

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS**

BÁRBARA GUIMARÃES CSORDAS CABRAL

**SELEÇÃO DE ANTÍGENOS CANDIDATOS À VACINA CONTRA CARRAPATOS
*Rhipicephalus microplus***

**CAMPO GRANDE
2019**

BÁRBARA GUIMARÃES CSORDAS CABRAL

SELEÇÃO DE ANTÍGENOS CANDIDATOS À VACINA CONTRA CARRAPATOS
Rhipicephalus microplus

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias como requisito à obtenção do título de Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Orientação Prof. Dr. Renato Andreotti.

Coorientador Dr. Rodrigo Casquero Cunha.

CAMPO GRANDE
2019

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
CPG - Coordenadoria de Pós-Graduação
SIGPOS - Sistema de Gestão de Pós-Graduação

Ata de defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias
Doutorado

Aos dezenove dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezenove, às oito horas, na Embrapa Gado de Corte, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Renato Andreotti e Silva (Embrapa), Cleber Eduardo Galvão Carvalho (CCZ), Sônia Maria Oliveira de Andrade (UFMS), James Venturini (UFMS), Karina Carrão Castagnolli (UNIARA), para julgar o trabalho da aluna: **BÁRBARA GUIMARÃES CSORDAS CABRAL**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Curso Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título “**SELEÇÃO DE ANTÍGENOS CANDIDATOS À VACINA CONTRA CARRAPATOS *Rhipicephalus microplus***”. O Presidente da Banca Examinadora, Renato Andreotti e Silva, declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações como orientador. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AValiação
Dr. Renato Andreotti e Silva	_____	_____
Dr. Cleber Eduardo Galvão Carvalho	_____	_____
Dr. Sônia Maria Oliveira de Andrade	_____	_____
Dr. James Venturini	_____	_____
Dra. Karina Carrão Castagnolli	_____	_____
Dra. Alessandra Gutierrez de Oliveira (Suplente)	_____	_____

RESULTADO FINAL:

Aprovação

Aprovação com revisão

Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Orientador

Aluna

Dedico esta tese a minha tia, Lenir Guimarães - *in memoriam*.
Tia, obrigada por me ensinar sobre a leveza em se viver.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Nilza Guimarães, ao meu pai Carlos Csordas, ao meu tio Nelson Guimarães. E mesmo com a distância, a minha tia Margarida e prima Cristina Csordas, que sempre me deram todo amor e carinho. Eles me ensinaram tudo que eu precisei para chegar até aqui. Não tem palavras para o tamanho da gratidão que eu sinto, obrigada por todo amor e carinho.

Ao meu amado Cauan Cabral, por todo amor, zelo e principalmente paciência nos momentos mais difíceis. Quando houve distância, também houve companheirismo. Quando houve madrugadas em que passei acordada, também houve apoio. Quando o caminho foi longo e distante, você foi meu guia. Quando houve o esgotamento, você me deu esperança. Sem dúvidas você é parte do meu crescimento. Não posso deixar de lembrar com carinho de toda sua linda família, principalmente da sua mãe, Jaqueline Gama. Eu sinto muito amor, respeito e admiração por essa família.

Ao meu orientador, Dr. Renato Andreotti, por confiar e sempre buscar melhorar meu potencial, por todas as oportunidades, ensinamentos e profissionalismo. Ao meu Coorientador, Dr. Rodrigo Cunha, eu sei que a minha teimosia foi um grande desafio para você, mas agradeço imensamente por fazer o possível para que nosso trabalho viesse, finalmente, a ter sucesso.

Aos colegas de laboratório Alexandre Silva, André Aguire, Isabella Blecha, Francisco Barradas Pina, Jaqueline Matias, chefinha Jacqueline Barros, Leandra Oshiro, Leandro Higa, Marcos Valério, Marlon Cominetti, Pâmella Duarte, Vinicius Oliveira, Kauê Rodriguez e Zoraida Fernandez. Vocês me ensinaram a trabalhar em equipe, obrigada pelo convívio e companheirismo, esse trabalho também é de vocês.

Ao Dr. Wilson Koller, quando eu estava atrasada para terminar os serviços do dia, o senhor sempre me ajudou com a carona amiga. Obrigada pela amizade, nossas conversas me ajudaram sempre a olhar para a vida com um pouco mais de entusiasmo.

Ao Professor Dr. Fábio Leite, agradeço por abrir as portas de seu laboratório e permitir que eu buscasse todo conhecimento e habilidades que foram determinantes para o desenvolvimento deste trabalho. Aos queridos colegas da Universidade Federal de Pelotas, meus colegas gaúchos, Vitória Gonçalves, Bruno Freitas, Jorge Velho, Alceu, Renan Piraine e ao paraense mais gaúcho que conheci, Denis Santos.

A Solete Garcia, por ter sido uma mãe durante os meses que passei em Pelotas, juntamente com Elizandra Garcia e as “irmãs” Mara Andrade e Mara Thais, vocês me ajudaram

a não sentir o peso da solidão ao se morar em um lugar desconhecido, obrigada pelo acolhimento e carinho.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, tantos os novos como os antigos, Néia, Kemerson e Terenilce. Aos professores, em especial Dra. Alda Maria e Dra. Ana Rita que juntas me fizeram amar, cada vez mais a biologia molecular. As mulheres engajadas e que coordenaram a DIP enquanto estive presente, Dra. Inês Tozetti, Dra. Ana Maria Paniago e Dra. Alessandra Gurierrez.

Aos Membros da Banca Examinadora da minha tese, por contribuir e engrandecer no desenvolvimento tanto da escrita quanto no pensamento científico.

Ao Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia (CBAB), por ser escolhida dentre tantos bons alunos na América do Sul e poder participar no curso de Produção de Proteína Recombinante na Argentina. Esta oportunidade única proporcionou o desenvolvimento desse trabalho.

Não posso deixar de lembrar com carinho dos heróis e meus queridos professores da Universidade Católica Dom Bosco (2003-2006) e dos professores do Colégio Raul Sans de Matos (1992-2002). Se hoje eu sou uma profissional, devo isso também a vocês.

As minhas amigas amadas, Talita e Tatiana Machado, por estarem presentes nesses 20 e tantos anos de amizade. Eu sei que sempre posso contar com a família de vocês sempre, porque são minha segunda família. Vocês são meu orgulho.

Ao meu querido amigo, Jorge Jr., pelo companheirismo e “puxões de orelha”. Você me ensina a rir da vida, mesmo que as vezes não tenha muito do que rir, me ensina a viver com mais leveza.

Não menos importante, ao Conselho Nacional de Pesquisa e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, pelo suporte financeiro e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Gado de Corte, pelo apoio à pesquisa.

E a todas as pessoas que fizeram parte desta jornada incrível de grande aquisição de conhecimento e que não foram citadas diretamente.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

“Para a mulher vencer na vida, ela tem que se atirar. Se erra uma vez, tem que tentar outras cem. É justamente a nova geração a responsável para levar avante a luta da mulher pela igualdade - Bertha Lutz”

RESUMO

O carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita que transmite patógenos causadores de doenças, como babesiose (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e anaplasmoses (*Anaplasma marginale*). Como as vacinas comerciais atualmente disponíveis oferecem apenas uma proteção parcial contra *R. microplus*, a necessidade de se buscar vacinas mais eficientes é uma tarefa contínua. Proteínas recombinantes foram avaliadas usando diferentes estratégias de imunização e elas representam uma grande promessa de potenciais vacinais. Este trabalho teve como objetivo principal, selecionar antígenos candidatos à vacina contra carrapatos *Rhipicephalus microplus* e posteriormente caracterizar, por métodos moleculares, desenvolvendo uma vacina baseada na proteína recombinante rRmLTI-rBmCG-LTB contra o ectoparasita. Outro objetivo deste trabalho, foi avaliar por métodos *in silico*, a possibilidade de criar uma vacina global baseada em epítomos conservados da proteína Bm86, contra carrapatos *Rhipicephalus microplus*. Os antígenos selecionados são partes das proteínas RmLTI e Bm86-CG, fusionados a um antígeno de *Escherichia coli* (subunidade B). Nesta mesma bactéria, em cepas distintas, foi possível clonar e expressar a proteína recombinante rRmLTI- rBmCG-LTB e caracterizá-la por *Western blotting*. A proteína recombinante foi avaliada como potencial imunógeno em teste de estábulo com modelos bovinos. A proteína recombinante homogeneizada em adjuvante Montanide™ ISA 61 (Seppic), obteve 55,6% de eficiência vacinal. A análise dos soros dos bovinos em teste ELISA possibilitou verificar que a proteína recombinante rRmLTI- rBmCG-LTB, aumentou a imunidade humoral adquirida contra este antígeno. Conclui-se que, foi possível selecionar os antígenos contra o carrapato *Rhipicephalus microplus*, além de caracterizar e desenvolver uma proteína recombinante com os antígenos selecionados. Apesar da eficiência encontrada para os antígenos serem razoáveis, pesquisas para melhorar esta ferramenta de controle serão indispensáveis. Com relação à possibilidade de se fazer uma vacina global, distintas análises *in silico* possibilitaram obter três epítomos conservados para a proteína Bm86, que podem ser reconhecidos por células B e MHC, tornando-se potenciais imunogênicos tanto para populações de *Rhipicephalus microplus* de regiões geograficamente distintas como para a espécie irmã como *R. australis*, além de outras espécies como *R. annulatus*, *R. decoloratus*, devido ao caráter conservado de seus peptídeos.

Descritores: Ixodes. Bovino. Quimera. Vacinas recombinantes.

ABSTRACT

The bovine tick *Rhipicephalus microplus* is an ectoparasite that transmits disease-causing pathogens such as babesiosis (*Babesia bovis* and *B. bigemina*) and anaplasmosis (*Anaplasma marginale*). As commercial vaccines available currently offer only partial protection against *R. microplus*, the need to seek more effective vaccines is an ongoing task. Recombinant proteins were evaluated using different immunization strategies and they present a great promise of vaccine potentials. The main goal of this work was to select candidate antigens for the *Rhipicephalus microplus* tick vaccine and to characterize by molecular methods, besides developing a vaccine based on recombinant rRmLTI-rBmCG-LTB protein against ectoparasite. Another goal of this work was to evaluate by *in silico* methods the possibility of creating a global vaccine based on conserved epitopes of Bm86 protein against *Rhipicephalus microplus* ticks. The selected antigens are portions of the RmLTI and Bm86-CG proteins, fused to an *Escherichia coli* (B subunit) antigen. In this same bacterium, in distinct strains, it was possible to clone and express the recombinant rRmLTI-rBmCG-LTB protein and to characterize it by Western blotting. The recombinant protein was evaluated as a potential immunogen in a stable bovine test. The recombinant protein homogenized in Montanide™ ISA 61 (Seppic) adjuvant, obtained 55.6% vaccine efficacy. Analysis of bovine sera in the ELISA test showed that the recombinant rRmLTI-rBmCG-LTB protein increased the humoral immunity acquired against this antigen. It was concluded, was possible to select the antigens against the tick *Rhipicephalus microplus*, besides characterizing and developing a recombinant protein with the selected antigens. Although the efficiency found for the antigens is reasonable, research to improve this control tool will be indispensable. Regarding the possibility of making a global vaccine, different *in silico* analyzes allowed to obtain three conserved epitopes for the Bm86 protein, which can be recognized by B and MHC cells, becoming immunogenic potentials for both populations of *Rhipicephalus microplus* from geographically distinct regions as for sister species such as *R. australis*, in addition to other species such as *R. annulatus*, *R. decoloratus*, due to the conserved character of their peptides.

Subject headings: Ixodes. Bovine. Chimera. Recombinants vaccines.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i>	13
2.1.1 História	13
2.1.2 Taxonomia e filogenia.....	13
2.1.3 Morfologia e ciclo biológico.....	14
2.2 Problemas na saúde pública e prejuízos econômicos causados pelo <i>Rhipicephalus microplus</i>	16
2.3 Resposta imune do hospedeiro contra carrapatos	18
2.4 Vacinas contra <i>Rhipicephalus microplus</i>	19
2.4.1 Vacina recombinante.....	20
2.4.2 BmTI	21
2.4.3 Bm86	23
2.4.4 Adjuvantes e imunomoduladores da resposta imune	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Local da realização de cada experimento	28
4.2 Seleção <i>in silico</i> (Experimento - 1)	28
4.3 Seleção <i>in silico</i> (Experimento - 2)	29
4.4 Clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante (Experimento - 1)	29
4.5 Desafio do potencial imunógeno em teste de estábulo (Experimento - 1)	30
4.6 Alinhamento das sequências e construção de árvore filogenética (Experimento - 2)	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Artigo - 1	32
5.2 Artigo - 2	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO	71

1 INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por carrapatos são ocorrências comuns ao redor do mundo, entretanto algumas doenças são negligenciadas no Brasil. Além das limitações relacionadas ao seu diagnóstico e manejo clínico, o controle e a prevenção dessas doenças é um fator complicador, pois requer a ruptura de uma complexa cadeia de transmissão, envolvendo hospedeiros vertebrados e carrapatos, que interagem em um ambiente em constante mudança (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012; LABRUNA *et al.*, 2011).

Os carrapatos foram os primeiros artrópodes a serem estabelecidos como vetores de patógenos e atualmente são reconhecidos, juntamente com os mosquitos, como os principais vetores artrópodes de agentes de doenças, tanto em humanos com em animais em todo o mundo (COLWELL *et al.*, 2011; JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Além disso, a incidência de doenças transmitidas por carrapatos (*Tick-Borne Disease - TBD*) estão aumentando em todo o mundo (MATIAS *et al.*, 2015; NICHOLSON *et al.*, 2010; PIESMAN, EISEN, 2008).

Nos últimos anos, o espectro de TBD que afetam animais domésticos/selvagens e seres humanos, com grande importância zoonótica, como riquetsiose, erliquiose e borreliose de Lyme, estão ganhando cada vez mais atenção dos pesquisadores. Com o desenvolvimento da biologia molecular, novas espécies, linhagens ou variantes genéticas de microrganismos estão sendo detectadas em carrapatos em todo o mundo (DUH *et al.*, 2010; PACHECO *et al.*, 2011).

Portanto, a lista de potenciais patógenos transmitidos por carrapatos continua a aumentar (AGUIRRE *et al.*, 2018; PRIT *et al.*, 2011; SHAPIRO *et al.*, 2010). Alguns desses agentes, como *Rickettsia slovaca*, *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia massiliae*, foram identificados em carrapatos, décadas antes de estarem associados a doenças humanas (PADOCK *et al.*, 2009).

Outros agentes patogênicos transmitidos por carrapatos, como muitos flavivírus, o vírus da febre hemorrágica Omsk, vírus da encefalite de Powassan e vírus da doença das florestas de Kyasanur, foram associadas as doenças humanas em novas regiões geográficas (DOBLER, 2010; PIESMAN; EISEN, 2008).

O carrapato *Rhipicephalus microplus* transmite patógenos causadores de doenças, como babesiose (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e anaplasmose (*Anaplasma marginale*). Este ectoparasita está mundialmente distribuído entre as regiões tropicais e subtropicais. As infestações causadas por este carrapato, causam enormes perdas na pecuária, sendo que, o controle e a transmissão de doenças transmitidas por carrapatos continuam a ser um grande desafio (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012; HORN, 1983; WILLADSEN; JONGEJAN, 1999).

O controle químico é, ainda, o mais utilizado no combate ao carrapato e a sua administração pode ser feita por diferentes formas: aspersão, banho de imersão, aplicação no dorso (*pour on*) e injeção (ANDREOTTI *et al.*, 2002). Porém, para a maioria dos químicos, como por exemplo, formamida, piretróide e organofosforados utilizados contra estes ectoparasitas, já foram registradas populações de carrapatos resistentes (ALVES-BRANCO *et al.*, 1992).

Um estudo de revisão pode demonstrar que o valor de resistência em 47% de todas as avaliações ao utilizar o teste de imersão de adultos (TIA), apresentou falha no controle químico, em algumas regiões do país, independente da classe de acaricida utilizada (HIGA *et al.*, 2016). Portanto, a busca por métodos de controle alternativos torna-se cada vez mais necessária.

O controle de carrapatos por meio de vacinas é uma alternativa ao uso de acaricidas. Alguns exemplos de vacinas que usam a proteína Bm86 como um imunógeno contra carrapatos incluem uma que não está mais disponível no mercado, TickGardPLUS (anteriormente, Intervet Austrália) (WILLADSEN *et al.*, 1995) e a comercialmente disponível GavacTM (Heber Biotec) (CANALES *et al.*, 1997). Entretanto, estas vacinas ainda não asseguram o grau de proteção que são necessários para suprimir o uso de acaricidas (WILLADSEN *et al.*, 1996).

O desenvolvimento de vacinas contra o carrapato representa uma das alternativas mais promissoras para o controle químico, podendo ainda ser utilizada em conjunto com acaricidas em controle integrado, possuindo vantagens como a especificidade à espécie, segurança ambiental e para a saúde humana, fácil administração e um custo menor. Para o desenvolvimento inicial de uma vacina é necessário, além da identificação de proteínas capazes de induzir uma resposta imune protetora, testar em modelos experimentais o potencial imunogênico destas proteínas (WIKEL, 1996).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

2.1.1 História

Na América Latina, a origem do carrapato que utiliza animais bovinos como hospedeiro, está ligado à história do processo civilizatório de grande parte da humanidade. Junto com o Homem, vieram animais domésticos como o boi e com estes, vieram os carrapatos além de outros parasitas. Portanto, *R. microplus* não é um parasita nativo da América do Sul (GONZALES, 2003).

A origem do carrapato *R. microplus* na América do Sul vem da Ásia, por meio das expedições exploratórias registradas na história; sua expansão e introdução ocorreram da movimentação de animais e mercadorias e foram se estendendo para as regiões tropicais e subtropicais como Austrália, México, América Central, América do Sul e África (NUÑEZ *et al.*, 1982).

No Brasil, sua introdução possivelmente aconteceu no início do século XVIII no estado do Rio Grande do Sul, por meio de compra de animais trazidos do Chile. Encontra-se hoje distribuído em todo o país, variando de intensidade de acordo com as condições climáticas e os tipos raciais de bovinos explorados (GONZALES *et al.*, 1975).

Popularmente conhecido como “carrapato-do-boi”, leva a perdas econômicas e sanitárias na produção de leite e carne, danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato e pela transmissão de doenças, como a tristeza parasitária bovina (TPB) que pode ser causada por hemoprotozoários do gênero *Babesia* e pela bactéria do gênero *Anaplasma* (ANDREOTTI, 2010).

2.1.2 Taxonomia e filogenia

De acordo com *National Center for Biotechnology Information - NCBI* (txid6941) *Rhipicephalus microplus* (Canestrini 1888) é um organismo celular pertencente ao Super-reino Eukariota, Opisthokonta, Reino Metazoa, Eumetazoa, Bilateria, Protostomia, Ecdysozoa, Panarthropoda, Filo Arthropoda; Subfilo Chelicerata; Classe Arachnida; Subclasse Acari; Super ordem Parasitiformes; Ordem Ixodida; Super família Ixodoidea. Família Ixodidae; Subfamília Rhipicephalinae; Gênero *Rhipicephalus*; Subgênero *Boophilus*.

Carrapatos do complexo *R. microplus* se distribuem em cinco taxa: *R. australis*, *R. annulatus*, *R. microplus sensu clado A*, *R. microplus sensu clado B* (BURGER *et al.*, 2014), e *R. microplus sensu clado C* (LOW *et al.*, 2015). Métodos baseados no DNA mitocondrial estão auxiliando taxonomistas quando há dificuldades em estabelecer diferenças morfológicas para distinguir membros do complexo *R. microplus*.

Estudo de filogenia realizado no Brasil com o uso do DNA mitocondrial (COI) pôde observar que o haplótipo 3 (H3) apresentou divergência entre o restante dos haplótipos da população brasileira de *R. microplus*. Portanto, a análise haplotípica consiste em pelo menos duas populações brasileira diferentes de *R. microplus* (CSORDAS *et al.*, 2016).

2.1.3 Morfologia e ciclo biológico

Estruturalmente, as formas ninfas e adultas de *Rhipicephalus microplus* possuem quatro pares de patas, enquanto as larvas possuem três. As fêmeas desta espécie (Figura 1) podem chegar a 13 mm de tamanho e, quando ingurgitadas, tendem a aumentar sua dimensão corporal em até 200 vezes junto com seu peso, ao ingerir 0,5 mL a 3 mL de sangue. Os machos (Figura 1) mede cerca de 1,5 a 2,5 mm de extensão e possui dois pares de placas adanais, além de uma proeminência em forma de cauda. O gnatossoma ou capítulo tem formato hexagonal, curto, achatado, com a base aderida à parte anterior do corpo, o que caracteriza essa espécie (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2006).

