEW-TABOR, A., GONDRO, C. Comparative microarray analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expression profiles of larvae pre-attachment and feeding adult female stages on *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **BMC genomics**. 2010:11-437.

ROSENBERG, A.S. 2006. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. **The AAPS journal**. 8 (3)

ROSENTHAL, K.S & ZIMMERMAN, D.H., 2006. Vaccines: all things considered. **Clin. Vaccine Immunol.** 19: 821–829.

RUDD, P.M. 2001. Glycosylation and the Immune System. **Science.** 291(5512):2370-2376.

SALES-JUNIOR, P. A., GUZMAN, F., VARGAS, M. I., SOSSAI, S., PATARROYO, A. M., GONZALES, C. Z. L., PATARROYO, J. H. 2005. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm7462. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 107: 281-290.

SCHELLEKENS, H. 2002. Immunogenicity of therapeutic proteins. **International Journal of Pharmaceutics.** 2002 :1257-1259.

SEIFERT, G. W. 1971. Ecto and endoparasitic effects on the growth rates of zebu crossbred and british cattle in the field. **Aust. J. Agric. Res.**, Melbourne., Vic., 22: 839-850.

SIGNORINI, A. R. 1991. Avances en la campaña de erradicación de la garrapata *B. microplus* en la Argentina. **Rev. Cub. Cien. Vet.** 22 (3): 183-188.

SIXT, M., KANAZAWA, N., SELG, M., SAMSON, T., ROOS, G., REINHARDT, D.P., PABST, R., LUTZ, M.B., SOROKIN, L. 2005. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. **Immunity.** 22:19–29.

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

SONENSHINE, D. E. (1991) **Biology of Ticks**, vol. 1, Oxford University Press, New York.

SOSSAI, S. 2004. **Polimorfismo do gene bm86 de Boophilus microplus, Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) e análise da conservação genética dos peptídeos integrantes da vacina sintética SBm7462.** Dissertação (mestrado). Vicososa: UFV, 60p.

SOSSAI, S. 2009. **Expressão de quatro peptídeos recombinantes derivados do peptídeo sintético sbm7462 em *pichia pastoris* e avaliação da resposta imunológica induzida em camundongos.** Tese de Doutorado, Viçosa: UFV, 137p

SOSSAI, S., PECONICK, A. P., SALES-JUNIOR, P. A., MARCELINO, F. C., VARGAS, M. I., NEVES, E. S., PATARROYO, J. H. 2005. Polymorphism of

the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*, **Experimental & Applied Acarology** , 37:199–214.

TAFUR, G. A. 2008. **Respuesta inmune celular en ganglios linfáticos de ratones balb/c, producida por el peptido sintético sbm 7462®, anti *rhhipicephalus (boophilus) microplus*, expresado en *pichia pastoris*.** Monografía (graduación), Universidad del Tolima, Ibagué, 47p.

TARLINTON, D., RADBRUCH, A., HIEPE, F., DORNER, T. 2008. **Curr. Opin. Immunol.** 20: 162–169.

TARLINTON, D.M & SMITH, K.G. 2000. Dissecting affinity maturation: A model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. **Immunol. Today.** 21, 436–441.

TELLAM, R. L., SMITH, D., KEMP, D. H. 1992. Vaccination against ticks. *In*: YONG, W. K. Animal parasite control using biotechnology, **Boca Raton: CRC Press.** p. 303-331.

THOMPSON, K. C., ROA, E. J., ROMERO, N. T. 1978. Anti-tick grasses as the basis for developing practical tropical tick control packages. **Trop. Anim. Health. Prod,** 10: 179-182.

TURNBULL, L. F., SMITH, D., SHARP, P. J. 1990. Expression and secretion in *Aspergillus nidans* and *A. niger* of a cell surface glycoprotein from the cattle tick *B. microplus*, by using the fungal *amdS* promoter system. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 2847-2852.

WANG, H., NUTTALL P.A. 1999. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. **Cellular and molecular life sciences** , 56:286-95.

WANG, W. 2005. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. **International Journal of Pharmaceutics.** 289:1-30.

WERNEER, M., VON WASIELEWSKI, R., KOMMINOTH,P. 1996. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. **Histochem. Cell. Biol.** 5: 253-260.

WIKEL, S.K., BERGMAN, D. 1997. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. **Parasitology today.**13(10):383-9.

WILLADSEN, P. 1997. Novel vaccines for ectoparasites. **Vet. Parasitol.** 71: 209–222.

WILLADSEN, P. 2004. Anti-tick vaccines. **Parasitology.** 31: 234-240.

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. 1989. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *B. microplus*. **J. Immunol.**, 143(4): 1346-1351.

WILLADSEN, P., SMITH, D., COBON, G., MCKENNA, R. 1996. Comparative vaccination of cattle against *B. microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. **Parasit. Immunol.**, 18: 241-246.

WILLARD-MACK, C. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes. **Toxicologic Pathology**. 34: 409–424.

WOODHAN, C.B., GONZALES, O.A., LOPEZ, L.A. *et al.* Progress in the eradication of *Boophilus* ticks in Mexico 1960-80. **World Animal Review**, 48:18-24.