

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE CANDIDATO A IMUNÓGENO CONTRA INFESTAÇÕES DE CARRAPATOS *Rhipicephalus microplus*

JAQUELINE DE DEOS SILVEIRA¹; SERGIO SILVA DA SILVA², PEDRO ALBUQUERQUE³, FABIO LEIVAS LEITE⁴, CARLOS EUGÊNIO SILVA⁵, RODRIGO CASQUERO CUNHA⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – e-mail do autor jaquededeos@gmail.com

² Hemotick Indústria e Comércio – hemotickinduscom@gmail.com

³ Universidade Federal do Rio Grande do Sul - albuquerque95pedro@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

⁵ Universidade Federal do Rio Grande do Sul - ceusilvaster@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha_vet@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é um ácaro do filo artrópoda, monoxeno e parasito de bovinos. As infestações por carrapatos *R. microplus* distribuem-se no mundo entre os paralelos 32° de latitude norte e 32° de latitude sul, com maior prevalência em áreas tropicais diminuindo-se no sentido das áreas subtropicais. No Brasil, é considerado endêmico, a exceção de poucas regiões de diferentes biomas ao sul, abaixo do paralelo 32° de latitude sul, onde praticamente inexistem nos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí NUÑES et al. (1982).

As perdas mundiais por carrapatos são muito importantes, ao ponto de, no Brasil, chegarem na ordem de quatro e meio milhões de dólares, além de causarem outros prejuízos indiretos, como os prejuízos em decorrência da transmissão de hematozoários, agentes etiológicos da Babesiose e Anapalasmose bovinas, reconhecidos nacionalmente como tristeza parasitária bovina (TPB), além de gastos com o método controle mais utilizado atualmente, o químico, que bem enfrentando problemas com o desenvolvimento de populações cada vez mais resistentes (BLECHA et al., 2018).

Mais de 70% das populações testadas em biocarrapaticidograma apresentaram resistência a pelo menos um grupo químico, enquanto 41,8% apresentaram resistência múltipla. A resistência às drogas carrapaticidas apresenta ampla distribuição no Rio Grande do Sul, com alto grau de risco de dispersão pelo crescente trânsito entre propriedades de produção pecuária SILVA et al., (2014).

Neste cenário, temos o desenvolvimento de estratégias artificiais pelo emprego de vacinas recombinantes ANDREOTTI et al. (2012) usando proteínas candidatas oriundas de intestino, glândula salivar e ovário dos carrapatos, além de enzimas metabólicas CSORDAS et al. (2019). Atualmente, no Brasil, ainda não existe vacina recombinante nacional e disponível comercialmente.

O presente trabalho tem por objetivo expressar uma região conservada e predita imunogênica de uma proteína de *R. microplus*, de forma recombinante, para posterior utilização como imunógeno em formulações vacinais. Produto e processo em desenvolvimento encontram-se sob regime de confidencialidade, em vistas a obtenção de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

2. METODOLOGIA

Foi sintetizado plasmídeo contendo uma sequência parcial do gene da proteína Bm86-CG, marcador de resistência a kanamicina e cauda de histidina (6xHis). Este foi utilizado para transformação de cepa Star de *Escherichia coli*. Clones transformantes, por choque térmico, foram selecionados em cultivos em placas de Petri em meio Luria Bertani (LB) sólido, suplementado com kanamicina. Cada um dos clones foi selecionado por resistência à kanamicina e submetido à cultivo em meio líquido a 37 °C, em agitador orbital por 1 hora. A indução de expressão foi produzida por suplementação de lactose ou Isopropil-Beta-D-galactopiranosídeo (IPTG), durante 3 horas de indução. As alíquotas de 4h após a indução foram preparadas para serem visualizadas em SDS-PAGE 10% (Fig.1.A) como descrito por CSORDAS et al. (2018).

A etapa de expressão utilizou 2 tipos de indutores estabelecidos na literatura, lactose e IPTG. A purificação foi confirmada por SDS-PAGE 12%. A quantificação por *Dot Blotting* utilizando um sistema de quantificação por imagem que fornece valor aproximado da concentração de proteína no blot (Alpha Ease FC Software) e seguiu o protocolo descrito por CSORDAS et al. (2018). A proteína expressa e purificada em coluna de Níquel HisTrap™ High Performance (Sigma, MA, EUA) foi utilizada para realização de *Dot Blotting* em membrana de nitrocelulose e revelada contra monoclonal anti-histidina, detecção e para quantificação da proteína recombinante.

Esse projeto já foi cadastrado na pró-reitoria de pesquisa da UFPEL (processo nº 23110.004889/2015-47) e aprovado pela comissão e ética e experimentação animal (CEEA nº: 4889-2015) dessa instituição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos até agora, apresentam provas *in vitro* indicativas da presença da proteína recombinante. A transformação gerou vários clones, dos quais, o clone número 2 foi utilizado para expressão da proteína recombinante. Análise dos sobrenadantes em SDS-PAGE a 10% para proteína revelou bandas entre 37 kDa correspondendo ao esperado (Figura 1) e uma segunda banda de e 25 kDa. Esta se segunda banda de e 25 kDa, possivelmente é derivada de degradação proteica. Esta hipótese será confrontada com o *Western blotting*, na sequência do trabalho.

O *Dot Blotting* foi realizado com uma proteína recombinante controle, com cauda de histidinas, previamente quantificada (656,7 ng/μL), com a rBm86t induzida com IPTG, rBm86t induzida com lactose e, como controle negativo, BSA (Figura 1.B).