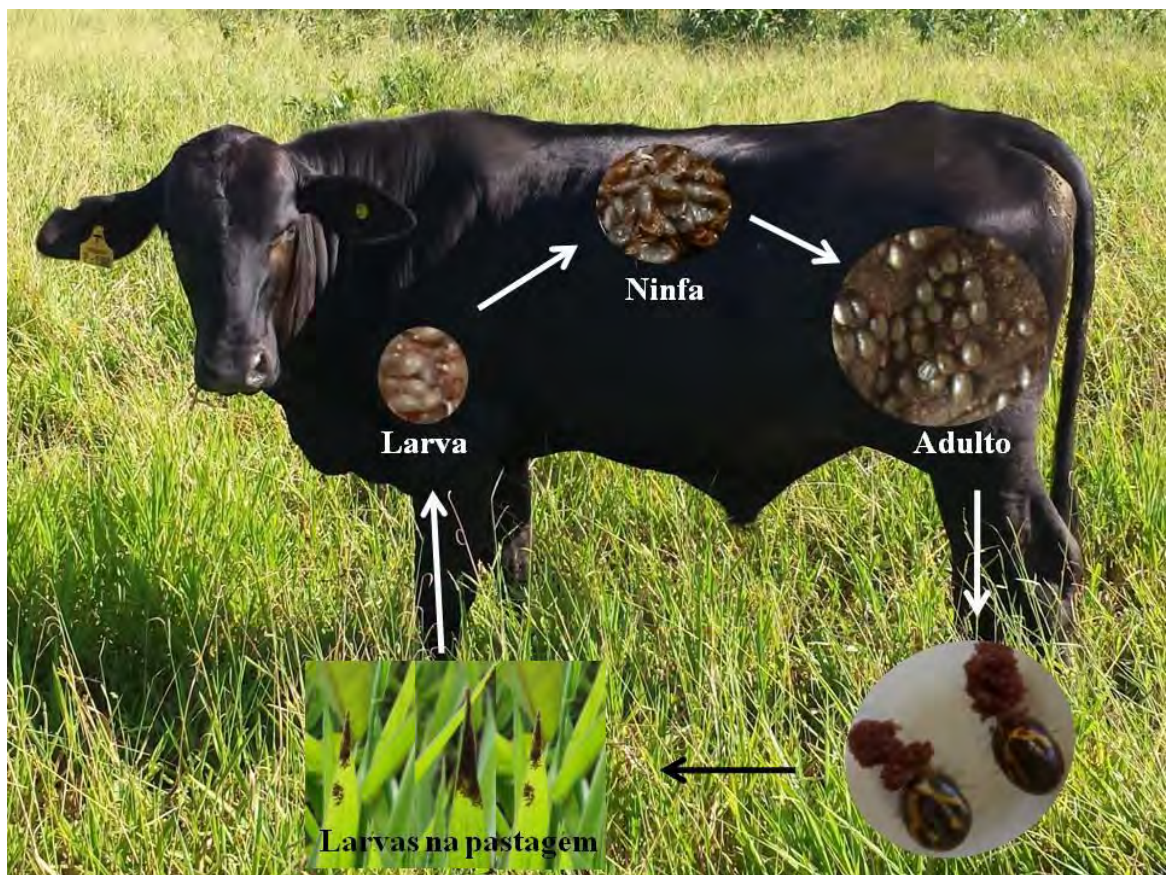
Figura 1 - Fêmea ingurgitada e macho de *Rhipicephalus microplus*



Fonte: Museu do carrapato – Embrapa Gado de Corte (2018).

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é monoxeno, ou seja, o ciclo de vida parasitário é desenvolvido em apenas um hospedeiro, a outra fase do ciclo é a de vida livre que se inicia quando a fêmea está pronta para a oviposição, então se desprendem do hospedeiro, seguem em direção ao solo e se abrigam entre a vegetação (Figura 2). Esses abrigos fazem parte da estratégia utilizada por este carrapato, para fugir de possíveis predadores e depositar seus ovos o mais perto possível de prováveis hospedeiros (DANTAS-TORRES, 2010; GONZALES *et al.*, 1975).

Figura 2 - Ciclo de vida monoxeno do carrapato *Rhipicephalus microplus*



Fonte: Museu do carrapato – Embrapa Gado de Corte (2018).

Cerca de 50% a 60% da massa corporal da teleógina é convertida em aproximadamente 3000 a 4000 ovos. Por consequência, as teleóginas podem provocar anemia aos hospedeiros, dependendo da infestação, transmitir patógenos via repasse sanguíneo, lesão na pele dos animais, além de produzir a próxima geração de carrapatos aptos a infestarem novamente seus hospedeiros (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2006; FURLONG, 1993).

Durante a postura da teleógina, os ovos são impermeabilizados pelo órgão de Gené, este órgão é responsável por manter os ovos lubrificadas e aglutinados, evitando que se desidratem.

Os ovos, em condições favoráveis (27° C e umidade 80%), eclodem entre 15- 21 dias (DE LA VEGA *et al.*, 2012; GONZALES *et al.*, 1975; SONENSHINE, 2014).

Os ovos, ao eclodirem, dão origem a larvas que terão período médio de 18 a 26 dias para a fase parasitária. As larvas infestantes, são geotropicamente negativas, ou seja, se posicionam nas pontas das folhas na pastagem e aguardam o hospedeiro passar por entre as pastagens por 6 meses ou mais. As larvas parasitárias, sofrem duas ecdises e a diferenciação sexual quando se transformam em machos ou fêmeas; estas fêmeas quando adultas, irão se desenvolver em teleóginas, as quais pelo hábito hematófago irão se alimentar dos hospedeiros, até o momento da nova postura e os machos permanecem mais tempo sobre o hospedeiro e se acasalam com outras fêmeas. Assim, 95% dos parasitas se encontram no ambiente em estágio de ovos, larvas e teleóginas, enquanto apenas 5% estão nos hospedeiros (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2006; DE LA VEGA *et al.*, 2012; REY, 2001; SONENSHINE, 2014).

2.2 Problemas na saúde pública e prejuízos econômicos causados pelo *Rhipicephalus microplus*

O método mais comumente usados para o controle do carrapato, é a aplicação direta de acaricidas aos animais hospedeiros. Embora, o controle químico deste ectoparasita tenha reduzido o índice de doenças transmitidas por carrapato para os animais, ajudando no aumento da produção da pecuária, os efeitos desses agentes ao longo do tempo representam alto risco para a saúde pública, podendo permanecer ativos no meio ambiente, afetando ecossistemas (JAVARONI *et al.*, 1991).

Sendo assim, o monitoramento e a vigilância desses produtos em águas, solos, alimentos e ar se fazem necessário. Portanto, este método de controle contra carrapato pode comprometer a segurança alimentar e atinge diretamente o mercado consumidor, que busca cada vez mais por alimentos saudáveis e produzidos de forma sustentável (BRASHEARS; CHAVES, 2017; FURLONG *et al.*, 2007).

A perda de um animal ou a redução de sua produtividade, pode afetar mais de um tipo de capital como os possíveis efeitos adversos na saúde pública, como o risco a intoxicação do operador no manuseio do acaricida. Essas pessoas tendem a diminuir o cuidado durante a manipulação, devido a alta frequência do uso desses produtos, que são tóxicos, ao serem absorvidos pela pele. Por consequência do uso desses venenos, que atuam principalmente no sistema nervoso central, podem causar alergias, intoxicações e processos tumorais (FURLONG, 2007).

Com relação a questão do limite mínimo de resíduo permitido pela legislação, aqueles que não estiverem capacitados a produzir leite e carne com qualidade e sem resíduos, sofrerão as penalidades do mercado. Será cada vez mais forte a pressão, tanto da indústria quanto da sociedade, para a aquisição de leite com níveis de resíduos dentro dos padrões mundialmente recomendados para a segurança alimentar (FURLONG, 2007).

Além de todos os riscos e impacto comercial, o controle químico, através principalmente da formamida, piretróide e organofosforados, tiveram registradas populações de carrapatos resistentes (ALVES-BRANCO *et al.*, 1992; BARROS *et al.*, 2013). Em um trabalho de resistência, foi demonstrado com o uso do teste de imersão de adultos (TIA), a ocorrência de falha no controle químico, apresentando uma eficácia menor de 90% em várias localidades no Brasil, chegando a uma resistência de 48%, independente do acaricida que foi utilizado (HIGA *et al.*, 2016).

Outro fator problemático é que tantos animais domésticos ou selvagens, desempenham papéis importantes como reservatórios zoonóticos de patógenos, que são transmitidos por carrapatos aos seres humanos. Sendo assim, devido a sua alimentação de sangue ser um hábito obrigatório, se tornam importantes vetores de várias classes de microrganismos de relevância, tanto para saúde pública como veterinária. A estimativa de que no Brasil, existam cerca de 71 espécies de carrapatos pertencentes a família Ixodidae e Argasidae (KRAWCZAK *et al.*, 2015; LABRUNA *et al.*, 2016; MUÑOZ-LEAL *et al.*, 2017; WOLF *et al.*, 2016). O potencial de transmissão de doenças por estes vetores, justifica a necessidade de buscar por formas de controle mais eficazes.

As doenças transmitidas por carrapatos afetam 80% da população bovina do mundo e estão amplamente distribuídas pelos continentes, particularmente nos trópicos e subtropicais, sendo amplamente aceito que as doenças hemoparasitárias transmitidas por carrapatos são as doenças de bovinos mais importantes no mundo (DE CASTRO, 1997).

Estima-se, que os custos globais associados a carrapatos e TBD em bovinos tenham sido entorno de US \$ 18 bilhões ao ano. No Brasil, o prejuízo econômico anual é de US \$ 3,24 bilhões. Quando combinados parasitas internos e externos, a perda econômica anual chegou a US \$ 13,96 bilhões. (DE CASTRO, 1997; GRISI *et al.*, 2014).

Existem outros métodos, ditos alternativos para o controle de carrapatos, apesar de sua resposta ainda pouco expressiva. Dentre os métodos, estão: seleção de bovinos resistentes aos carrapatos (TEODORO *et al.*, 2004), rotação de pastagens (ELDER *et al.*, 1980), cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das larvas (SUTHERST *et al.*, 1982), controle

biológico com o uso de *Egretta ibis* – ou garça-vaqueira (ALVES-BRANCO *et al.*, 1983), e formigas (GONZALES *et al.*, 1975).

Controle utilizando patógenos como o fungo *Beauveria bassiana* (CORDOVÉS, 1997) e a bactéria *Cedecea lapagei* (BRUM, 1988), fitoterápicos (ANDREOTTI *et al.*, 2013) e a utilização de gado Nelore como higienizadores para outras raças, como Angus, quando animais Nelore são infestados por carrapatos, os instares imaturos tentam se desenvolver, mas os perfis genéticos do Nelore, inibem o desenvolvimento do carrapato, fazendo dessa forma uma higienização do campo (ANDREOTTI *et al.*, 2018).

As vacinas surgem neste contexto como uma ferramenta promissora para o controle do carrapato, podendo ser usadas em associação com o controle químico ou biológico, diminuindo o número de aplicações dos acaricidas, custos gerais envolvidos e os impactos sobre o ambiente, saúde animal e na saúde pública. Em meio à grande procura de outros métodos que possam auxiliar no controle do carrapato, as vacinas, com a indução da resposta imune em bovinos e contra os carrapatos, tem mostrado resultados positivos (ANDREOTTI *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2012; FURLONG; 2007).

2.3 Resposta imune do hospedeiro contra carrapatos

Anticorpos podem conferir resistência neutralizando antígenos que os carrapatos injetam dentro de seus hospedeiros e, uma vez que o sangue do hospedeiro é ingerido, os sistemas hemostático e imune são capazes de danificar os tecidos do parasita (CASADEVALL; PROFSKI, 2001; WIKEL, 1996).

O conceito de resposta imune clássica inicia a partir do contato primário do sistema imune com o antígeno, estes antígenos, estão relacionados com a resistência do hospedeiro ao parasita e há o processamento destes, pelas células apresentadoras de antígeno (APC). Posteriormente, ocorre apresentação dos determinantes antigênicos às células imunocompetentes CD4⁺, estas células são associadas ao Complexo Maior de Histocompatibilidade do Tipo II (MHC-II) (BONA *et al.*, 1998; BROSSARD; WIKEL, 2004).

Pode ocorrer a apresentação destes determinantes as células CD8 +, associadas ao MHC-I, as quais modulam a resposta protetora com a produção de citocinas. Dependendo dos tipos de citocinas produzidas, estas serão direcionadas a resposta para células T *helper* -2 (Th2), que conta com uma maior produção de anticorpos por linfócitos B, ou Th1, que tem o tipo de resposta celular predominante (BONA *et al.*, 1998).

A célula Th, é um tipo de célula ativada e participa de respostas independentes de fagocitose, além de regular negativamente as respostas pró-inflamatórias induzidas por células Th1. As células Th2 segregam interleucina (IL) -4, IL-5 e IL-6 (GUY, 2007).

A memória imunológica ocorre por células T e B e depende do antígeno que irá estimular um dos tipos celulares, no contato prévio. Quando o contato primário inicia, a maioria das células T e B são marcadas e morrem por apoptose, algumas não marcadas para sofrerem apoptose, são selecionadas para gerar células de memória, com uma alta afinidade por antígeno específico (SPRENT, 1997); essas células são marcadas por moléculas de adesão (marcadores de superfície celular) que interagem com fatores inibidores das funções pro apoptóticas (CORY, 1995).

A resposta imune de bovinos contra determinados antígenos é heterogênea, mas sempre tem uma maior produção que pende ou para resposta do tipo Th1 ou do tipo Th2 (BROWN *et al.*, 1993). Esta heterogeneidade relaciona-se com o perfil de citocinas produzidas e secretadas.

Nos anticorpos, as diferenças estão relacionadas com as classes de imunoglobulinas produzidas, como em bovinos, as classes IgG1 e a IgG2 fixam o sistema complemento, sendo que a IgG2 tem maior atividade para mediar a fagocitose em relação à IgG1 (McGUIRE *et al.*, 1979). A produção de IgG1 por linfócitos B é induzida pela interleucina-4 (IL-4) enquanto que o interferon (IFN- γ) estimula a produção de IgG2 (ESTES *et al.*, 1995).

A importância de entender melhor o envolvimento da resposta imune dos hospedeiros contra *R. microplus*, bem como os mecanismos de evasão do parasita ao sistema imune do hospedeiro, facilitará o desenvolvimento de métodos vacinais, que auxiliem em uma resposta imune bem sucedida contra o carrapato.

2.4 Vacinas contra *Rhipicephalus microplus*

O controle imunológico desenvolvido por vacinas contra os carrapatos vem sendo pesquisado há mais de meio século. Esses potenciais vacinais devem conter epítomos (é a menor porção do antígeno com potencial de gerar a resposta imune), que são produzidos pelos próprios carrapatos e que promovam a imunidade nos bovinos (ROBERTS, 1968; WILLADSEN *et al.*, 1988; WILLADSEN, 2004).

As principais vantagens de uma vacina sobre os acaricidas são: agentes não tóxicos, menor custo e o desenvolvimento de carrapatos resistentes à vacina ocorre de forma mais lenta, quando comparados aos produtos químicos (WILLADSEN, 2004).

Embora a taxa evolutiva e a estabilidade imunológica a longo prazo de um determinado antígeno de carrapato não possam ser previstas com precisão, a especiação simpátrica (divergência genética entre as populações de carrapatos na mesma região geográfica), rapidamente é impulsionada pela especificidade imune do hospedeiro (DE MEEÛS *et al.*, 2010; PEPPER, 2008).

Para os vacinologistas, ao almejar uma vacina ideal, a característica altamente desejável para antígenos componentes anti-carrapato, é a capacidade de provocar uma resposta imune protetora em mais de uma espécie ou gênero desse ectoparasita. Isso teria aplicação prática no controle de múltiplos vetores de carrapatos e impulsionaria o controle de carrapatos em países com capacidade limitada para desenvolver vacinas contra espécies locais (PARIZI *et al.*, 2012).

2.4.1 Vacina recombinante

A vacina recombinante é produzida por meio de tecnologia de DNA recombinante. Isto envolve a inserção de DNA (por exemplo, DNA do carrapato) que codifica porções antigênicas (tal como uma proteína de superfície) que estimula uma resposta imunitária. Este antígeno pode ser expresso em células bacterianas e depois purificados destas (NATURE, 2018).

O desenvolvimento e o fornecimento de vacina recombinante podem ser divididos em vários estágios consecutivos: a identificação e caracterização de antígenos protetores; a produção de antígenos como proteínas recombinantes imunologicamente eficazes e comercialmente viável; a apresentação de antígenos no contexto da resposta imunológica desejada; a validação do protótipo da vacina em uma situação de campo e, finalmente, sua entrega ao mercado. As últimas etapas deste processo serão acompanhadas por muita atividade comercial tanto no registro do produto quanto na identificação e desenvolvimento do mercado (WILLADSEN, 2004).

Proteínas recombinantes se mostram bons imunógenos e tem menor chance de perder as propriedades imunogênicas de uma proteína nativa, pelo contrário, muitas podem intensificar essas propriedades. Um bom imunógeno deve ter como características principais no sistema imune: a capacidade de ser internalizados e processados pelas APC, além de ter afinidade pelo MHC. Nas proteínas recombinantes, o número de peptídeos que se ligam ao MCH-II é maior, quando comparado com o desempenho de proteínas nativas, aumentando a resposta imune (BONA *et al.*, 1998).

A interação de proteínas recombinantes pode ser diretamente ao MHC II e, se estas ainda assim forem imunógenos que causam pouca resposta, seja por causa do tamanho ou da meia-

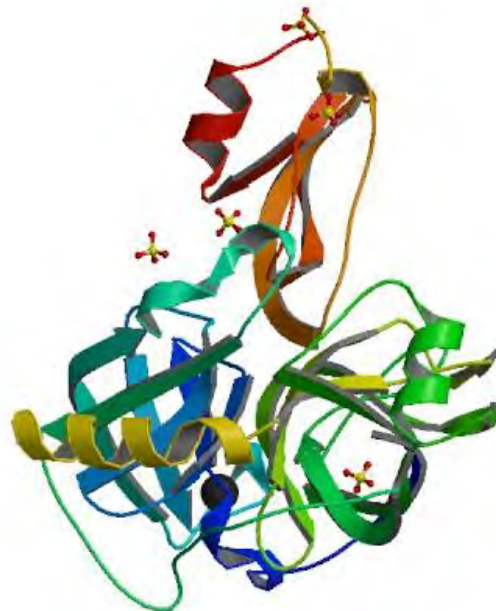
vida por ser rapidamente degradados por enzimas proteolíticas, estas proteínas podem ser associadas a adjuvantes carreadores. Além disso, o MHC-II tem a capacidade de apresentar determinantes antigênicos a partir de 30 aminoácidos (ABBAS, 1997).

2.4.2 BmTI

A proteína BmTI pertence a família das proteínas Kunitz (proteases inibidores de tripsina) e possui uma estrutura com modelo amplamente estudado (Figura 3). O carrapato *R. (B.) microplus* tem diversos tipos de inibidores de serina proteinase e essas moléculas são distribuídas durante o desenvolvimento de vida do carrapato (VERMEULEN *et al.*, 1988).

As larvas necessitam de um sistema eficiente para prevenir a resposta de defesa do hospedeiro durante a alimentação, e isso pode ser devido a crescente atividade inibitória da elastase neutrofílica dos ovos para larvas não alimentadas. A elastase neutrofílica é uma enzima importante na migração de leucócitos, fenômeno que ocorre na primeira fase da resposta inflamatória (ANDREOTTI *et al.*, 2002).

Figura 1 - Estrutura cristalizada de tripsina complexada com BPTI (inibidor de tripsina pancreática bovina)



Fonte: Kawamura *et al.*, (2011).

Os primeiros estudos realizados na Austrália, estão datados a mais de 50 anos, com isolamento de inibidores de tripsina (BmTI) de *R. Microplus*. A partir da purificação do inibidor de tripsina com o tamanho de aproximadamente 18,5 quilodaltons (kDa), obtiveram a comprovação de sua ação inibitória sobre tripsina e quimiotripsina nas fases de ovos e larvas em *R. (B.) microplus*. Além disso, foi demonstrado que este inibidor provocava uma reação de hipersensibilidade imediata em bovinos e que esta reação era uma resposta imunológica específica, sugerindo que esta reação imune poderia ser um fator de resistência dos bovinos ao carrapato (VERMEULEN *et al.*, 1988; WILLADSEN; RINDING, 1979).

Estudos vacinais realizados em Campo Grande, com a proteína recombinante de inibidor de tripsina, (peso molecular de aproximadamente 46 kDa) foi nomeada rRmLTI. A homologia estrutural com a forma nativa do inibidor de tripsina de larvas foi documentada pelo reconhecimento da rRmLTI em *Western blotting*. Análises de bioinformática das sequências parciais de nucleotídeos e de seus aminoácidos indicaram que a rRmLTI assemelha-se a BMTI-6, que é uma proteína com três domínios Kunitz, presente em ovário e tecido adiposo de carrapatos (ANDREOTTI *et al.*, 2012).

Anteriormente a estes estudos, inibidores de tripsina de larvas de *R. microplus* purificados em sua forma nativa induziram resposta imune protetora em bovinos vacinados de 73%. Porém quando utilizado somente a forma sintética de um peptídeo derivado da proteína BmTI-A, o potencial vacinal foi de apenas 18,4%. Já em estudo com polipeptídeo recombinante em sistema de expressão por levedura, foi observado eficácia de 32% (ANDREOTTI *et al.*, 2002, ANDREOTTI *et al.*, 2007; ANDREOTTI *et al.*, 2012).

A imunogenicidade da rRmLTI reflete na cinética da resposta imune humoral bovina, devido o efeito sobre a taxa de eclosão de larvas de ovos ser significativo. Uma sugestão seria a utilização de adjuvantes que pudessem aumentar a eficácia de uma vacina polivalente, formulada com inibidores do tipo Kunitz de *R. (B.) microplus*, potencializando a resposta humoral (ANDREOTTI *et al.*, 2012; KUSI *et al.*, 2010).

No trabalho aqui desenvolvido, foi utilizado o domínio 2 e 3 da sequência parcial de nucleotídeos deste inibidor de tripsina (rRmLTI), de larvas de *R. (B.) microplus*, para fazer parte de uma proteína recombinante em sistema de expressão por *Escherichia coli*, para investigar as propriedades imunoprotetoras.

2.4.3 Bm86

A proteína Bm86 é uma glicoproteína de 89 kDa, ligada à membrana, localizada na superfície das células do intestino em *R. (B.) microplus* (WILLADSEN *et al.*, 1989). Esta proteína é expressa nas células intestinais dos carrapatos fêmeas adultas, em larvas, ninfas, machos adultos e ovários de fêmeas adultas ingurgitadas (BASTOS *et al.*, 2010).

Modelos experimentais como os bovinos, quando imunizados com Bm86, produzem anticorpos que reconhecem a Bm86 presente na superfície das células intestinal do carrapato. Quando estes ectoparasitas se alimentam com o sangue do animal, esses anticorpos, juntamente com o sistema complemento e outros componentes do sistema imune do hospedeiro, causam o rompimento das células epiteliais do intestino, ocasionando a opsonização e morte celular (GOUGH; KEMP, 1993; WILLADSEN *et al.*, 1989).

As consequências ao carrapato podem ser: a morte, a redução no número e no peso de teleóginas, além de não conseguirem realizar a postura, devido a falta de energia para a formação dos ovos. Por consequência, após a vacinação, há uma diminuição na eficiência reprodutiva de teleóginas (KEMP *et al.*, 1989).

Nos primeiros estudos vacinais utilizando Bm86, esta proteína foi isolada, clonada e expressa em *E. coli*. A experimentação vacinal promoveu uma proteção menor que a proteína nativa, sugerindo que a ausência de glicosilação na proteína expressa por *E. coli* fosse a responsável por este resultado (RAND *et al.*, 1989). A proteína Bm86 foi então clonada e expressa em *Pichia pastoris*, apresentando, em teste com bovinos, reduções de 50% de peso, 31% de número e 70% de habilidade reprodutiva de *R. microplus* que se desenvolveram no hospedeiro (RODRIGUEZ *et al.*, 1994).

A proteína Bm86 foi classificada como antígeno oculto. Antígeno devido a resposta imune ser efetiva, e oculta, por estar presente no tubo digestivo do carrapato, mas não entrar em contato com o sistema imunológico do hospedeiro (WILLADSEN; KEMP, 1988). Sua localização foi descoberta utilizando anticorpo marcado com ouro coloidal, demonstrando sua presença na superfície apical de células do intestino do carrapato, com maior concentração nas microvilosidades das células digestivas (GOUGH; KEMP, 1993).

Vacinas baseadas em antígenos Bm86 demonstraram controle efetivo das infestações por *R. microplus* e *R. annulatus*. Este antígeno também induziu proteção parcial contra *R. decoloratus*, *R. appendiculatus*, *R. sanguineus*, *Amblyomma cajennense* e *Hyalomma dromedarii* (DE LA FUENTE *et al.*, 1998; DE LA FUENTE *et al.*, 2000; DE VOZ *et al.*, 2001; RODRIGUEZ-VALLE *et al.*, 2012).

Uma vacina experimental foi desenvolvida com base na sequência ortóloga de Bm86 de *R. australis* e a proteína recombinante foi expressa em *Escherichia coli*. O gado vacinado apresentou 40,3% menos carrapatos que o gado não vacinado e, o desempenho reprodutivo dos carrapatos também foi afetado pela vacina. Os carrapatos que infestaram os animais vacinados depositaram 51,2% menos massa de ovos, com diminuição de 18,8% na fertilidade em comparação ao grupo controle. O uso da vacina reduziu a população de carrapatos em 74,2% a cada geração (HÜE *et al.*, 2017).

Em Mato Grosso do Sul, foram realizados estudos com animais vacinados com a sequência do gene Bm86-Campo Grande (Bm86-CG), e comparados com a Bm86 nativa e Bm95 (proteína homóloga à proteína Bm86). Este estudo permitiu caracterizar a Bm86-CG com um perfil hidrofóbico mais próximo da Bm95 na região N-terminal e, demonstrou comportamento similar a Bm86 na região C-terminal. O antígeno rBm86-CG mostrou eficácia de 31% contra a cepa CG de *R. microplus* utilizada para infestar os bovinos vacinados (ANDREOTTI *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2012).

Constatando que ainda não há relatos de eficiência vacinal ao fusionar partes de proteínas antigênicas com epítomos para rBmCG e rRmLTI de *R. microplus*, este trabalho buscou desenvolver novos métodos de controle.

2.4.4 Adjuvantes e imunomoduladores da resposta imune

Os adjuvantes são definidos como compostos que podem aumentar e/ou modular a imunogenicidade intrínseca do antígeno. O termo adjuvante é derivado do latim *adjuvare*, ou seja, função de promover ajuda. Algumas vacinas como as derivadas de proteínas recombinantes, precisam de mais ajuda do que as vacinas bem estabelecidas, para reduzir a reatogenicidade (efeito colateral local ou sistêmico no organismo). Essas vacinas têm uma composição mais definida frequentemente associada a uma menor imunogenicidade (ULMER *et al.*, 2006).

Os adjuvantes são, portanto, necessários para ajudar vacinas recombinantes a induzir respostas imunes potentes e persistentes, com os benefícios adicionais de que menos antígenos e menos injeções são necessárias. Além disso, novos alvos vacinais frequentemente requerem a indução de respostas, incluindo células T *helper* e de anticorpos (GUY, 2007; HUNTER, 2002).

Os sais de alumínio são adjuvantes que têm sido mais amplamente utilizados em humanos e, são ótimos auxiliares para a produção de anticorpos. Entretanto, em animais de produção, esse tipo de adjuvante não é recomendado. Vacinas contendo hidróxido de alumínio causam desenvolvimento de granulomas em suínos, devido ao estímulo de produção de IgE, causando graves prejuízos (ALLISON; BYARS, 1986; VALTULINI *et al.*, 2005).

Saponinas são ótimos adjuvantes veterinários, porém estimulam a produção predominantemente de resposta Th1, sendo ineficiente para vacinas que necessitam de resposta tipo Th2 (GUY, 2007).

Outros tipos de adjuvantes são os derivados de micro-organismos, como alguns componentes bacterianos de *Vibrio cholerae* (toxina do cólera - CT), e *Escherichia coli* (subunidade B termolábil - LTB). Essas proteínas previnem a indução de tolerância ao antígeno específico e levam a uma resposta sistêmica de Imunoglobulina G (IgG) (ELSON; EALDING, 1984, KATZ *et al.*, 1997).

A estrutura tridimensional da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* contém uma subunidade A, que é composta de estrutura globular conectada à subunidade B, por uma alça sensível à tripsina e uma longa-hélice, cujo C-terminal entra na cavidade central do oligômero B (Figura 3) (SIMMONS *et al.*, 2001).

Figura 2 - Estrutura tridimensional da toxina termolábil de *Escherichia coli*



Fonte: Simmons *et al.*, (2001)

Estudos experimentais utilizando modelos murinos que normalmente não montam respostas significativas de anticorpos secretores ou sistêmicos a toxina do tétano, demonstraram que, se a toxina tetânica for misturada com proteínas CT ou LT, os camundongos prontamente

irão soro converter e produzir IgA da toxina antitetânica nas superfícies de mucosas locais, modulando a resposta imune nestes animais (DOUCE *et al.*, 1997; XU-AMANO *et al.*, 1993).

A resposta imune a antígenos heterólogos coadministrados com LTB, está fortemente associada a resposta de células Th2 (RICHARDS *et al.*, 2001). Estudos realizados com *Herpes simplex vírus* HSV demonstraram que embora as respostas proliferativas de linfonodos ao vírus, após a imunização intranasal usando LTB como adjuvante envolvam a produção de interferon (IFN) - γ , os níveis de interleucina (IL) -4 são altos e a resposta do anticorpo é dominada por altos níveis de IgG1 e IgA (RICHARDS *et al.*, 2001; WILSON *et al.*, 1993).

Outro ponto importante é que a LTB desencadeia a produção de interleucina (IL-10) enquanto bloqueia a liberação de IL-12 por monócitos. A inibição da IL-12 pode ser um importante estímulo na prevenção da ativação de Th1, enquanto a IL-10 pode atuar indiretamente para aumentar a reatividade de Th2 (BRAUN *et al.*, 1999).

As emulsões de óleos minerais são as categorias de adjuvantes que tem sido largamente utilizada em animais. Os adjuvantes de óleo mineral são normalmente melhores que os óleos não minerais em proteínas recombinantes e demonstraram induzir anticorpos de título elevado que persistem por longos períodos de tempo (AUCOUTURIER *et al.*, 2001; IYER *et al.*, 2001).

Ao estudar tipos de adjuvantes, Freund (1951), observou expressivo aumento na produção de anticorpos ao incorporar determinantes antigênicos conhecido como adjuvante completo de Freund (*Freund's Complete adjuvante* - FCA), composto de uma emulsão água em óleo e *Mycobacterium* sp. E o adjuvante sem a adição do microorganismo, chamado de adjuvante incompleto de Freund (*Freund's incomplete Adjuvant* - FIA).

Entretanto, existem diversos relatos sobre as lesões associadas à administração de FCA e FIA, como necrose local e resposta inflamatória granulomatosa, com macrófagos cheios de óleo foamy (BRODERSON 1989; LEENAARS *et al.*, 1994, 1998; STILLS; BAILEY, 1991; STILLS, 2005).

Na Nova Caledônia, estudos com três adjuvantes (Montanide™ Gel 01 de polímero aquoso, Montanide™ ISA 201 VG feito em água/óleo/água e Montanide™ ISA 61 VG água/óleo - Seppic), foram testados em vacinas para gado. Foi comparado a eficácia e segurança destes adjuvantes e o adjuvante que obteve título de anticorpos elevado, sem efeitos colaterais, foi o adjuvante Montanide™ ISA 61 VG, considerado como o mais adequado dentre os três testados para esta vacina (PETTERMANN *et al.*, 2017).

O trabalho aqui apresentado, utilizou adjuvantes derivados da *E. coli* (LTB), juntamente com Montanide™ ISA 61 VG (Seppic), no intuito de induzir respostas imunes do tipo Th-2 que sejam potentes e persistentes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Selecionar antígenos candidatos à vacina contra carrapatos *Rhipicephalus microplus*.

3.2 Objetivos específicos

Para o alcance do objetivo geral foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) caracterizar por métodos moleculares a proteína recombinante RmLTI-BmCG-LTB (Artigo -1);
- b) desenvolver uma vacina baseada na proteína recombinante RmLTI-BmCG-LTB, para o controle carrapatos *Rhipicephalus microplus* (Artigo-1);
- c) verificar por métodos *in silico*, a possibilidade de criar uma vacina global baseada em epítomos conservados da proteína Bm86, contra carrapatos *Rhipicephalus microplus* (Artigo-2).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Estão descritos abaixo os principais materiais e métodos utilizados em dois experimentos (Experimento - 1, 2), que geraram a produção de dois artigos publicados.

4.1 Local da realização de cada experimento

O trabalho de produção de proteína recombinante e desenvolvimento do potencial imunógeno (Experimento - 1), foi realizado no Laboratório de Microbiologia, Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, no estado de Rio Grande do Sul.

Para a inoculação do potencial imunógeno nos animais, foram realizados na fazenda localizada em uma zona rural (33° 31' 8" S, 53° 22' 4" O) (propriedade privada), município de Chui, no estado do Rio Grande do Sul. Esta localização é considerada uma zona livre de infestação por *R. (B.) microplus*. Posteriormente, para o teste em estábulo com a infestação de carrapatos *R. (B.) microplus* nos animais, foram realizados na fazenda localizada em uma zona rural (31° 21' 54" S, 51° 58' 40" O) (propriedade privada), município de São Lourenço do Sul, no estado do Rio Grande do Sul. Esta localização é considerada uma zona que já tem infestação por *R. (B.) microplus*.

Todos os protocolos utilizados, foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA nº 4889-2015) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O CEEA da UFPel é credenciado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

O trabalho *in silico* (Experimento - 2), foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Carrapato, Departamento de Saúde Animal, Embrapa Gado de Corte, no município de Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul.

4.2 Seleção *in silico* (Experimento - 1)

As sequências aminoácidas das proteínas Bm86-CG (GenBank: ACA5782), BmTI (GenBank: P83606) e LTB (GenBank: ACJ23372), foram utilizados como referência para desenvolver o gene sintético. Estas sequências foram analisadas utilizando o seguinte software de bioinformática: SignalP 4.1 Server, TMHMM Server v.2.0, Predição de Epítopo de Anticorpo IEDB, ProtScale e Vector NTI Advance® 11 (EMINI *et al.*, 1985; JAWALE, 2014).

Foram seleccionadas regiões codificantes e expostas à superfície da proteína recombinante, predominantemente hidrófilas e com um elevado número de epítomos lineares. Os locais para as enzimas de restrição BamHI e HindIII foram adicionados entre o gene sintético. O ligante (2xSerGly) foi inserido entre cada porção do gene para permitir o dobramento adequado da proteína. A estrutura da proteína *in silico* foi construída usando o servidor online Swiss Model (EMINI *et al.*, 1985).

4.3 Seleção *in silico* (Experimento - 2)

Foram utilizadas ferramentas baseadas nos Complexos de Histocompatibilidade Principal (MHC), antígeno leucocitário bovino (BoLA) e modelo murino (antígeno H-2). As predições de MHC classe I e II, baseiam-se exclusivamente no antígeno H-2 de modelo murino, porque é um modelo animal normalmente usados para rastrear antígenos candidatos antes de realizar testes em modelos bovinos (AGUIRRE *et al.*, 2016; CONTRERAS *et al.*, 2016; LEW-TABOR; RODRIGUEZ-VALLE, 2016).

Para os parâmetros de predição dos três epítomos analisados, com base nas sequências aminoacídicas da Bm86-CG (GenBank:ACA57829), foram utilizados ligantes de MHC de classe I, os alelos BoLA-AW10, BoLA-N: 00101 e BoLA-D18. Para os modelos murinos MHC I, três alelos foram utilizados (H-2-Qa1, H-2-Dd e alelos H-2-LD). Para a ligação ao MHC de classe II murino, os alelos H-2 e H-IAb-2-IAd foram utilizados (VITA *et al.*, 2018).

Para as demais predições, foram utilizados algoritmos de epítomos lineares para linfócitos B, epítomos expostos na superfície da proteína na estrutura terciária, predição de hélices transmembrana, predição de regiões proteicas intrinsecamente desordenadas; predição de peptídeo sinal e predição de âncoras de glicofosfatidilinositol (GPI) (DOSZTÁNYI *et al.*, 2005; PIERLEONI *et al.*, 2008; VITA *et al.*, 2018).

4.4 Clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante (Experimento - 1)

O gene rRmLTI-BmCG-LTB foi sintetizado quimicamente (GenOne, Brasil). O DNA sintético foi fornecido no vetor pAE. No dia anterior à transformação, as estirpes de *E. coli* BL21 (DE3), C41 (DE3) e C43 (DE3) (CDTec-UFPEL) foram semeadas em placas de ágar Luria-Bertani (LB) e incubadas a 37°C. Para transformação, 2 mL de plasmídeo (100 ng/mL) foram adicionados ao microtubo de 1,5 mL contendo células quimicamente competentes,

seguido pela aplicação do protocolo de choque térmico (DAGERT, EHRLICH, 1979; KUMAR *et al.*, 2016).

As colônias isoladas dos transformantes foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 75 mL de caldo Terrific Broth (TB) ou 2x extrato de levedura-triptona (2xYT) ou Luria-Bertani e incubado a 140 rpm por 16 h, 30° C (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Cada pré-inóculo foi expandido em dois tipos de culturas na proporção de 1:20. O primeiro com 500 mL de meio de cultura (TB, LB ou 2x YT) em frasco Erlenmeyer de 2 L, e a adição do pré-inóculo foi seguida por crescimento em agitador orbital. O segundo pré-inóculo foi expandido em biorreator de fermentação (B. Braun Biotech). Neste último caso, utilizou-se 1 L de meio de cultura TB ou 2x YT.

Para cada fermentação em biorreator, a taxa de arejamento foi mantida a 2,5 vvm, e a temperatura foi de 30°C com agitação a 450 rpm. Para o crescimento do inóculo em agitador, a cultura foi mantida a 180 rpm e 30°C. Quando necessário, a formação de espuma foi controlada pela adição de antiespumante (Silicone Antifoam-Sigma-Aldrich, SP, Brasil) em uma diluição final de 1:1000 em ambos os procedimentos. A expressão da proteína recombinante foi realizada utilizando um método previamente descrito (LESSARD, 2013).

A proteína recombinante foi purificada usando coluna HisTrap (5 mL; GE Healthcare Life Science, Bio-Science Corp. Piscataway, EUA) em sistema de purificação ÄKTA (GE Healthcare Bio-Science Corp. Piscataway, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5 Desafio do potencial imunógeno em teste de estábulo (Experimento - 1)

Para todos os experimentos, foram utilizados dois grupos (tratado e controle), de quatro novilhas Angus (3 ± 6 meses de idade). A inoculação da proteína recombinante foi realizada via injeção intramuscular com 200 µg de proteína adjuvada com Montanide™ ISA 61 VG (Seppic) em proporção de 60/40 (v/v) de adjuvante/proteína em volume de 2 mL por dose. As injeções foram realizadas três vezes em intervalos de 15 dias (VARGAS *et al.*, 2010). Os outros quatro animais serviram como grupo controle.

Foram colhidas amostras de soro de cada animal antes da imunização (dia=0) e depois (dia=15, dia=30 e dia=60). Para o desafio, os animais foram transferidos para uma propriedade particular rural no município de São Lourenço do Sul - RS e realocados em estábulos individuais. Vinte e um dias, após a última injeção, os animais foram desafiados com 15.000 larvas de *R. (B.) microplus* depositados no dorso, em três aplicações ao longo de uma semana.

As coletas de carrapatos foram realizadas diariamente, à medida que as fêmeas ingurgitadas começaram a se desprender espontaneamente dos animais. Amostras de carrapatos foram levadas ao laboratório, pesadas e incubadas a 29°C e 85% de umidade relativa até que a postura dos ovos estivesse completa. Massas de ovos foram pesadas e incubadas para determinar a taxa de eclosão, ou seja, a fertilidade.

4.6 Alinhamento das sequências e construção de árvore filogenética (Experimento - 2)

A sequência de proteína Bm86-CG (GenBank: ACA57829) e as três sequências de epítipo preditas foram alinhadas e comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando o programa BLASTp. Dessa forma, construiu-se um banco de dados com todas as sequências similares obtidas da análise. O programa MEGA 6.0 foi aplicado para alinhar as sequências retiradas do GenBank usando modelo de matriz Gonnet (TAMURA *et al.*, 2013).

As análises filogenéticas bayesianas foram realizadas pelo programa MrBayes 3.2.6 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Para a análise dos aminoácidos, foi utilizado o modelo de Dayhoff (DAYHOFF *et al.*, 1978). Para o conjunto de dados usado neste estudo, aproximadamente 500.000 gerações foram consideradas suficientes para topologia das árvores filogenéticas e estas, foram plotadas usando o programa FigTree 1.4.2 (TREE BIO, 2016).

Essas topologias foram usadas para gerar uma árvore consenso representando a probabilidade posterior de clado (1 = 100%). Nenhuma edição manual foi realizada. Os clados de *R. microplus* - TAILÂNDIA (KAEWMONGKOL *et al.*, 2015), *R. appendiculatus* (KAMAU *et al.*, 2011; NIJHOF *et al.*, 2009), *R. decoloratus* (CANALES *et al.*, 2008, ODONGO *et al.*, 2007) formaram grupos com colapsos (triângulo nas árvores). Espécies *Hyalomma detritum* (AEK31101), *H. detritum* (AEK31102) e *H. anatolicum* (ACD14076) foram utilizadas como grupos externos para as análises filogenéticas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estão descritos, nesta seção, resultados e discussão sistematizados em forma de artigos científicos, já publicados (Artigo - 1, 2).

5.1 Artigo - 1



RESEARCH ARTICLE

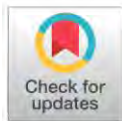
Molecular characterization of the recombinant protein RmLTI-BmCG-LTB: Protective immunity against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*

Bárbara Guimarães Csordas¹*, Rodrigo Casquero Cunha²*, Marcos Valério Garcia^{3,4}*, Sérgio Silva da Silva⁵*, Fábio Leivas Leite²*, Renato Andreotti⁴*, *

1 Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Bolsista de Doutorado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2 Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 3 Bolsista de Pós-Doutorado, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 4 Laboratório de Biologia Molecular do Carrapato, Departamento de Sanidade Animal, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 5 Laboratório de Doenças Parasitárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

* These authors contributed equally to this work.