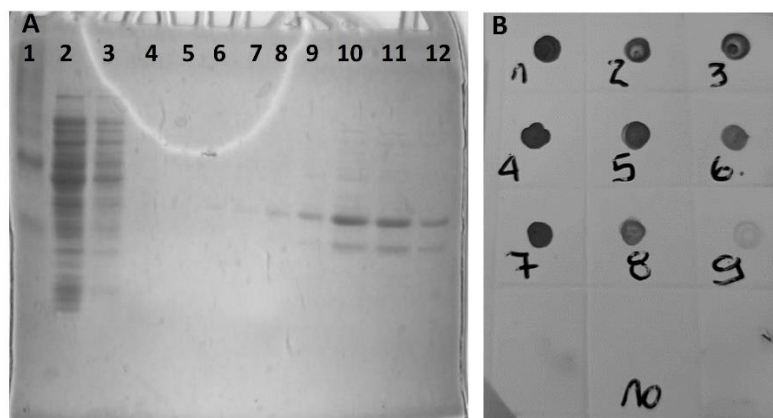


Figura 1. SDS-PAGE 12% e *dot blotting*. A) SDS-PAGE 12% das frações de purificação da proteína recombinante, onde: 1- Marcador de peso molecular; 2- lisado de células recombinantes; 3- primeiro flow through da coluna de níquel; 4 a 12, frações de 8 a 16 da eluição da coluna de níquel. B) *Dot blotting* quantitativo, onde as triplicatas correspondem conforme legenda: C⁺ - RmLTIBmCGLTB -1, 2,3 ; rBM86t Lactose - 4,5,6; rBM86t IPTG- 7,8, 9, e C⁻ PBS - 10.

A partir das quantificações, feitas com auxílio de um programa de Alpha Ease FC que considerando a densidade dos *dots* permite estimar a concentração equivalente aos cultivos das proteínas. A concentração do blot de uma proteína já conhecida RmLTIBmCGLTB, controle positivo continha 656,7 ng/μL e, também, a diferença de peso molecular entre as proteínas, chegamos as quantificações de 281,45 ng/μL de rBM86t induzida com IPTG e de 306,7 ng/μL de rBM86t induzida com Lactose. A purificação da proteína induzida com lactose apresentou um rendimento de aproximadamente 500μg que equivale a 200mL de cultivo, a quantificação foi feita com Nanodrop 0,05mg/mL.

4. CONCLUSÕES

A partir do presente estudo foi possível demonstrar a efetiva obtenção de clones estáveis com capacidade de expressão da sequência parcial selecionada (Bm86t), com peso molecular estimado em 37 kDa, purificada e reconhecida por anticorpo monoclonal anti-6xHis *tag*. Considerando os resultados, é possível estimar o potencial da rBM86t como candidata para ser testada em protocolos vacinais na imunização de bovinos utilizando adjuvantes específicos.

Como perspectivas buscaremos o registro de uma patente baseados em dados complementares de sorologia e de testes *in vivo* para fins de liberação para registro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, R. Z., ZAMAN, M. A., COLWELL, D. D., GILLEARD, J., & IQBAL, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. In **Veterinary Parasitology** (Vol. 203, Issues 1–2, pp. 6–20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>

ANDREOTTI R, CUNHA R.C., SOARES M.A., GUERRERO F.D., LEIVAS LEITE F.P., PE´REZ DE LEO´N A.A. Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine*. 2012; 30: 6678–6685. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.08.066> PMID:

BLECHA, I. M. Z., CSORDAS, B. G., AGUIRRE, A. de A. R., CUNHA, R. C., GARCIA, M.V., & ANDREOTTI, R. (2018). Analysis of Bm86 conserved epitopes: Is a global vaccine against cattle tick rhipicephalus microplus possible? **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, 27(3), 267–279. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180056>

CSORDAS, B. G. (2019). Seleção de Antígenos Candidatos à Vacina Contra Carrapatos. Tese de Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias Fundação Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

CUNHA, R. C., LEITE, F. P. L., ANDREOTTI, R.. Vacinas contra o carrapato-do-boi no Brasil. In: Renato Andreotti; Wilson Werner Koller. (Org.). Carrapatos no Brasil. Biologia, Controle e Doenças Transmitidas. 1ed. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2013, v. 1, p. 105-118.

CUNHA, R. C.; AGUIRRE, A. A. R. ;LEITE, F. P. L.; Andreotti, R.. Protocolos para o Desenvolvimento de Antígenos para Vacinas contra o Carrapato-do-boi. In: Renato Andreotti; Wilson Werner Koller; Marcos Valério Garcia. (Org.). Carrapatos protocolos e técnicas para estudo. 1ed.Campo Grande: EMBRAPA, 2016, v. 1, p. 1-27

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

PARIZI, L. F., RECK, J., OLDIGES, D. P., GUIZZO, M. G., SEIXAS, A., LOGULLO, C., de OLIVEIRA, P. L., TERMIGNONI, C., MARTINS, J. R., & da SILVA VAZ, I. (2012). Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: A field evaluation. **Vaccine**, 30(48), 6912–6917.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.08.078>

SILVA da SILVA, S. (2014). Perspectivas atuais e futuras do controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e dos agentes por eles transmitidos na bovinocultur. Tese de Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Vetrinária na Universidade Federal De Pelotas