* renato.andreotti@embrapa.br



OPEN ACCESS

Citation: Csordas BG, Cunha RC, Garcia MV, da Silva SS, Leite FL, Andreotti R (2018) Molecular characterization of the recombinant protein RmLTI-BmCG-LTB: Protective immunity against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. PLoS ONE 13(2): e0191596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191596>

Editor: Paulo Lee Ho, Instituto Butantan, BRAZIL

Received: August 9, 2017

Accepted: January 8, 2018

Published: February 7, 2018

Copyright: © 2018 Csordas et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect, MS)—Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. The funders had no role in study

Abstract

The bovine tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* is found in several tropical and subtropical regions of the world. This parasite transmits pathogens that cause disease, such as babesiosis (*Babesia bovis* and *B. bigemina*) and anaplasmosis (*Anaplasma marginale*). Tick infestations cause enormous livestock losses, and controlling tick infestations and the transmission of tick-borne diseases remains a challenge for the livestock industry. Because the currently available commercial vaccines offer only partial protection against *R. (B.) microplus*, there is a need for more efficient vaccines. Several recombinant antigens have been evaluated using different immunization strategies, and they show great promise. This work describes the construction and immunological characterization of a multi-antigen chimera composed of two *R. (B.) microplus* antigens (RmLTI and BmCG) and one *Escherichia coli* antigen (B subunit, LTB). The immunogenic regions of each antigen were selected and combined to encode a single polypeptide. The gene was cloned and expressed in *E. coli*. For all of the experiments, two groups (treated and control) of four Angus heifers (3–6 months old) were used. The inoculation was performed via intramuscular injection with 200 µg of purified recombinant chimeric protein and adjuvated. The chimeric protein was recognized by specific antibodies against each subunit and by sera from cattle inoculated with the chimera. Immunization of RmLTI-BmCG-LTB cattle reduced the number of adult female ticks by 6.29% and vaccination of cattle with the chimeric antigen provided 55.6% efficacy against *R. (B.) microplus* infestation. The results of this study indicate that the novel chimeric protein is a potential candidate for the future development of a more effective vaccine against *R. (B.) microplus*.

design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Vaccines containing the recombinant antigen Bm86 isolated from the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine have been developed and marketed to induce immunological protection against tick infestation in cattle. Tick management through vaccination reduces environmental contamination and prevents the selection of drug-resistant ticks that results from the continuous application of acaricides. Tick vaccines are an attractive method for controlling ticks, but their efficacy needs to be improved. [1].

In Brazil, the vaccines TickGardPLUS (Intervet Australia) and Gavac™ (Heber Biotec S.A., Cuba) have lower efficiencies than vaccines from other countries (49.2% and 46.4%, respectively) [2]. Ideally, vaccine efficiency should be greater than 50%, as observed in studies involving recombinant proteins identified by sialotranscriptome analysis, where the vaccine conferred an efficacy of 73.2% [3].

To identify a new vaccine that can overcome the limitations of the currently available vaccines, a reverse vaccinology approach was used. Data generated by using the recombinant Bm86-Campo Grande antigen (BmCG) allowed the identification and characterization of recombinant antigens with immunogenic potential for use in more effective vaccines [4–6].

Researchers have used recombinant *R. (B.) microplus* antigens as protease inhibitors. These are part of a group of Kunitz protein molecules (BmTIs) that could potentially be used as immunogens against ticks. Some authors of this work previously reported the concentrations of BmTIs and found that they had increased specificity to neutrophil elastase during the egg to larvae phases [7]. These inhibitors may play a role in the feeding process of the larvae, and the use of antibodies against ticks may impair normal feeding and parasite viability [8]. The use of epitopes from Kunitz proteins in combination with immunogenic portions of other tick molecules in constructions based on multi-antigens represent an interesting strategy for combining proteins from one or more pathogens in a single molecule against *R. (B.) microplus*. This innovation provides a highly efficacious cattle tick vaccine [9].

The heat-labile enterotoxin B subunit from *Escherichia coli* (LTB) has been evaluated as a molecular adjuvant. This non-toxic subunit may have potent immunomodulatory activity as well as protective efficacy when fused or co-administered with a range of antigens. It is also considered a potent mucosal and parenteral adjuvant [10–13]. However, there are no reports of LTB being used in multi-antigen constructs against ticks.

The purpose of this study was to characterize the expression of a novel chimeric protein comprising parts of two LTB-fused proteins of *R. (B.) microplus* (rBmCG and rRmLTI) as a potential immunogen that can be used to control ectoparasites.

Materials and methods

In silico selection of coding sequences and gene design

The amino acid sequences of the proteins Bm86-CG (GenBank: ACA5782), BmTI (GenBank: P83606) and LTB (GenBank: ACJ23372) were used as references to design the chimeric gene (Table 1). These sequences were analyzed using the following bioinformatics software: SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), IEDB-Antibody Epitope Prediction (<http://tools.iedb.org/bcell/>) [14], ProtScale [15], and Vector NTI Advance[®] 11 (Invitrogen) (www.invitrogen.com/VectorNTI).

Regions that were surface-exposed, predominantly hydrophilic and contained a high number of linear epitopes were selected. Restriction sites for BamHI and HindIII were added flanking the gene, and flexible 2x SerGly linkers were inserted between the fragments to enable

Table 1. Amino acid sequences used to construct the recombinant protein.

Protein	Amino acids	Selected fragment (aa)
Histidine	HHHHHH	1–6
RmLTI	LEGSKRFETYCKPETHDRGPKAYIFRWVFNVKTGQCEQFIYGGCQGNKNN YETKSI CETNCLRRQLSELGVSADVHYRKHWNKTYSPNVTVEYPAVHFN VTLNPVCNEP KYPELCKGYF PRYYNSRSK TCKKFIYGGC QSNNGNFLT	7–155
BmCG	RGLRRLRSVCKAGVSCNENEQSECADKGOIFVYENKANCQCPDPTKPGEIG CIERTTCNPKEIQEQDKKLECVYKHNKAECECPDDHECY	168–317
LTB	HKMAPQTITELCSEYRNTQIYTIINDKILSYTESMAGKREMIITFKSGA TFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRITYLIETKIDKLCVWNQKTPNSIAAI	330–432
Linker	SGGGSGGGGS	(156–167), (318–329)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191596.t001>

proper folding of the protein. The protein structure was predicted computationally by using the Swiss Model online server [16].

Cloning, expression and purification of the recombinant protein

The rRmLTI-BmCG-LTB gene was chemically synthesized (GenOne, Brazil). The synthetic DNA was provided in the pAE vector [17]. The day prior to the transformation, the *E. coli* BL21 (DE3), C41 (DE3), and C43 (DE3) (CDTec-UFPEL) strains were streaked onto Luria-Bertani (LB) agar plates and incubated at 37°C. For transformation, 2 µL of plasmid (100 ng/µL) was added to a 1.5-mL microtube containing chemically competent cells [18], followed by application of the heat-shock protocol [19].

The isolated transformant colonies were inoculated into 250-mL Erlenmeyer flasks containing 75 mL of Terrific Broth (TB), 2x yeast extract-tryptone (2xYT) medium or Luria-Bertani broth (LB) culture medium [20] containing ampicillin (100 µg/ml) and incubated at 140 rpm for 16 h at 30°C.

Each pre-inoculum mixture was inoculated into two types of cultures at a 1:20 ratio. The first contained 500 mL of culture medium (TB, LB or 2x YT) in a 2-L Erlenmeyer flask, and addition of the pre-inoculum was followed by growth in an orbital shaker. The second type consisted of a 1.5-L stirred-tank bioreactor (B. Braun Biotech). In the latter case, 1 L of TB or 2x YT culture medium was used. For each fermenter in the bioreactor culture, the aeration rate was kept at 2.5 vvm, and the temperature was 30°C with stirring at 450 rpm. For the growth of the inoculum in the shaker, the culture was maintained at 180 rpm and 30°C. When necessary, foaming was controlled by adding anti-foamer (Silicone Antifoam-Sigma-Aldrich, SP, Brasil) at a final dilution of 1:1000 in both procedures. The expression of recombinant protein was performed using a previously described method [21], with some modifications. Recombinant protein was purified by using a HisTrap column (5 mL; GE Healthcare Life Science, Bio-Science Corp. Piscataway, USA) and the ÄKTA purification system (GE Healthcare Bio-Science Corp. Piscataway, USA) according to the manufacturer's recommendations, with some modifications ([10.17504/protocols.io.kiacuae](https://doi.org/10.17504/protocols.io.kiacuae)).

Cattle inoculations and challenge

The animals used were provided by a farm located in a rural zone (33° 31' 8" S, 53° 22' 4" W), Estância Três Marias (private property), Chui county, in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. This location is considered a free zone of *R. (B.) microplus* infestation. For all of the experiments, two groups (treated and control) of four Angus heifers (3–6 months old) were used. The inoculation was performed via intramuscular injection with 200 µg of purified

recombinant chimeric protein adjuvated with Montanide ISA 61 VG (Seppic) in a 60/40 (v/v) proportion of adjuvant/protein in a 2-mL volume per dose; the injections were performed three times at 15-day intervals [22]. The other four animals served as the control group and were treated per the protocol, except that they received 2-mL injections of adjuvant alone. Serum samples were taken from each animal before immunization and weekly thereafter. For the challenge, the animals were transferred to Hemotick Indústria e Comércio Ltda-ME, in São Lourenço do Sul- RS, Brazil. Twenty-one days after the last injection, the animals were challenged with 15,000 *R. (B.) microplus* larvae delivered along their back in three applications during the course of a week. Tick collections were performed daily once the engorged females started detaching spontaneously from the control animals. Tick samples were brought to the laboratory, weighed, and incubated at 29°C and 85% relative humidity until egg-laying was complete. Egg masses were weighed and incubated to determine hatch rate, i.e., fertility. All protocols were reviewed and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEA No. 4889–2015) of the Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). The CEEA of UFPEL is accredited by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA).

Antigenicity assays of the chimeric protein

To verify whether the antibodies induced by cattle immunization were able to recognize epitopes from rRmLTI-BmCG-LTB, we conducted western blotting and indirect ELISA using the method previously described [6], with some modifications ([10.17504/protocols.io.kf8ctrw](https://doi.org/10.17504/protocols.io.kf8ctrw)).

Statistical analysis

Vaccination effects on tick biology and efficacy were determined as described previously [2, 23]. Briefly, reduction rates associated with rRmLTI-BmCG-LTB immunization relative to the unvaccinated group were determined for adult female ticks (% DT). Egg-laying capacity (% DO) and fertility (% DF) were also recorded. Vaccine efficacy was calculated as $100 \times [1 - (CRT \times CRW \times CRO \times CRF)]$. CRT, CRO, CRW, and CRF are, respectively, the reduction in the number of adult female ticks, egg mean weight, egg-laying capacity, and fertility. The parametric *t*-test was used to compare biological data.

Mean antibody levels were determined for each group and compared using analysis of variance with 2 factors (ANOVA), and the F-test were used to determine the significance of any differences observed between the groups. Differences were considered significant at a *P* value < 0.01. The analyses were conducted using GraphPad Prism 1 Version 7 for Windows (La Jolla, USA).

Results and discussion

Chimera epitope prediction

Based on the bioinformatics analysis of the RmLTI, BmCG and LTB amino acid sequences, three portions with major epitopes were predicted. For a vaccine to be effective, it needs to promote and elicit a strong B cell and/or T cell response [24]. Due to the interactions between immune system cells and antigens in the development of a response, epitope mapping in the chimera is fundamentally important for choosing peptides with high vaccine potential [24].

The established criterion, which is based on the prediction of linear B cell-binding epitopes, aims to select sequences against which the host can trigger a humoral response in less time upon re-exposure to the antigen. Immunological memory is stimulated with boosters upon application of the chimeric antigens. The surface-exposed RmLTI-BmCG-LTB chimera

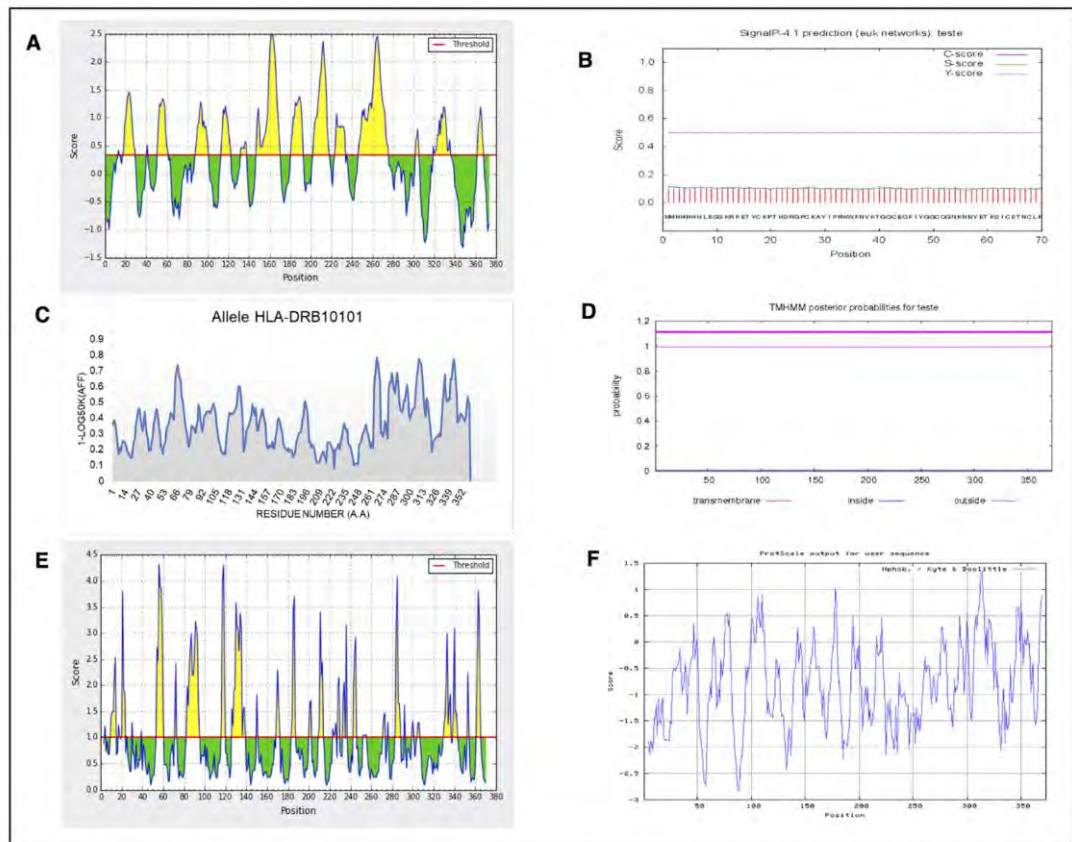


Fig 1. RmLTI-BmCG-LTB chimera analysis integrating different open-source algorithms. A. Prediction of linear B cell-binding epitopes **B.** SignalP prediction **C.** MHC-II (allele HLA-DRB10101) prediction. **D.** Transmembrane prediction (TMHMM). **E.** Surface exposure prediction. **F.** Hydrophilic or hydrophobic amino acid residue prediction.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191596.g001>

tertiary structure regions were predicted to select the most exposed peptide sequences, to which the host-produced antibodies had a higher access probability (maximum score = 2490) (Fig 1A).

The signal peptide is cleaved post-translationally and is not retained in the final form of the protein [25]. Therefore, in the present study, the signal peptide sequences should not be included in the chimera because they are not normally present in the final structure of a mature protein. The chimeric signal peptide prediction does not contain this signal, as indicated by the score below the value indicative of a signal peptide (score < 0.2) (Fig 1B).

Regions with the potential to trigger cellular and humoral immune responses in humans were predicted because predictive tools for the MHCs of other species are insufficient, particularly with respect to class II receptor binding [26, 27]. In the present study, the prediction of the MHC-II allele (HLA-DRB10101) identified 26 strong bonds and 84 weak bonds (Fig 1C)

Transmembrane helix predictions were used to define signal peptide-containing regions, which should be avoided. Generally, these regions are located next to the lipid bilayer of the

cell membrane, which hinders access by host antibodies [21]. In the present study, the trans-membrane helix probability was low (> 1) (Fig 1D).

Prediction of surface-exposed chimeric regions was performed to select peptide sequences that were interesting targets because their tertiary structures were unstable and because they were located in a flexible region of the protein [28]. In the present study, we observed surface-exposed regions (Threshold = 1.0; score > 3.5) (Fig 1E).

A hydropathy index, which combines hydrophobicity and hydrophilicity, was used to predict which amino acids would be found in an aqueous environment (negative values) or in a hydrophobic environment (positive values). We observed higher peaks of hydrophobicity among the analyzed peptides using the *ProtScale* tool (Fig 1F) [15].

To construct a chimera that included immunogenic regions of both proteins, after selecting regions with linear epitopes, we ensured that complex post-transcriptional structures, such as glycosylation, did not interfere with the antigenicity of each protein. Because of the glycoprotein nature of these two tick proteins [4,7], we selected regions with linear epitopes, and we expressed the chimera in a system based on *E. coli*, which does not glycosylate proteins. Thus, glycosylation should not interfere with the linear structure of the antigen. If a eukaryotic expression system was used, such as *Pichia pastoris*, for example, the risk of these modifications interfering with the identity of the antigenic determinant would be high [5,19]. However, further studies must be performed to observe the behavior of glycosylation in this molecular structure.

Vector construction

The characteristics of the antigenic sequences used to build the chimeric protein are summarized in Table 1. The synthetic gene was cloned into the pAE expression vector (Fig 2A). The protein structure was predicted *in silico* using the I-Swiss Model online server [16], as shown in Fig 2B.

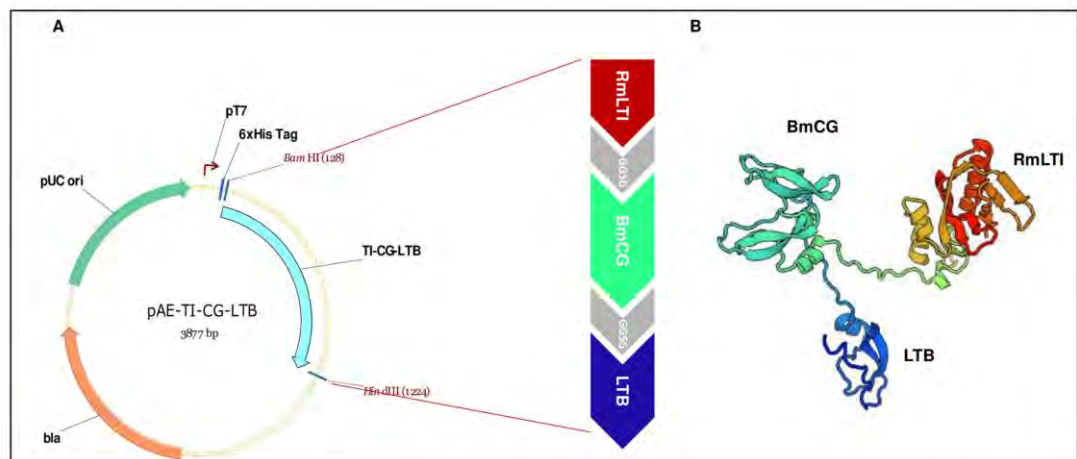


Fig 2. Schematic representation of the 3,877-bp plasmid encoding the chimeric protein. A. Expression cassette representation of pAE/RmTI-CG-LTB construction. The chimeric protein was fused at the 6xHis-tag of the pAE vector at the N-terminal region. Each chimeric subunit protein is connected by a 2x SerGly flexible linker, which is presented in gray. B. *In silico* prediction of the chimeric protein conformational structure.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191596.g002>

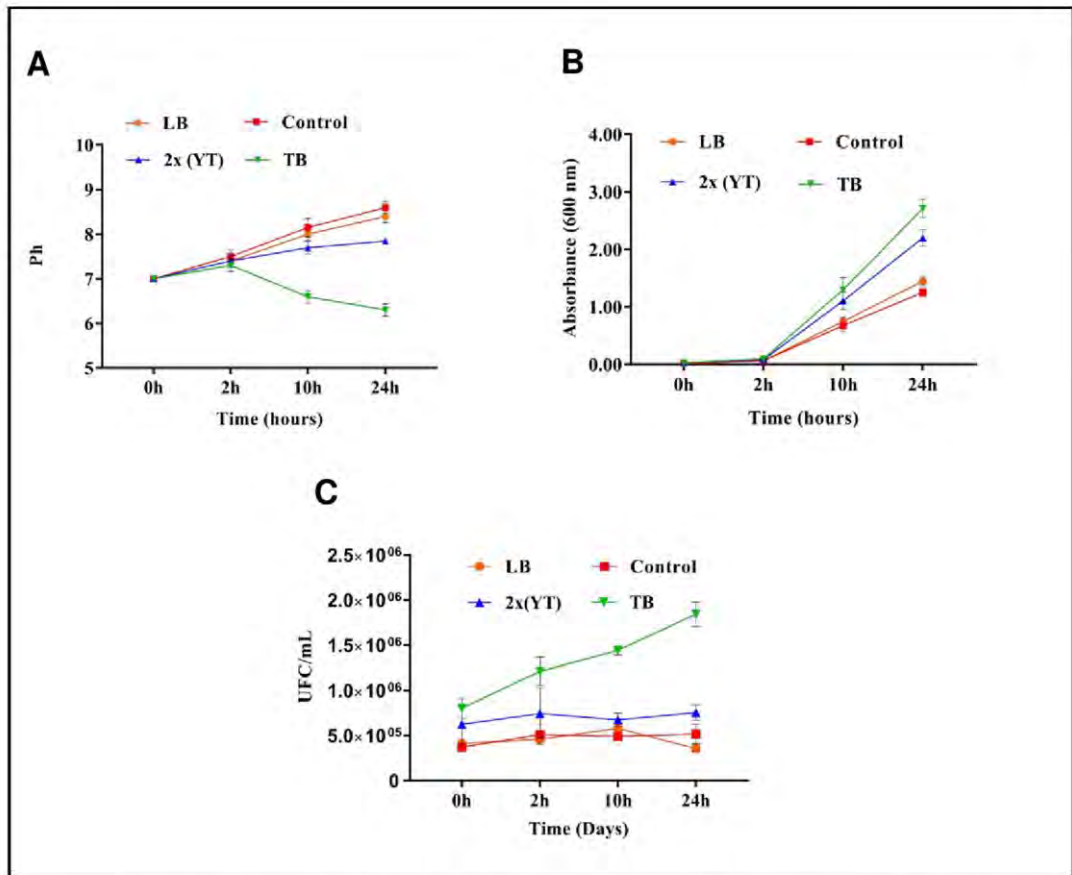


Fig 3. Comparison of different culture media at different time points. A. pH variation in the cell cultures in different culture media: LB, Control (*E. coli* strain C41 without the plasmid in LB culture medium), 2x (YT), and TB after induction. B. Variation in the absorbance after induction in the LB, Control, 2x (YT), and TB culture media. C. CFU/mL comparison among the LB, Control, 2x (YT), and TB culture media.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191596.g003>

Standardization of culture media in the shaker

First, the culture media were standardized for production in shakers. Later, the media were standardized for production in a bioreactor. TB, 2x (YT), and LB culture media were considered, and 2x (YT) had a higher pH stability (Fig 3A), whereas LB had the lowest culture performance due to its alkaline pH value of 8.5. The level of acidity in the TB medium did not interfere with culture growth (CFU/mL) or with the OD600 absorbance readings (Fig 3B).

Aerobic growth of *E. coli* in the LB or 2x (YT) medium yielded an increasingly alkaline pH during the log phase due to amino acid metabolism, with further increases in the pH during the stationary phase [29]. This increase in the pH contributes to cell death and affects the onset of the stationary phase in the long term [30]. Therefore, it is important to end the induction period at 4 h to avoid cell death.

By comparing the cell viability (CFU/mL) of the expression strain studied, we obtained a peak of 2.0×10^6 CFU/mL at 24 hours post-induction in the TB culture medium, followed by

the LB and 2x (YT) media (approximately 1.0×10^6 and 5.0×10^5 CFU/mL, respectively) (Fig 3C). This increase in the OD600 absorbance in the TB medium compared to the 2x (YT) and LB media may be due to at least two factors: the presence of glycerol as a carbon source in the TB medium, whose metabolism releases an acid product into the environment, and the presence of potassium phosphate, which buffers this medium [31]. Therefore, due to alkalinity and low OD600, the LB culture medium was not considered for the bioreactor standardization studies.

Bioreactor standardization and the RmLTI-BmCG-LTB chimera yield

By comparing the observed optical densities and the pH levels of the TB and 2x (YT) culture media, we found that the TB culture medium achieved the ideal OD for the induction (18 h) in a shorter period of time (OD = 0.6) than the 2x (YT) medium (OD = 0.5); however, the latter medium had a more stable pH under the same standardization conditions, which was similar to the results from the shakers (Fig 4A and 4B). At the end of the 24-h induction period, the TB culture medium had a higher OD (2.50 vs. 2.00). This OD increase remained in the bioreactor and shaker standardizations for TB, probably because the amount of carbohydrate supplied to the bacterium that was used as an expression system was 2x greater than the amount supplied by the 2x (YT) medium [32].

The culture medium and system with the best protein yield per volume was TB in the bioreactor (approximately 10 mg/L); the 2x (YT) medium in the bioreactor yielded almost half that value (5 mg/L of recombinant protein; Fig 4C). The higher growth yields observed in the fermenter can be ascribed to greater control of the aerobic culture conditions, which contributed more energy for protein synthesis [33].

The operation of the fermenter in discontinuous mode helps increase the culture biomass by ensuring that the oxygen supply does not become a limiting factor in the stimulation of acetate formation [34]. Another important factor to establish a good cell yield was maintaining the optimal growth temperature for *E. coli*. One study established that a range between 37°C and 39°C is optimal for the induction of the lac operon [35]. However, the use of lower temperatures reduces undesirable metabolic alterations, such as protease synthesis, which favor the yield of the product of interest and contribute to protein solubility, thereby reducing the amount of inclusion bodies [36]. Thus, the temperature used in this study was 30°C.

Comparison of the elution fractions of the chimera in the shaker and fermenter

Elution of the recombinant protein expressed in the shaker system started at imidazole concentrations below 50 mM. However, the highest concentration of the chimera occurred in the fractions eluted with 50–200 mM imidazole (Fig 5A, wells 2, 3, and 4). Elution with imidazole concentrations above 200 mM resulted in low concentrations of recombinant protein (Fig 5A, well 5).

The recombinant protein expressed in the fermenter was not eluted at imidazole concentrations lower than 40 mM (Fig 5B, well 1). Elution of the recombinant protein was observed in SDS-PAGE with imidazole concentrations starting at 50 mM (Fig 5B, wells 2 to 8). A gradual decrease in elution occurred starting at imidazole concentrations of approx. 250 mM (Fig 5B, well 6, 7, and 8). Elution with 350 mM imidazole resulted in low concentrations of recombinant protein (Fig 5B, well 8). Therefore, elution of the protein was standardized using a buffer with a constant imidazole concentration set at 60 mM in a higher volume due to the high yield of this protein (approximately 10 mg/L) (Fig 4C).

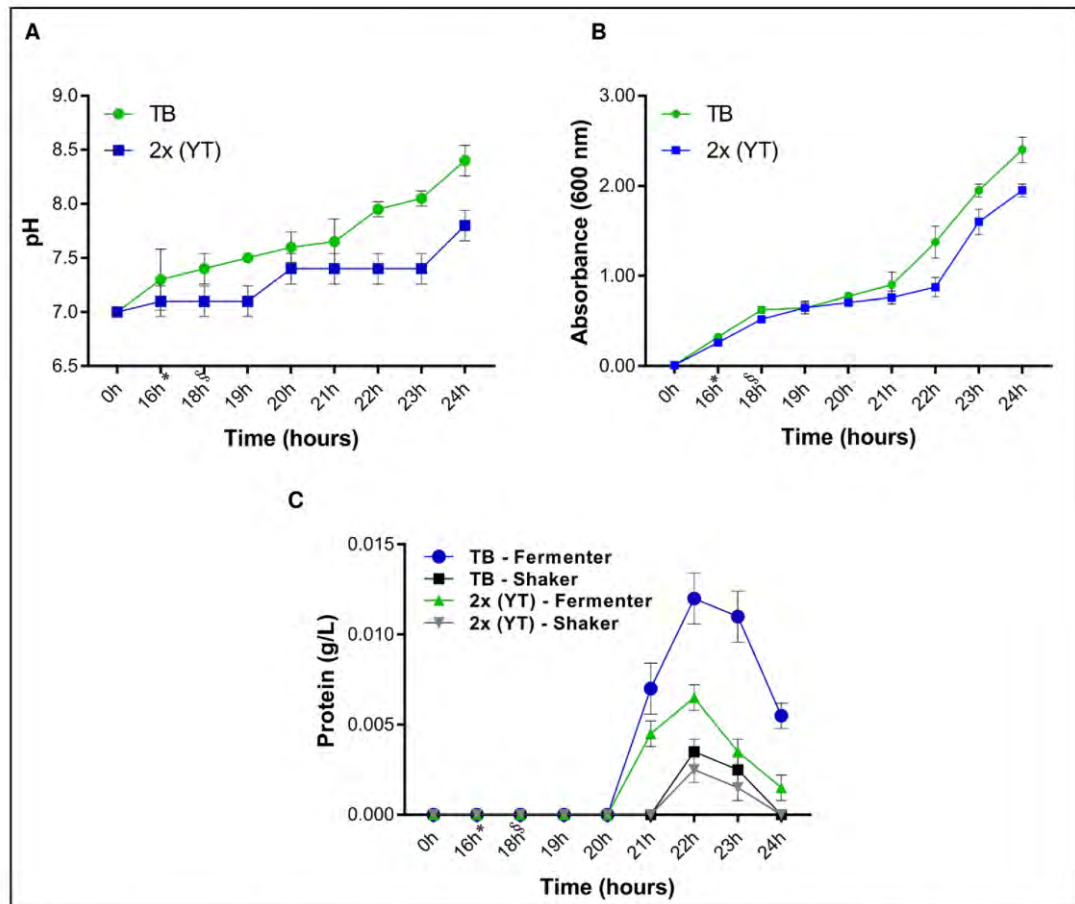


Fig 4. Bioreactor standardization and RmLTI-BmCG-LTB chimera yield. A. pH variation of the cultures in the TB and 2x (YT) culture media. B. Absorbance (A_{600 nm}) variation of the TB and 2x (YT) culture media. C. TB culture medium in the fermenter (blue circle), TB and shaker (black square), 2x (YT) culture medium in the fermenter (green triangle) and shaker (inverted gray triangle). *Growth of the pre-inoculum in the fermenter. §Induction (1 mM IPTG).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191596.g004>

To determine the amount of protein produced in the shaker and fermenter, the purified samples were subjected to 10% SDS-PAGE and compared with bovine serum albumin (BSA). The wells contained 0.5 to 1 μ g of BSA (Fig 5A) and 1 to 2 μ g of BSA (Fig 5B).

Denaturing solution was required due to protein insolubility, which was probably enhanced by the addition of LTB to the recombinant protein [17]. However, this issue did not impair the chimeric antigenicity observed in both the western blotting and ELISA assays.

Immunoprotection

Daily collections of engorged ticks dropping from cattle were terminated 15 days after tick detachment commenced. The dynamics of engorged female detachment and egg production did not significantly affect the number of ticks. Egg mass and larval hatchability were also not

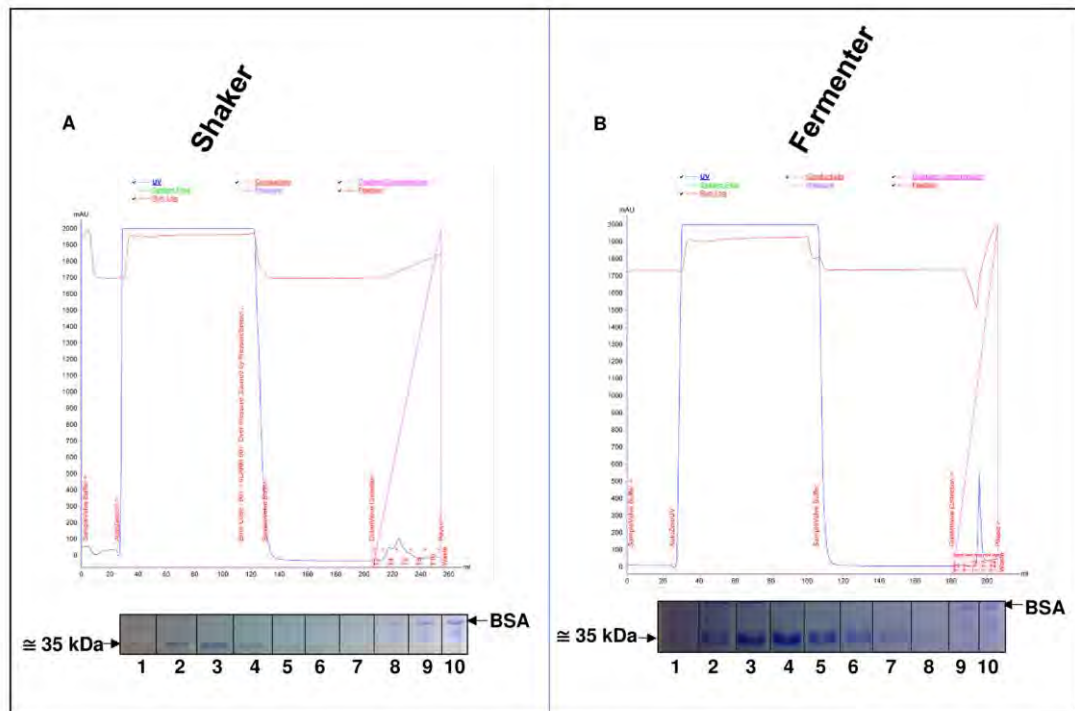


Fig 5. Purification of the recombinant protein using the ÄKTA purifier system (GE Healthcare Life Sciences). A. Purification of the protein expressed in the shaker. In the 10% polyacrylamide gel, wells 1 to 7 represent the imidazole-eluted fractions of the same recombinant protein. Well 8–0.5 μ g of BSA. Well 9–1 μ g of BSA. Well 10–2 μ g of BSA. B. Purification of the protein expressed in the fermenter. In the 10% polyacrylamide gel, wells 1 to 8 represent the imidazole-eluted fractions of the recombinant protein (well 9 contains 1 μ g of BSA, and well 10 contains 2 μ g of BSA).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191596.g005>

significant. Immunization of RmLTI-BmCG-LTB cattle reduced the number of adult female ticks by 6.29%. There was no decrease in egg deposition capacity. Fertility was reduced by 19.25%, as shown in the Table 2. However, vaccination of cattle with the chimeric antigen provided 55.6% efficacy against *R. (B.) microplus* infestation.

Immunoprotection of cattle vaccinated with the experimental formulation rBm86-CG yielded a level of efficacy 18% lower than that reported with the Bm86-based vaccine Gavac[™] against the *R. (B.) microplus* CG strain [2]. Studies with recombinant rBm86-CG [6] showed 31% efficacy in tick control. The recombinant protein rRmLTI showed an efficacy of 32% [7]. However, no study has shown whether there is any efficacy of the immunogenic potential or increased immune response against these proteins when they are fused.

The experimental vaccine formulation provided 55.6% efficacy, which could be due to the components that aided in the immunogenicity of rRmLTI-CG-LTB. Advances in vaccinology have enabled the refinement of adjuvants and other components of antigen formulations. The water-in-oil adjuvant ISA 61 VG led to higher antibody titers compared to adjuvant ISA 201 VG and adjuvant Montanide Gel 01 [37]. The immunogenicity of the rRmLTI-CG-LTB antigen could be enhanced by using other adjuvants. The vaccine with a mixture of various concentrations of Bm95 purified with aluminum hydroxide as an adjuvant protected the animals from the larval, nymph and adult tick challenges with efficiencies of 98.7%, 84.6% and 78.9%, respectively, in the control of *R. haemaphysaloides* infestations in the field [38].

Table 2. Effects on females and their progeny, and efficacy of vaccination with rRmLTI-CG-LTB antigen against *R. (B.) microplus* that infest cattle.

Animal	Tick total number		Tick mean weight (mg)		Egg weight (mg)		Larval hatchability (%)	
	Control	Vaccinated	Control	Vaccinated	Control	Vaccinated	Control	Vaccinated
1	334	742	111,3	158,6	9,99	16,74	25,2	30,5
2	493	63	154,7	78,3	11,73	0,82	27,9	2,9
3	268	191	117,0	134,6	4,05	1,26	33,9	26,2
4	559	552	149,0	145,6	17,67	7,36	19,2	25,9
Mean ± SD ^a	413 ± 68	387 ± 157	133 ± 11,1	129,5 ± 17,8	10,86 ± 2,8	6,54 ± 3,71	26,5 ± 3,0	21,4 ± 6,2
t-Test	p = 0,8820		p = 0,8640		p = 0,3894		p = 0,4840	
% of reduction ^b	DT = 6,29		DW = 2,63		DO = 39,78		DF = 19,25	
% of efficacy =	100 * [1 - (387/413 * 129,5/133 * 6,54/10,86 * 21,4/26,5)] = 55,6%							

^aArithmetic mean ± standard deviation; p-values of t-test for independent samples are shown.

^bPercent reduction was calculated in relation to the control unvaccinated group: DT, adult female ticks; DW, tick weight; DO, egg laying capacity; DF, fertility.

Efficacy% of efficacy = 100 [1 - (CRT × CR0 × CRW × CRF)]; where CRT: reduction in the number of adult female ticks, CR0: reduction in the egg laying capacity, CRW: reduction in the egg mean weight, CRF: reduction in fertility.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191596.t002>

Chimeric protein antigenicity

The western blot analysis of rRmLTI-BmCG-LTB revealed a band of approximately 35 kDa with affinity for the anti-His monoclonal antibody (mAb). The analysis also revealed recognition of the LTB portion by the anti-CT antibody and of the RmLTI-BmCG-LTB chimera by the sera from the vaccinated cows, indicating that this portion contained epitopes with antigenic and immunogenic potential (Fig 6A). Additional research involving the LTB protein demonstrated that this protein was essential for the development of a strong humoral immune response [24].

The portions of the recombinant protein corresponding to the RmLTI and Bm86-CG proteins in this study contained 269 of 373 a.a., including the linker-fused epitopes, the histidine tail, and the LTB (104 a.a.) (Table 1). The recombinant chimera had an estimated molecular weight of 42 kDa. Part of the LTB was dissociated, which was similar to reports of other

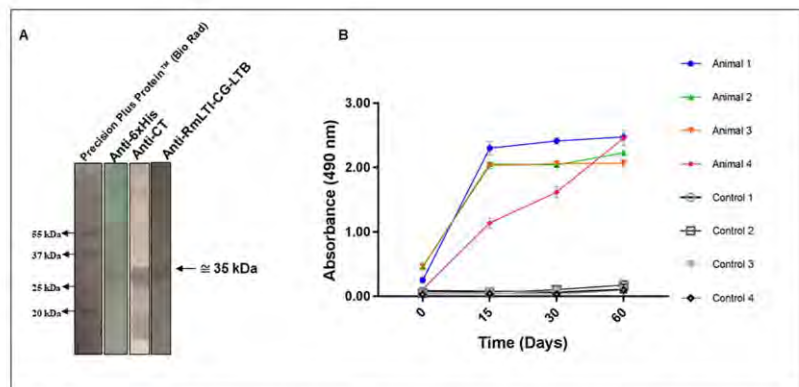


Fig 6. Antigenic analysis of the chimeric protein. A. Characterization by western blotting. The chimeric protein was specifically recognized by the anti-6xHis mAb (diluted 1:5000), the LTB mAb (anti-CT) (diluted 1:5000), and anti-RmLTI-BmCG-LTB bovine sera (diluted 1:50). B. Characterization by ELISA. The chimeric protein was tested against anti-RmLTI-BmCG-LTB bovine sera (diluted 1:800).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191596.g006>

chimeras [17]. Western blotting analysis using anti-CT polyclonal sera showed the presence of dissociated LTB (Fig 6A).

The antigenicity of rRmTI-CG-LTB was characterized by western blotting and indirect ELISA and was recognized by sera from cattle inoculated with the chimera (Fig 6B). Seroconversion of anti-rRmTI-CG-LTB was determined at the highest (1:800) dilution, with an OD_{492 nm} > 2.8. Our results corroborate research on the characterization of the rBm86-CG protein [6] and the characterization of the rRmLTI portion [7].

The mean absorbance values for animals inoculated on the first day differ significantly ($p < 0.001$) from the values obtained on days 15, 30, and 60 post-inoculation. However, the serum samples from days 15, 30, and 60 post-inoculation did not differ from one another. Thus, we can assume that the chimera is able to induce fast and effective antibody production by the immune system of the vaccinated animal and that the chimera is a promising candidate for vaccination against the bovine tick *R. (B.) microplus*.

Conclusion

The expression of the recombinant RmTI-CG-LTB protein was optimized in TB culture medium with a yield of 10 mg/L⁻¹ of medium. Additionally, antigenic determinants were retained in the protein, which showed promise as a protective immunogen. The high standard deviation presented in the number and weight of ticks are preliminary data that suggest protection (55.6%). However, this needs to be further evaluated in future studies.

Author Contributions

Conceptualization: Bárbara Guimarães Csordas, Rodrigo Casquero Cunha, Renato Andreotti.

Formal analysis: Bárbara Guimarães Csordas, Rodrigo Casquero Cunha, Sérgio Silva da Silva.

Funding acquisition: Sérgio Silva da Silva, Fábio Leivas Leite, Renato Andreotti.

Investigation: Bárbara Guimarães Csordas, Rodrigo Casquero Cunha.

Methodology: Bárbara Guimarães Csordas, Rodrigo Casquero Cunha.

Project administration: Rodrigo Casquero Cunha, Fábio Leivas Leite, Renato Andreotti.

Resources: Marcos Valério Garcia, Sérgio Silva da Silva, Fábio Leivas Leite, Renato Andreotti.

Supervision: Renato Andreotti.

Validation: Bárbara Guimarães Csordas, Rodrigo Casquero Cunha, Marcos Valério Garcia.

Visualization: Bárbara Guimarães Csordas.

Writing – original draft: Bárbara Guimarães Csordas.

Writing – review & editing: Bárbara Guimarães Csordas, Rodrigo Casquero Cunha, Marcos Valério Garcia, Sérgio Silva da Silva, Fábio Leivas Leite, Renato Andreotti.

References

1. Popara M, Villar M, Mateos-Hernández L, de Mera IGF, Marina A, del Valle M, et al. Lesser protein degradation machinery correlates with higher BM86 tick vaccine efficacy in *Rhipicephalus annulatus* when compared to *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine*. 2013; 31:4728–35. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.031> PMID: 23973246
2. Andreotti R. Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2006; 15: 97–100. PMID: 16978472

3. Maruyama SR, Garcia GR, Teixeira FR, Brandão LG, Anderson JM, Ribeiro JMC, et al. Mining a differential sialotranscriptome of *Rhipicephalus microplus* guides antigen discovery to formulate a vaccine that reduces tick infestations. *Parasit Vectors*. 2017; 10: 206. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2136-2> PMID: 28446245
4. Andreotti R, Pedroso MS, Caetano AR, Martins NF. Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants bm86 campo grande strain, Bm86 and Bm95. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2008; 17: 93–98. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612008000200006> PMID: 18823577
5. Cunha RC, Andreotti R, Leite FPL. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: expression and characterization of Bm86-CG in *Pichia pastoris*. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2011; 20: 103–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.05.011> PMID: 21722483
6. Cunha RC, Pérez de León AA, Leite FPL, Pinto LDS, Dos Santos AG Júnior, Andreotti R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2012; 21: 254–262. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000300014> PMID: 23070436
7. Andreotti R, Sasaki SD, Torquato RJS, Gomes A, Tanaka AS. Serine Proteinase Inhibitors from Eggs and Larvae of Tick *Boophilus microplus*: Purification and Biochemical Characterization. *J. Protein Chem*. 2001;20. <https://doi.org/10.1023/A:1012242817869>
8. Andreotti R, Gomes A, Malavazi-Piza KC, Sasaki SD, Sampaio CAM, Tanaka AS. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *Int Immunopharmacol*. 2002; 2: 557–563. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00203-X](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00203-X) PMID: 11962734
9. Andreotti R, Cunha RC, Soares MA, Guerrero FD, Leivas Leite FP, Pérez de León AA. 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: 22959980
10. Tamura S, Yamanaka A, Shimohara M, Tomita T, Komase K, Tsuda Y, et al. Synergistic action of cholera toxin B subunit (and *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit) and a trace amount of cholera whole toxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine*. 1994; 12: 419–426. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90118-X) PMID: 8023550
11. Conceição FR, Moreira AN, Dellagostin OA. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine*. 2006; 24: 5734–5743. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.04.036> PMID: 16730864
12. Grassmann AA, Félix SR, Dos Santos CX, Amaral MG, Neto ACPS, Fagundes MQ, et al. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the b subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Clin Vaccine Immunol*. 2012; 19: 740–745. <https://doi.org/10.1128/CVI.05720-11> PMID: 22379066
13. Jawale C V, Lee JH. *Salmonella enterica* serovar enteritidis ghosts carrying the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit are capable of inducing enhanced protective immune responses. *Clin Vaccine Immunol*. 2014; 21: 799–807. <https://doi.org/10.1128/CVI.00016-14> PMID: 24671556
14. Emini EA, Hughes J V, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol*. 1985; 55: 836–9. PMID: 2991600
15. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins M, Appel R, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Proteomics Protoc Handb*. 2005; 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
16. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42: 252–258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340> PMID: 24782522
17. Rocha da da SR, Conceição FR, Grassmann AA, Lagranha VL, Dellagostin OA. B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvant of humoral immune response in recombinant BCG vaccination. *Can J Microbiol*. 2008; 54: 677–686. <https://doi.org/10.1139/w08-056> PMID: 18772930
18. Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*. 1979; 6: 23–38. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(79\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(79)90082-9) PMID: 383576
19. Kumar B, Azhahianambi P, Ghosh S. *Vaccine Design*. 2016; 1404: 459–482. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3389-1>
20. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
21. Lessard JC. *Growth media for E. coli* [Internet]. 1st ed. *Methods Enzymol*. 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420067-8.00011-8>

22. Vargas M, Montero C, Sánchez D, Pérez D, Valdés M, Alfonso A, et al. Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavacplus vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. *BMC Vet Res*. 2010; 6: 43. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-43> PMID: 20846415
23. García-García JC, Gonzalez IL, González DM, Valdés M, Méndez L, Lamberti J, et al. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol*. 1999; 23: 883–895. <https://doi.org/10.1023/A:1006270615158> PMID: 10668863
24. Conceição FR, Moreira ÂN, Dellagostin OA. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine*. 2006; 24: 5734–5743. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.04.036> PMID: 16730864
25. Blobel G, Dobberstein B. Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol*. 1975; 67: 852–862. PMID: 811672
26. Larsen JEP, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*. 2006; 2: 2. PMID: 16635264
27. Aguirre Ade AR, Lobo FP, Cunha RC, Garcia MV, Andreotti R. Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. *Vet Parasitol*. 2016; 221: 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.032> PMID: 27084468
28. Maritz-Olivier C, van Zyl W, Stutzer C. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick Borne Dis*. 2012; 3: 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.01.003> PMID: 22521592
29. Farrell MJ, Finkel SE. The Growth Advantage in Stationary-Phase Phenotype Conferred by *rpoS* Mutations Is Dependent on the pH and Nutrient Environment. *J Bacteriol*. 2003; 185: 7044–7052. <https://doi.org/10.1128/JB.185.24.7044-7052.2003> PMID: 14645263
30. Maurer LM, Yohannes E, Bonduant SS, Radmacher M, Slonczewski JL. pH Regulates Genes for Flagellar Motility, Catabolism, and Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12 pH Regulates Genes for Flagellar Motility, Catabolism, and Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12 †. *J Bacteriol*. 2005; 187: 304–319. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.304-319.2005> PMID: 15601715
31. Kram KE, Finkel SE. Rich medium composition affects *Escherichia coli* survival, glycation, and mutation frequency during long-term batch culture. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81: 4442–4450. <https://doi.org/10.1128/AEM.00722-15> PMID: 25911475
32. Ahamed A, Vermette P. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. *Biochem Eng J*. 2010; 49: 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.01.014>
33. Pei XL, Wang QY, Li CL, Qiu XF, Xie KL, Huang LF, et al. Efficient production of a thermophilic 2-Deoxyribose-5-Phosphate aldolase in glucose-limited fed-batch cultivations of *Escherichia coli* by continuous lactose induction strategy. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011; 165: 416–425. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9261-8> PMID: 21509600
34. Tomazetto G, Mulinari F, Stanisquasi F, Settembrini B, Carlini CR, Ayub MAZ. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme Microb Technol*. 2007; 41: 821–827. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.07.006>
35. Valdez-Cruz N a, Caspeta L, Pérez NO, Ramírez OT, Trujillo-Roldán M a. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microb Cell Fact*. 2010; 9: 18. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-18> PMID: 20298615
36. Gil LAF, da Cunha CEP, Moreira GMSG, Salvarani FM, Assis RA, Lobato FCF, et al. Production and Evaluation of a Recombinant Chimeric Vaccine against *Clostridium botulinum* Neurotoxin Types C and D. *PLoS One*. 2013; 8: 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069692> PMID: 23936080
37. Petermann J, Bonnefond R, Mermoud I, Rantoen D, Meynard L, Munro C, et al. Evaluation of three adjuvants with respect to both adverse effects and the efficacy of antibody production to the Bm86 protein. *Exp Appl Acarol*. 2017; 72: 303–315. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0156-4> PMID: 28752480
38. Sugumar P, Chandran D, Sudha Rani G, Shahana PV, Maske DK, Rangarajan PN, et al. Recombinant mid gut antigen (Bm95) as a vaccine against Indian *Rhipicephalus haemaphysaloides* in *Bos indicus* cattle. *Res Vet Sci*. Elsevier Ltd; 2011; 90: 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.05.037> PMID: 20580387

5.2 Artigo - 2

Brazilian Journal of Veterinary Parasitology

ISSN 1984-2961 (Electronic)

www.cbpv.org.br/rbpv

Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, Ahead of Print, 2018

Doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180056>

Analysis of Bm86 conserved epitopes: is a global vaccine against Cattle Tick *Rhipicephalus microplus* possible?

Análise de epítomos conservados da Bm86: é possível uma vacina global contra Carrapato-do-Boi *Rhipicephalus microplus*?

Isabella Maiumi Zaidan Blecha^{1,2}; Bárbara Guimarães Csordas^{1,3}; André de Abreu Rangel Aguirre⁴; Rodrigo Casquero Cunha⁵; Marcos Valério Garcia^{1,6}; Renato Andreotti^{7*}

¹ Laboratório de Biologia do Carrapato, Embrapa Gado de Corte, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brasil

² Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FAMEZ, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil

³ Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil

⁴ Laboratório de Entomologia Médica, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Porto Velho, RO, Brasil

⁵ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas, RS, Brasil

⁶ Programa de Desenvolvimento Científico Regional – DCR, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia – FUNDECT, Governo do Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

⁷ Embrapa Gado de Corte, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brasil

Received June 28, 2017

Accepted July 10, 2018

Abstract

The cattle tick *Rhipicephalus microplus* causes significant economic losses in agribusiness. Control of this tick is achieved mainly through the application of chemical acaricides, often resulting in contamination of animal food products and of the environment. Another major concern associated with acaricide use is the increasing reports of resistance of this tick vector against the active ingredients of many commercial products. An alternative control method is vaccination. However, the commercially available vaccine based on a protein homologous to Bm86 exhibits variations in efficacy relative to the different geographical locations. This study aimed to identify antigenic determinants of the sequences of proteins homologous to Bm86. Phylogenetic analyses were performed to determine the extent of divergence between different populations of *R. microplus* to identify the sequence that could be used as a universal vaccine against the multiple geographically distinct populations of *R. microplus* and related tick species. Considering the extensive sequence and functional polymorphism observed among strains of *R. microplus* from different geographical regions, we can conclude that it may be possible to achieve effective vaccination against these cattle ticks using a single universal Bm86-based antigen.

Keywords: Immuno-bioinformatics, phylogenetic analyses, *Rhipicephalus microplus*, ticks.

Resumo

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é responsável por perdas significativas no agronegócio. O controle deste carrapato é feito principalmente por meio da aplicação de acaricidas químicos, geralmente resultando na contaminação de produtos de origem animal e do meio ambiente. Outra preocupação importante associada ao uso de acaricidas é o crescente aumento de relatos sobre a resistência deste carrapato a princípios ativos de vários produtos comerciais. Uma alternativa de controle é por meio de vacinação. Porém, a vacina comercializada contendo proteína homóloga à Bm86, apresenta variações de eficácia em relação às diferentes localizações geográficas. Este estudo buscou identificar determinantes antigênicos das sequências de proteínas homólogas a Bm86. As análises filogenéticas foram feitas para

*Corresponding author: Renato Andreotti, Laboratório de Biologia do Carrapato, Sanidade Animal, Embrapa Gado de Corte, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Avenida Rádio Maia, 830, Zona Rural, CEP 79106-550, Campo Grande, MS, Brasil. e-mail: renato.andreotti@embrapa.br



determinar a extensão da divergência entre diferentes populações de *R. microplus* com o objetivo de identificar a sequência que poderia ser usada como vacina universal contra as múltiplas populações geograficamente distintas de *R. microplus* e espécies de carrapatos relacionados. Considerando-se a extensa sequência e o polimorfismo observados entre linhagens de *R. microplus* de diferentes regiões geográficas, podemos concluir que pode ser possível obter uma vacinação efetiva contra esses carrapatos bovinos utilizando um único antígeno universal baseado em Bm86.

Palavras-chave: Imuno Bioinformática, análise filogenética, *Rhipicephalus microplus*, carrapatos.

Introduction

The morpho taxonomy of *Rhipicephalus microplus* complex has been challenged in recent years, and until now, they are known as a complex composed of five taxa, namely *R. australis*, *R. annulatus*, *R. microplus clade A sensu*, *R. microplus clade B sensu* and *R. microplus clade C sensu* (BURGER et al., 2014; LOW et al., 2015; CSORDAS et al., 2016). This complex causes significant economic losses to livestock. In Brazil alone, the potential damage caused by this species amounts to US \$3.24 billion per year (GRISI et al., 2014).

Control of these parasites is mainly achieved through the use of acaricides. However, the pressure of use has genetically selected tick populations resistant to these products, resulting in serious problems such as a shortage of new acaricidal chemical entities and the accumulation of residues in both the environment and products of animal origin (ANDREOTTI et al., 2011; RECK et al., 2014; SINGH et al. 2015). Therefore, the search for alternative control methods has become increasingly necessary.

Tick control through vaccines is an alternative to the use of acaricides. Some examples of vaccines that use the Bm86 protein as an immunogen against ticks include TickGard^{PLUS} (formerly, Intervet Australia) (WILLADSEN et al., 1995) which is no longer commercially available and GavacTM (Heber Biotec) (CANALES et al., 1997) which is the only one still available and, more recently, Bovimune Ixovac, Mexico (BOVIMUNE IXOVAC, 2018).

To understand why many vaccine strains should be tested, a better understanding of the history of the cattle tick *R. microplus* is necessary. Based on the history of the dissemination of *R. microplus* according to Barré & Uilenberg (2010), *R. microplus* originated in the southern and southeastern regions of Asia and was thus regarded as one of the most successful invasive tick species, colonizing wide areas in Central and South America, South East Asia, Australia, and islands in the Pacific Ocean.

Vaccines, such as TickGARD^{PLUS} (formerly, Intervet Australia), against the cattle tick in Australia, which was previously named *R. microplus* until it was morphologically and genetically distinguished from *Rhipicephalus australis* and now is part of the *R. microplus* complex (LABRUNA et al., 2009; ESTRADA-PENÑA, et al. 2012; LOW et al., 2015; CSORDAS et al., 2016) are effective against susceptible strains of Australian origin. Numerous tests have been performed and might exhibit a different pattern of sensitivity and therefore induce poorer control when applied against *R. microplus* in America (SUTHERST & BOURNE, 2009).

Bm86-derived vaccines cause reduced weight of engorged adult female ticks, reduced egg mass weight, reduced numbers of ticks in the field over one generation, a decrease in the reproductive capacity of *R. microplus* females, decreased frequency of treatments with

acaricides, and a positive impact on the implementation of integrated control programs (JONSSON et al., 2000; ODONGO et al., 2007; VARGAS et al., 2010). The TickGARD^{PLUS} (formerly, Intervet Australia) and GavacTM (Heber Biotec) vaccines were shown to be 46.9% and 49.2% effective, respectively, against a Brazilian *R. microplus* strain (ANDREOTTI, 2006). This effectiveness is lower than that reported globally for other strains (RAND et al., 1989; RICHARDSON et al., 1993; PATARROYO et al., 2002). Bm86 from the Campo Grande strain (GenBank: ACA57829) collected from cattle under field conditions in Campo Grande municipality, Brazil, exhibits differences in hydrophobic regions compared with the vaccine proteins. These differences may contribute to the binding of antibodies to the target protein, which may explain the variation in efficacy in other regions worldwide (ANDREOTTI et al., 2008).

Humoral and cellular immune responses are important to an organism to react against specific regions of pathogens via a process known as the adaptive response. Vaccines based on subunits or synthetic peptides, which is a strategy that focuses on epitopes recognized by B and T cells and the major histocompatibility complex (MHC), that could elicit a specific immune response have been studied in recent decades (BEN-YEDIDIA & ARNON, 1997). *In silico* epitope prediction tools are necessary to evaluate which regions of such proteins of interest could be candidates for a peptide-based vaccine. Initially, the predictions focused on epitopes that bind on MHC class I molecules for the development of cellular immune response against virus-infected cells and cancer (KAST et al., 1991; TOES et al., 1996). Examples of some classes of methods used in predictions are quadratic programming, linear programming and the use of sequence profiles obtained by clustering known epitopes of a given MHC allele to score candidate peptides (FLOREA et al., 2003).

The interaction of innate and acquired immune responses to ticks is what will determine the success of the host or the parasite. The innate response consists of an inflammatory reaction and a hemostatic process, such as vasoconstriction, clot activation and platelet aggregation (SZABÓ, 2008). Hypersensitivity related to histamine release by mast cells is noted in resistant animals (RIEK, 1962). Resistant animals exhibit increased cell infiltrate in the tick attachment site, which suggests that cellular immune response is important to confer natural resistance to the host (SZABÓ & BECHARA, 1999).

Studies on peptide-based vaccines against ticks have been performed in the last decade. *In silico* analysis of Bm86 gut glycoprotein revealed that it contains antigenic epitopes, one of which has elicited greater than 80% efficacy in immunized cattle, against *R. microplus* (PATARROYO et al., 2002). Monoclonal antibodies against a peptide designed based on B cell epitopes from Bd86 (a Bm86 ortholog from *Rhipicephalus decoloratus*)

could bind to gut cells from several *Rhipicephalus* species (including *R. microplus*) (KOPP et al., 2009). Reverse vaccinology approaches to identify new tick antigens are currently under investigation. However, the number of tick genome databases available is limited given that these parasites are eukaryotes and have a large genome (LEW-TABOR & RODRIGUEZ-VALLE, 2016).

The post-genomic era revolution has produced massive sequence data on genomes, transcriptomes and proteomes, including those of *R. microplus* (BARRERO et al., 2017). This study aimed to identify antigenic determinants of the sequences of proteins homologous to Bm86 that could be used as a universal vaccine against the multiple geographically distinct populations of *R. microplus*. Variations in the Bm86 locus sequence have been reported in the literature (RODRÍGUEZ et al., 1994; COBON et al., 1995; GARCÍA-GARCÍA et al., 1999). This study aimed to determine the effect of sequence variability within the Bm86 locus on the major epitopes of the Bm86 protein as a means of identifying possible isolates that confer protection against *R. microplus* strains of various geographic origins.

Materials and Methods

In silico analyses for epitope predictions

For the analyses, we used tools based on the major histocompatibility complexes (MHCs) of cattle (bovine leukocyte antigen (BoLA)) and mice (H-2 antigen). Mouse MHC class I and II predictions are exclusively based on mouse H-2 antigen because it is an animal model commonly used to screen candidate antigens before testing in cattle (AGUIRRE et al., 2016; CONTRERAS et al., 2016; LEW-TABOR & RODRIGUEZ-VALLE, 2016). A variety of algorithms were run to generate a combination of results capable of predicting qualities that altered the statistical probability of a peptide sequence having antigenic potential for the host immune system in question (bovine MHC I via BoLA loci and mouse MHC I and II via the H-2 locus). We used the following prediction parameters to predict three major epitopes based on the Brazilian Bm86-CG (ACA57829) amino acid sequences published in GenBank: cattle MHC class I binding epitopes for the BoLA-AW10, BoLA-N:00101 and BoLA-D18.4 alleles (IEDB, 2018a); binding to the mouse MHC I H-2-Qa1, H-2-Dd and H-2-Ld alleles (IEDB, 2018a); binding to the mouse MHC class II H-2-IAb and H-2-IAc alleles (IEDB, 2018b); linear epitopes for B lymphocytes (IEDB, 2018c); epitopes exposed on the protein surface in the tertiary structure (IEDB, 2018d); prediction of transmembrane helices (DTU bioinformatics, 2018a); prediction of intrinsically disordered protein regions (IUPRED2A, 2018); prediction of the signal peptide (DTU bioinformatics, 2018b); and prediction of glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors (PIERLEONI et al., 2008).

The function of each *in silico* tool mentioned above was to predict Bm86 regions with the potential to trigger cellular immune responses in cattle (the only available source for predictive tools for several animal species, netMHCpan, is based on MHC class I); predict regions with the potential to trigger cellular and humoral immune responses in mice (MHC class I was evaluated for comparison

with cattle results) (VORDERMEIER et al., 2003; NENE et al., 2012; RODRIGUEZ-VALLE et al., 2013; AGUIRRE et al., 2016); predict B lymphocyte epitopes to ensure immunological memory and generate rapid antibody responses in immunized hosts exposed to the tick to avoid selecting epitopes in transmembrane helices, as these structures can mask epitopes because they are anchored to the cell membrane; evaluate intrinsically disordered regions, which are of some interest because they do not have a constant tertiary structure and the epitope is more likely to be exposed to the immune system when it is located in a flexible region of the protein, to avoid epitopes located in signal peptides, which are typically cleaved after the protein reaches its final destination; and predict glycosylphosphatidylinositol anchors (GPI) that may increase triggering of immune responses in the host.

To determine whether the epitopes predicted with the algorithms listed above are conserved among the different Bm86 sequences deposited in GenBank, all sequences were analyzed using the Mega 6.0 program (TAMURA et al., 2013), and an alignment was constructed using Gonnet modeling.

Protein BLAST (NCBI, 2018) was used to perform alignments of the epitopes predicted with *Bos taurus* protein sequences available in the SwissProt database using the BLASTP 2.5.1 program. This analysis aimed to ensure that the predicted sequences did not have homologies with host proteins, thereby minimizing autoimmune responses following vaccination.

Sequence alignment and phylogenetic tree construction

The Bm86-CG protein sequence (GenBank: ACA57829) and the three predicted epitope sequences were aligned with the sequences available from GenBank using the BLASTp program. In this way, a database was constructed that contained all similar sequences obtained from the analysis. The Mega 6.0 program (TAMURA et al., 2013) was applied to align the sequences taken from GenBank using the Gonnet protein weight matrix.

A Bayesian phylogenetic analysis was performed using the MrBayes 3.2.6 program (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003). An amino acid analysis was performed using the Dayhoff model (DAYHOFF et al., 1978). For the data set used in this study, approximately 500,000 generations were found to be sufficient for topology and were plotted using the FigTree 1.4.2 program (TREE BIO, 2016). All analyses for Bm86 epitopes and partial protein of Bm86 were initiated with random starting trees and were run for 1×10^6 generations, with trees being sampled every 1,000 generations. To determine the stationarity of the Markov chain, the log-likelihood scores of sample points were plotted against generation time. The first 25% of samples was estimated as burn-in for each data set. The remaining samples were retained for generating consensus trees. Each sample included a tree topology that incorporates branch length and substitution model parameter values. These topologies were used to generate a 50% majority rule consensus tree, with the percentage of sample recovering any particular clade representing the posterior probability of a clade ($1=100\%$). No manual editing of the trees was performed. The clades of *R. microplus* - THAILAND (KAEWMONGKOL et al., 2015), *R. appendiculatus* (NIJHOF et al., 2009; KAMAU et al., 2011, 2016),

R. decoloratus (ODONGO et al., 2007, CANALES et al., 2008), were collapsed (tree's triangle). Species of the tick *Hyalomma detritum* (AEK31101), *H. detritum* (AEK31102), *H. anaticum* (ACD14076) were used as outgroups in phylogenetic analyses.

Results

The bioinformatics analysis predicted three major relatively conserved regions (Figure 1) in the Bm86 sequences from different geographical regions. The Bm86-CG protein sequence (GenBank: ACA57829) was used as a reference because it originated from a strain of *R. microplus* from the study region (ANDREOTTI et al., 2008).

The established mouse MHC class II and B cell epitopes were as follows: epitope 1 - SSGQRCVMENGNVAVCKEKSDATT (23 amino acids, located between residues 566 and 588); epitope 2 - KCPDDHECSREPAKDCSCSEEDNGK (24 amino acids, located between residues 540 and 563); and epitope 3 - DSYCSPGSPKGPDPGQCKNAC (20 amino acids, located between residues 170 and 189) (Figure 1).

Epitope 1 (Figure 2) formed a distinct clade with high convergence for *R. microplus* populations from the geographical regions of Brazil, the United States and Mozambique, Israel and some populations from Thailand. A collapsed group was formed that included the variants from Thailand. Immediately below was formed with branch with variants from Thailand,

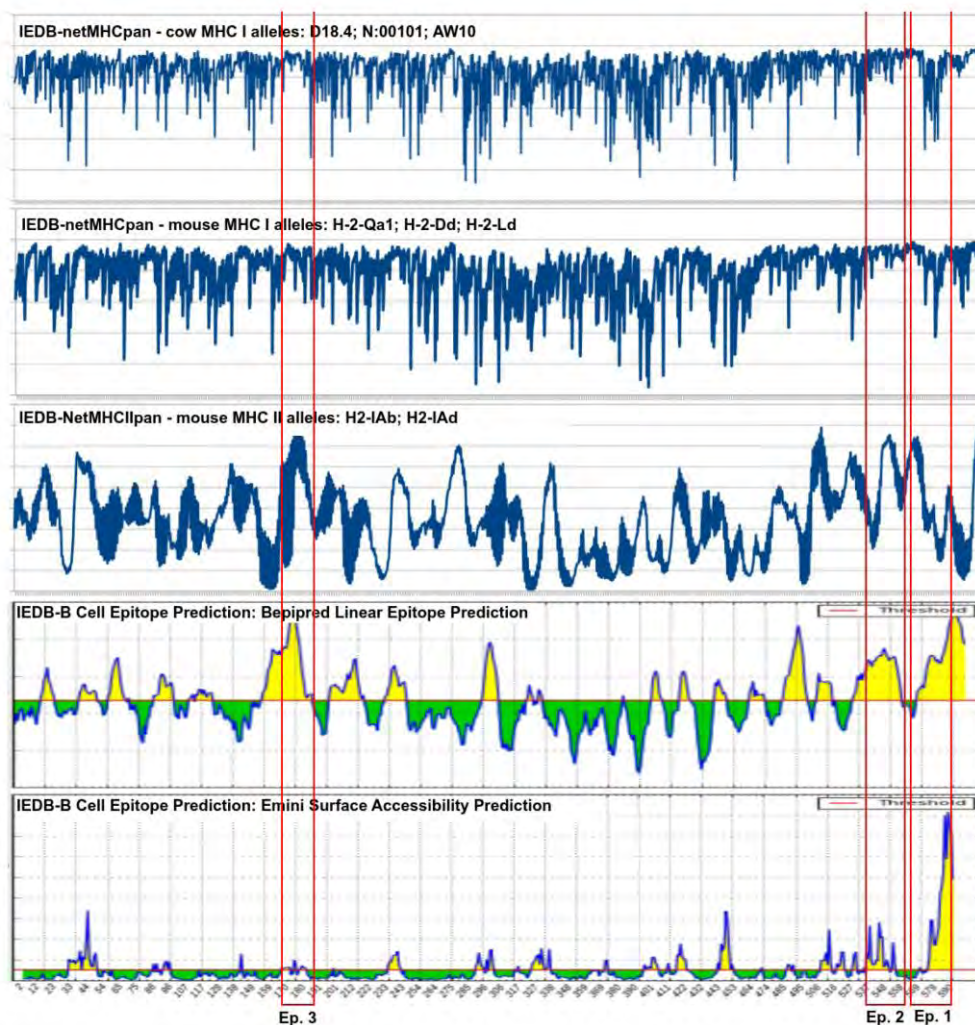


Figure 1. Analysis of Bm86-CG integration using free algorithms available online, based on T and B cell epitope predictions. Each tool predicts a certain characteristic based on calculations that use the properties of each amino acid in the primary protein sequence to generate graphs indicating which regions of the primary structure have a statistically significant probability of having the desired characteristic. For this purpose, a threshold (horizontal line parallel to the x-axis) is plotted. All regions of the graph that exceed this threshold are considered in the present analysis. By superimposing the graphs from different algorithms, we can better visualize which regions share the largest combination of antigenic characteristics.

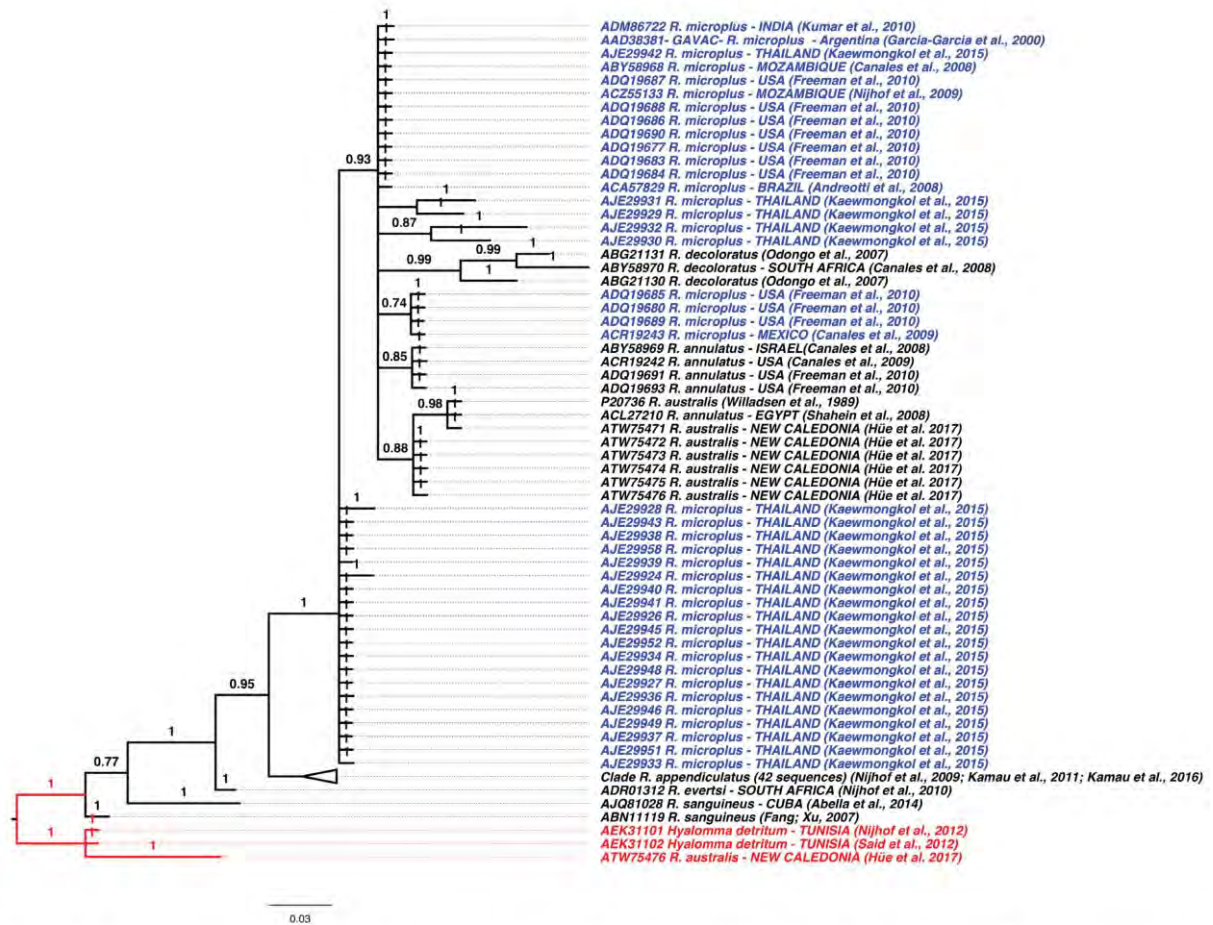


Figure 3. Bayesian phylogenetic tree for epitope 2 (KCPDDHECSREPAKDCSCSEEDNGK) of protein Bm86-CG with 24 amino acids. The strains of *Rhipicephalus microplus*, is shown in blue. The clade shown in red includes *Hyalomma detritum* and *Hyalomma anatolicum* (GenBank: AEK21101-102, ACD14076) and was used as an external group.

fundamental importance for the selection of peptides with potent antigenicity as candidate vaccine components. The MHC genes of cattle were mapped from bovine autosome 23 (BTA 23) (FRIES et al., 1986; FRIES et al., 1993) and are referred to together as bovine leukocyte antigen (BoLA). This organization distinguishes BoLA from the MHC in humans and rodents, in which the MHC genes are located on chromosome 6 (HLA) and 17 (H-2), respectively (LEWIN, 1996). McShane et al. (2001) used FISH for mapping genes and revealed that tumor necrosis factor α (TNF- α), heat shock protein 70 (HSP70.1) and 21 steroid dehydrogenase (CYP21) are closely linked in the region of BTA23 band 22 along with BoLA class I genes. Therefore, this gene is important for immunological functions.

Few variations that might be involved in the process associated with the global variability in vaccine efficacy were observed in the three Bm86-CG epitopes that were predicted here to be the most antigenic. In fact that, these epitopes contained regions with major similarities to homologous domains of Bm86 from strains from different geographical regions (RAND et al., 1989;

RICHARDSON et al., 1993; DE LA FUENTE et al., 1999; PATARROYO et al., 2002; ANDREOTTI, 2006; ANDREOTTI et al., 2008). Nevertheless, the variability observed in the Bm86 molecule may explain the differences in the efficacy observed when cattle vaccinated with rBm86-CG and rBm86 were challenged by infesting with the same strain, *R. microplus* Campo Grande (CUNHA et al., 2012; ANDREOTTI, 2006).

Peconick et al. (2008) studied polymorphisms and observed that vaccine efficacy was not decreased despite changes in the amino acid sequences of polypeptide SBm7462 in two Brazilian isolates compared with the sequence of the polypeptide obtained from other isolates by Patarroyo et al. (2002). Despite the variability of proteins homologous to Bm86 and their impact on the immune response, it must be borne in mind that the genes of two MHC class II alleles of cattle have been described with a deletion of three base pairs in their nucleotide sequences, leading to the deletion of a lysine at the antigen recognition site. This deletion was correlated with increased immune response against the commercial vaccine TickGARD^{PLUS} (formerly, Intervet Australia) (SITTE et al., 2002).

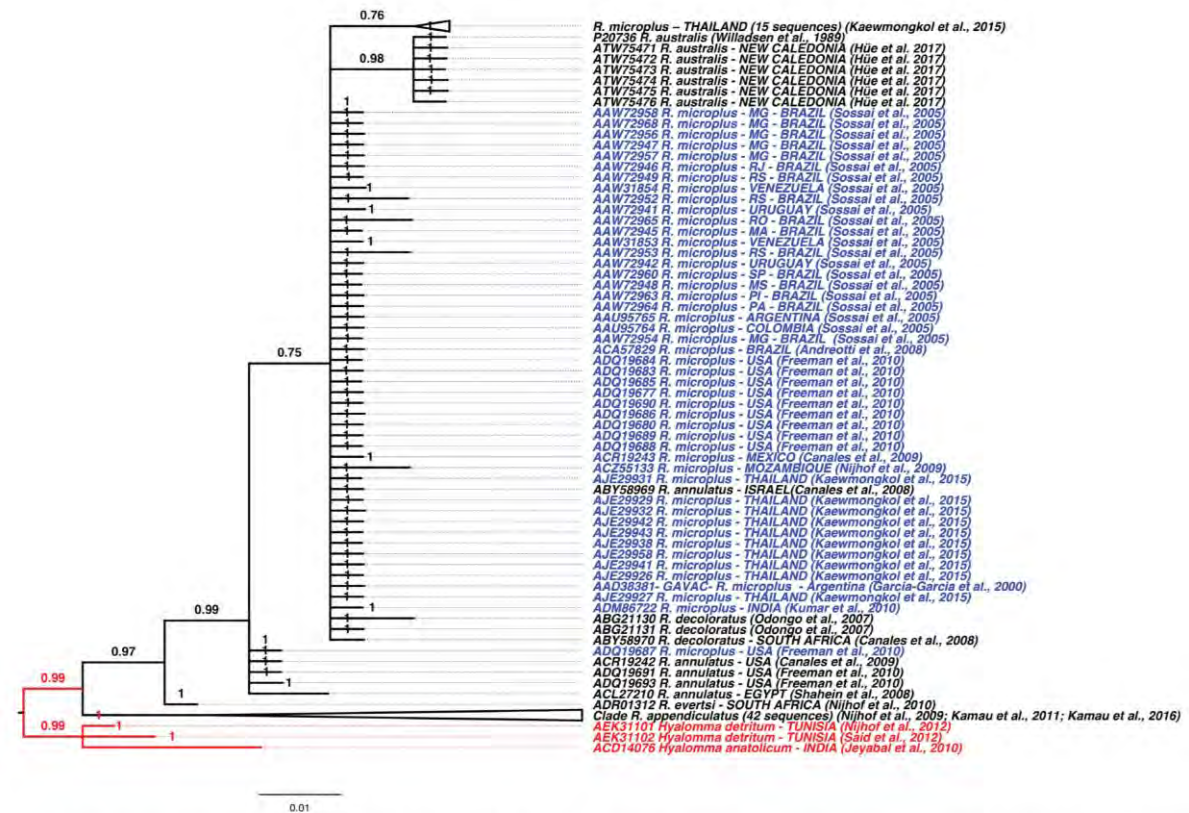


Figure 4. Bayesian phylogenetic tree for epitope 3 (DSYCSPGSPKPGDQCKNAC) of protein Bm86-CG with 20 amino acids. Populations of *Rhipicephalus microplus* are shown in blue. The clade shown in red includes *Hyalomma detritum* and *Hyalomma anatolicum* (GenBank: AEK21101-102, ACD14076) and was used as an external group.

Thus, the influence of the genetic variation of the MCH class II alleles on the cattle immune response against vaccine antigens is also evident.

The criterion established based on the prediction of B lymphocyte-binding linear epitopes had the objective of selecting sequences against which the host could trigger a humoral response in the shortest time following re-exposure to the antigen and that could be used to stimulate immune memory with boosters using vaccine antigen formulations. Were predicted Bm86 regions exposed on the surface of the tertiary structure as a basis for selecting peptide sequences accessible for binding to antibodies produced by the host against each peptide.

Predictions of transmembrane helices were used to define the regions that should be avoided. These regions are usually located next to the lipid bilayer of the cell membrane, hindering their access by host antibodies. Bm86-CG lacks transmembrane helices according to the results of our TMHMM analysis (data not shown). The prediction of intrinsically disordered regions was performed to select peptide sequences that are interesting targets because these peptides do not have a constant tertiary structure. This phenomenon may facilitate exposure of the epitopes in the native protein, thereby facilitating access to the antibodies.

Epitopes 1 and 2 located near the C-terminus could have this characteristic to our results for the prediction of intrinsically disordered protein regions.

The signal peptide is usually cleaved during post-translational modification of the protein. Signal peptide prediction is used in reverse vaccinology to select proteins that are likely to be secreted by the target cell of the agent. However, these sequences should not be included in the selected peptide sequences because they typically do not form part of the final structure of the mature protein. The Bm86-CG protein does not appear to have a signal peptide according to the signalP algorithm (data not shown). This fact is due to the Bm86-CG sequence deposited in GenBank is a partial sequence of the whole protein, which lacks amino acids at the signal peptide site. On the other hand, full Bm86 sequences, such as from isolate N1 from a Thailand strain, present a signal peptide of 20 amino acids, as showed by signal algorithm (data not shown). The prediction of GPI anchors in combination with signal peptide prediction allows us to infer that the protein is anchored in a biological membrane. However, we did not observe a GPI anchor based on PderGPI results (data not shown). Additionally, we can infer its possible location, which is a factor that can enhance the triggering of an immune response in the host.

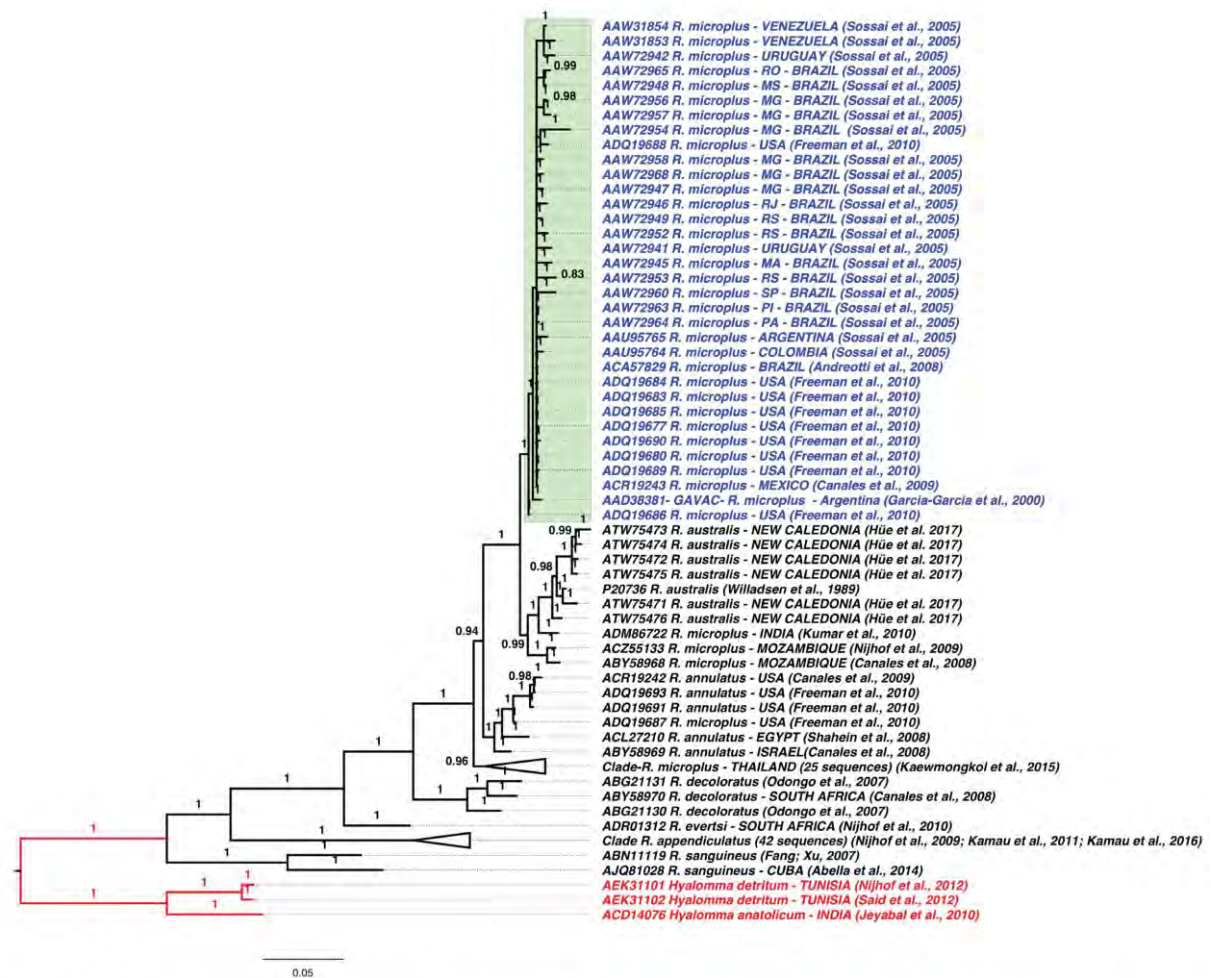


Figure 5. Bayesian phylogenetic tree for partial protein Bm86 (83-340 aa). Populations of *Rhipicephalus microplus* are shown in blue. The clade shown in red includes *Hyalomma detritum* and *Hyalomma anatolicum* (GenBank: AEK21101-102, ACD14076) and was used as an external group.

Alignment of the sequences of Bm86 proteins from distinct isolates allowed us to identify highly conserved regions (Supplementary Material Figure S1) that could be used to create a vaccine that is based on subunits/peptides. However, these regions do not coincide with the antigenic regions of bovine Bm86 that are capable of binding to the bovine MHC. Thus, when the animal is exposed to Bm86, its antigen-presenting cells (APCs) will process the antigen but will present only peptides from variable regions to CD4+ T lymphocytes via MHC class II. This process may result in nonspecific immune responses against these different strains.

A review by Parizi et al. (2012) indicate that the decades-long search for a universal tick vaccine is making progress, with such a vaccine likely to be based on multiple antigens and consequently successful vaccinations against multiple tick species. Our study shows progress towards a universal tick vaccine, that presented three conserved epitopes for regions of the Bm86 protein. Investigation of Hue et al. (2017) an experimental vaccine was developed based on the orthologous *R. australis* Bm86 sequence identified from

local *R. australis* strains and a recombinant protein expressed in *Escherichia coli*. The use of the vaccine reduced the population by 74.2% to each generation. These data once again demonstrate that it is possible to direct for a universal anti-tick vaccine.

De la Fuente et al. (2016) in the review work on vaccine strategies reports the caution should thus be placed on extrapolating the protective abilities of a specific antigen between tick species, as was seen in the case of Bm86 vaccines. It is worth mentioning, that new approaches to tick control depend on host-parasite interactions. Thus, the efficacy of a vaccine also stems from the clarification of the different immunological profiles presented by the hosts, where bovine tick resistance is a hereditary phenotype (KASHINO et al., 2005; CARVALHO et al., 2010).

The present study showed that based on Bm86, *R. microplus* populations were homogeneous and displayed high convergence among the isolates studied by García-García et al. (2000), Sossai et al. (2005), Andreotti et al. (2008), Canales et al. (2009), Nijhof et al. (2009), Freeman et al. (2010); strains of *R.*

microplus - THAILAND (KAEWMONGKOL et al., 2015); and Bm86 orthologs of *R. microplus*, such as *R. annulatus* (ABY58969) and *R. decoloratus* (ABY58970, ABG21130, ABG21131). Therefore, the results in the present study (Figures 4 and 5) suggest that the polymorphisms were not computed as significant changes and that all these peptides (Figures 2, 3 and 4) with polymorphic sites are more conserved when compared with the partial Bm86 protein sequence (Figure 5).

Interestingly, the strain reported by Willadsen et al. (1989) (P20736) and from Hue et al. (2017) (ATW75471-76) remained in the clade along with the other Bm86 strains (Figure 4). It is worth remembering that the cattle tick, previously named *R. microplus* until its morphological and genetic distinction to *R. australis* (ESTRADA-PENA et al., 2012). These strains obtained high convergence with the other strains of *R. microplus* for epitope 3. As this strain could produce an ortholog of *R. microplus* Bm86, this peptide could become a vaccine candidate for both *R. microplus* and *R. australis*.

Canales et al. (2009) showed that the Ba86 protein (an ortholog of Bm86 from *R. microplus*) is effective in controlling infestation with *R. annulatus* and *R. microplus*. This ortholog was shown to have low convergence in the tree with the partial Bm86 protein (ACR19242) (Figure 5). However, the chosen epitopes have been preserved for this ortholog, and may continue to be efficient in cross-immunity. This shows even orthologs have conserved regions and could be effective antigenic and immunogenic regions.

Differences were observed in the phylogenetic trees of epitope 1 and for total protein Bm86 (Figures 2 and 5) in the Thailand variants, which formed a distinct clade from the other *R. microplus* sequences. These differences could hinder the development of a global vaccine for these variants. However, epitopes 2 and 3 (Figures 3 and 4) presented a larger and more homogeneous clade with convergence among the *R. microplus* Thailand populations (Figure 3), suggesting that this epitope was more conserved and could generate a potential immunogen among the Thailand variants described by Kaewmongkol et al. (2015).

Kamau et al. (2016) demonstrated that intestinal cDNA from four *Rhipicephalus appendiculatus* field populations revealed genotypic polymorphisms and suggested that other factors such as exposure to innate immune components during blood feeding may direct the selection pressure that leads to the observed polymorphisms. Additional polymorphisms may have occurred during the evolution of the *R. microplus* populations (SOSSAI et al., 2005). Population studies performed by Csordas et al. (2016) with the cytochrome c oxidase subunit 1 (COI-1) gene indicated the presence of two haplotypes that differ from other Brazilian *R. microplus* populations. Thus, their antigenic epitopes may have become distinct from the epitopes of other populations. This possibility may indicate that most antigenic characteristics are not located in regions conserved in the Bm86-CG protein but instead are located in more variable regions.

Importantly, some convergence was observed for each phylogenetic tree of each selected epitope, resulting in their distribution among several geographic areas. Conversely, when the entire amino acid sequence of the Bm86-CG protein was analyzed (Figure 5), the polymorphisms formed several clusters associated with various geographic regions. This work presents peptides for a vaccine

that has point polymorphisms between conserved regions of the epitopes, but this does not interfere in the immunogenic and antigenic regions and may be candidates for a global vaccine. The *in silico* analysis presented here can be an important tool for related tick populations that have not been challenged with the Bm86 antigen in order to minimize future economic problems arising from infestations.

Conclusion

The phylogenetic analysis of the isolated epitopes and the Bm86-CG protein revealed geographical patterns among *R. microplus* tick isolates collected from the database; these isolates were classified into a major clade based on their amino acid sequences. These sequences may contain epitopes with amino acid residues that have both conserved and antigenic regions. However, this characteristic is found in most variable regions of the protein.

Considering the extensive sequence and functional polymorphism observed among strains of *R. microplus* from different geographical regions, we can conclude that it may be possible to achieve effective vaccination against these cattle ticks using a single universal Bm86-based antigen. These point polymorphisms in some amino acids do not form in a less conserved peptide, not altering their antigenic or immunogenic capacity. As genomic technologies in vaccine development continue to improve and evolve, sequencing of various tick genomes can identify tick vaccine candidates globally applicable to various species of ticks.

Acknowledgements

This study was supported by the Coordenao de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundao de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect, MS) - Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Aguirre AAR, Lobo FP, Cunha RC, Garcia MV, Andreotti R. Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. *Vet Parasitol* 2016; 221: 30-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.032>. PMID:27084468.
- Andreotti R, Guerrero FD, Soares MA, Barros JC, Miller RJ, Léon AP. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(2): 127-133. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000200007>. PMID:21722487.
- Andreotti R, Pedroso MS, Caetano AR, Martins NF. Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants Bm86 Campo Grande Strain, Bm86 and Bm95. *Rev Bras Parasitol Vet* 2008; 17(2): 93-98. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612008000200006>. PMID:18823577.

- Andreotti R. Performance of two Bm86 antigen vaccine formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. *Rev Bras Parasitol Vet* 2006; 15(3): 97-100. PMID:16978472.
- Barré N, Uilenberg G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. *Rev Sci Tech* 2010; 29(1): 149-160.
- Barrera RA, Guerrero FD, Black M, McCooke J, Chapman B, Schilkey E, et al. Gene-enriched draft genome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: assembly by the hybrid Pacific Biosciences/Illumina approach enabled analysis of the highly repetitive genome. *Int J Parasitol* 2017; 47(9): 569-583. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.03.007>. PMID:28577881.
- Ben-Yedidia T, Arnon R. Design of peptide and polypeptide vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 1997; 8(4): 442-448. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80066-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80066-3). PMID:9265723.
- Bovimune Ixovac. [online]. México: Lapisa; 2018 [cited 2018 July 20]. Available from: <http://www.ixovac.com/>
- Burger TD, Shao R, Barker SC. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Mol Phylogenet Evol* 2014; 76: 241-253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.03.017>. PMID:24685498.
- Canales M, Almazán C, Naranjo V, Jongejan F, de la Fuente J. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnol* 2009; 9(1): 29. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-9-29>. PMID:19335900.
- Canales M, de la Lastra JM, Naranjo V, Nijhof AM, Hope M, Jongejan F, et al. Expression of recombinant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnol* 2008; 8(1): 14. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-8-14>. PMID:18275601.
- Canales M, Enriquez A, Ramos E, Cabrera D, Dandie H, Soto A, et al. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. *Vaccine* 1997; 15(4): 414-422. [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00192-2). PMID:9141213.
- Carvalho WA, Franzin AM, Abatepaulo ARR, Oliveira CJF, Moré DD, Silva JS, et al. Modulation of cutaneous inflammation induced by ticks in contrasting phenotypes of infestation in bovines. *Vet Parasitol* 2010; 167(2-4): 260-273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.028>. PMID:19836891.
- Cobon G, Hungerford J, Woodrow M, Smith D, Willadsen P. Vaccination against *Boophilus microplus*: the Australian field experience. In: de la Fuente J. *Recombinant vaccines for the control of cattle tick*, Elfos Scintiae: Havana; 1995. p. 163-176.
- Contreras M, Villar M, Alberdi P, de la Fuente J. Vaccinomics approach to tick vaccine development. *Methods Mol Biol* 2016; 1404: 275-286. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3389-1_19. PMID:27076305.
- Csordas BG, García MV, Cunha RC, Giachetto PF, Blecha IMZ, Andreotti R. New insights from molecular characterization of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2016; 25(3): 317-326. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016053>. PMID:27579530.
- Cunha RC, Pérez de León AA, Leite FPL, Pinto LS, Santos AG Jr, Andreotti R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21(3): 254-262. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612012000300014>. PMID:23070436.
- Dayhoff MO, Schwartz RM, Orcutt BC. A model of evolutionary change in proteins. In: Dayhoff MO. *Atlas of Protein Sequence and Structure*. Silver Spring; National Biomedical Research Foundation; 1978. p. 345-352. (suppl. 3; vol. 5)
- De Groot AS. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. *Drug Discov Today* 2006; 11(5-6): 203-209. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03720-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03720-7). PMID:16580597.
- de la Fuente J, Kopáček P, Lew-Tabor A, Maritz-Olivier C. Strategies for new and improved vaccines against ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol* 2016; 38(12): 754-769. <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12339>. PMID:27203187.
- de la Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, García-García JC, Méndez L, et al. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genet Anal* 1999; 15(3-5): 143-148. [http://dx.doi.org/10.1016/S1050-3862\(99\)00018-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1050-3862(99)00018-2). PMID:10596754.
- DTU bioinformatics. *TMHMM Server v. 2.0. Prediction of transmembrane helices in proteins* [online]. Denmark: Department of Bio and Health Informatics; 2018a [cited 2018 July 20]. Available from: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>
- DTU bioinformatics. *SignalP 4.1 Server* [online]. Denmark: Department of Bio and Health Informatics; 2018b [cited 2018 July 20]. Available from: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
- Estrada-Peña A, Venzal JM, Nava S, Mangold A, Guglielmo AA, Labruna MB, et al. Reinstatement of *Rhipicephalus (Boophilus) australis* (Acari: Ixodidae) with redescription of the adult and larval stages. *J Med Entomol* 2012; 49(4): 794-802. <http://dx.doi.org/10.1603/ME11223>. PMID:22897039.
- Florea L, Halldórsson B, Kohlbacher O, Schwartz R, Hoffman S, Celera SI. Epitope prediction algorithms for peptide-based vaccine design. *Proc IEE Comput Biol Conf* 2003; 2: 17-26.
- Freeman JM, Davey RB, Kappmeyer LS, Kammlah DM, Olafson PU. Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. *Parasit Vectors* 2010; 3(1): 101. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-3-101>. PMID:21047431.
- Fries R, Eggen A, Womack JE. The bovine genome map. *Mamm Genome* 1993; 4(8): 405-428. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00296815>. PMID:8104056.
- Fries R, Hediger R, Stranzinger G. Tentative chromosomal localization of the bovine major histocompatibility complex by in situ hybridization. *Anim Genet* 1986; 17(4): 287-294. PMID:3103495.
- García-García JC, Gonzalez IL, González DM, Valdés M, Méndez L, Lamberti J, et al. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol* 1999; 23(11): 883-895. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006270615158>. PMID:10668863.
- García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 2000; 18(21): 2275-2287. [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00548-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00548-4). PMID:10717348.
- Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PH, et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2014; 23(2): 150-156. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014042>. PMID:25054492.
- Hüe T, Petermann J, Bonnefond R, Mermoud I, Rantoen D, Vuocolo T. Experimental efficacy of a vaccine against *Rhipicephalus australis*. *Exp*

- Appl Acarol* 2017; 73(2): 245-256. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-017-0184-0>. PMID:29110171.
- Immune Epitope Database and Analysis Resource – IEDB. *MHC-I binding predictions* [online]. Rockville: Bethesda; National Institute of Allergy and Infectious Diseases; 2018a [cited 2018 July 20]. Available from: <http://tools.iedb.org/mhci/>
- Immune Epitope Database and Analysis Resource – IEDB. *MHC-II binding predictions* [online]. Rockville: Bethesda; National Institute of Allergy and Infectious Diseases; 2018b [cited 2018 July 20]. Available from: <http://tools.iedb.org/mhcii/>
- Immune Epitope Database and Analysis Resource – IEDB. *Antibody Epitope Prediction (Bepipred Linear Epitope Prediction)* [online]. Rockville: Bethesda; National Institute of Allergy and Infectious Diseases; 2018c [cited 2018 July 20]. Available from: <http://tools.iedb.org/bcell>
- Immune Epitope Database and Analysis Resource – IEDB. *Antibody Epitope Prediction (Emini Surface Accessibility Prediction)* [online]. Rockville: Bethesda; National Institute of Allergy and Infectious Diseases; 2018d [cited 2018 July 20]. Available from: <http://tools.iedb.org/bcell>
- IUPred2A. *Prediction of intrinsically unstructured proteins* [online]. Hungary IUPred2A; 2018 [cited 2018 July 20]. Available from: <https://iupred2a.elte.hu/>
- Jonsson NN, Matschoss AL, Pepper P, Green PE, Albrecht MS, Hungerford J, et al. Evaluation of TickGARD^{PLUS}, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Vet Parasitol* 2000; 88(3-4): 275-285. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00213-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00213-7). PMID:10714465.
- Kaewmongkol S, Kaewmongkol G, Inthong N, Lakkitjaroen N, Sirinarumit T, Berry CM, et al. Variation among Bm86 sequences in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks collected from cattle across Thailand. *Exp Appl Acarol* 2015; 66(2): 247-256. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-015-9897-0>. PMID:25777941.
- Kamau L, Skilton RA, Odongo DO, Mwaura S, Githaka N, Kanduma E, et al. Differential transcription of two highly divergent gut-expressed Bm86 antigen gene homologues in the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodida). *Insect Mol Biol* 2011; 20(1): 105-114. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01043.x>. PMID:20854482.
- Kamau LM, Skilton RA, Githaka N, Kiara H, Kabiru E, Shah T, et al. Extensive polymorphism of Ra86 genes in field populations of *Rhipicephalus appendiculatus* from Kenya. *Ticks Tick Borne Dis* 2016; 7(5): 772-781. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.03.011>. PMID:27051976.
- Kashino SS, Resende J, Sacco AM, Rocha C, Proença L, Carvalho WA, et al. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp Parasitol* 2005; 110(1): 12-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2005.01.006>. PMID:15804374.
- Kast WM, Roux L, Curren J, Blom HJJ, Voordouw AC, Meloen RH, et al. Protection against lethal Sendai virus infection by *in vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(6): 2283-2287. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.6.2283>. PMID:1848698.
- Kopp N, Diaz D, Amacker M, Odongo DO, Beier K, Nitsch C, et al. Identification of a synthetic peptide inducing cross-reactive antibodies binding to *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Rhipicephalus appendiculatus* Bm86 homologues. *Vaccine* 2009; 28(1): 261-269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.085>. PMID:19808026.
- Labruna MB, Naranjo V, Mangold JA, Thompson C, Estrada-Peña A, Guglielmo AA, et al. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Evol Biol* 2009; 9(1): 46-58. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-9-46>. PMID:19243585.
- Lewin HA. Genetic organization, polymorphism, and function of the bovine major histocompatibility complex. In: Schook LB, Lamont SJ, editors. *The major histocompatibility complex region of domestic animal species*. 4th ed. Boca Raton: CRC Series in Comparative Immunology; 1996. p. 65-98.
- Low-Tabor AE, Rodriguez Valle M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks Tick Borne Dis* 2016; 7(4): 573-585. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.012>. PMID:26723274.
- Low VL, Tay ST, Kho KL, Koh FX, Tan TK, Lim YA, et al. Molecular characterization of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: new insights into the cryptic diversity and distinct genetic assemblages throughout the world. *Parasit Vectors* 2015; 8(1): 341. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0956-5>. PMID:26104478.
- McShane RD, Gallagher DS Jr, Newkirk H, Taylor JF, Burzlaff JD, Davis SK, et al. Physical localization and order of genes in the class I region of the bovine MHC. *Anim Genet* 2001; 32(5): 235-239. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2052.2001.00758.x>. PMID:11683708.
- National Center for Biotechnology Information – NCBI. *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool* [online]. Rockville: Bethesda Softworks; 2018 [cited 2018 July 20]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>
- Nene V, Svitek N, Toye P, Golde WT, Barlow J, Harndahl M, et al. Designing bovine T cell vaccines via reverse immunology. *Ticks Tick Borne Dis* 2012; 3(3): 188-192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.12.001>. PMID:22621863.
- Nijhof AM, Balk JA, Postigo M, Jongejan F. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. *BMC Mol Biol* 2009; 10(1): 112. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-10-112>. PMID:20040102.
- Odongo D, Kamau L, Skilton R, Mwaura S, Nitsch C, Musoke A, et al. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. *Vaccine* 2007; 25(7): 1287-1296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.09.085>. PMID:17070625.
- Parizi LF, Githaka NW, Logullo C, Konnai S, Masuda A, Ohashi K, et al. The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. *Vet J* 2012; 194(2): 158-165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.05.023>. PMID:22766309.
- Patarroyo JH, Portela RW, Castro RO, Couto Pimentel J, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88(3-4): 163-172. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00154-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00154-X). PMID:12127414.
- Peconick AP, Sossai S, Girão FA, Rodrigues MQ, Souza e Silva CH, Guzman Q F, et al. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. *Exp Parasitol* 2008; 119(1): 37-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2007.12.007>. PMID:18226809.

- Pierleoni A, Martelli PL, Casadio R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics* 2008; 9(1): 392. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-9-392>. PMID:18811934.
- Rand KN, Moore T, Sriskantha A, Spring K, Tellam R, Willadsen P, et al. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(24): 9657-9661. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.86.24.9657>. PMID:2690068.
- Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall'Agnol B, Scheffer R, Souza UA, et al. First report of fluzuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet Parasitol* 2014; 201(1-2): 128-136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.012>. PMID:24560364.
- Richardson MA, Smith DR, Kemp DH, Tellam RL. Native and baculovirus-expressed forms of the immuno-protective protein Bm86 from *Boophilus microplus* are anchored to the cell membrane by a glycosyl-phosphatidyl inositol linkage. *Insect Mol Biol* 1993; 1(3): 139-147. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2583.1993.tb00115.x>. PMID:8269092.
- Riek RF. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. VI. Resistance of cattle to infestation with the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust J Agric Res* 1962; 13(3): 532-550. <http://dx.doi.org/10.1071/AR9620532>.
- Rodríguez M, Rubiera R, Penichet M, Montesinos R, Cremata J, Falcón V, et al. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J Biotechnol* 1994; 33(2): 135-146. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)90106-6](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1656(94)90106-6). PMID:7764729.
- Rodríguez-Valle M, Moollhuijzen P, Piper EK, Weiss O, Vance M, Bellgard M, et al. *Rhipicephalus microplus* lipocalins (LRMs): Genomic identification and analysis of the bovine immune response using in silico predicted B and T cell epitopes. *Int J Parasitol* 2013; 43(9): 739-752. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.04.005>. PMID:23747800.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. MRBAYES 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003; 19(12): 1572-1574. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>. PMID:12912839.
- Singh NK, Gelot IS, Jyoti, Singh V, Rath SS. Detection of amitraz resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from North Gujarat, India. *J Parasit Dis* 2015; 39(1): 49-52. <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-013-0280-y>. PMID:25698859.
- Sitte K, Brinkworth R, East IJ, Jazwinska EC. A single amino acid deletion in the antigen binding site of BoLA-DRB3 is predicted to affect peptide binding. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 85(3-4): 129-135. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00430-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00430-5). PMID:11943314.
- Sossai S, Peconick AP, Sales-Junior PA, Marcelino FC, Vargas MI, Neves ES, et al. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol* 2005; 37(3-4): 199-214. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-005-3262-7>. PMID:16323051.
- Sutherst RW, Bourne AS. Modelling non-equilibrium distributions of invasive species: a tale of two modeling paradigms. *Biol Invasions* 2009; 11(6): 1231-1237. <http://dx.doi.org/10.1007/s10530-008-9335-x>.
- Szabó MPJ, Bechara GH. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. *Exp Appl Acarol* 1999; 23(11): 915-928. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006347200373>. PMID:10668866.
- Szabó MPJ. Imunopatologia da resistência de bovinos ao carrapato *R. (B.) microplus*. In: Pereira MC, Labruna MB, Szabó MPJ, Klafke GM. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência*. 1st ed. São Paulo: MedVet; 2008. p. 107-126.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30(12): 2725-2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>. PMID:24132122.
- Toes REM, Offringa R, Blom RJJ, Melief CJM, Kast WM. Peptide vaccination can lead to enhance tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(15): 7855-7860. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.15.7855>. PMID:8755566.
- Tree Bio. *FigTree* [online]. London: Tree Bio; 2016 [cited 2017 Mar 02]. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>
- Vargas M, Montero C, Sánchez D, Pérez D, Valdés M, Alfonso A, et al. Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavacplus vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. *BMC Vet Res* 2010; 6(1): 43. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-6-43>. PMID:20846415.
- Vordermeier M, Whelan AO, Hewinson RG. Recognition of mycobacterial epitopes by T cells across mammalian species and use of a program that predicts human HLA-DR binding peptides to predict bovine epitopes. *Infect Immun* 2003; 71(4): 1980-1987. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.4.1980-1987.2003>. PMID:12654816.
- Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* 1995; 110(S1 Suppl): S43-S50. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182000001487>. PMID:7784128.
- Willadsen P, Riding GA, McKenna RV, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, et al. Immunological control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J Immunol* 1989; 143(4): 1346-1351. PMID:2745982.

Supplementary Material

Supplementary material accompanies this paper.

Bm86p1 aa 566-588

```
AJE29940 SSGQRCVMENGVAVCKVESGAHT
AJE29930 SSEHRCVMENGVAVCKEKSEATT
AJE29932 SSGHRCVMENGVAVCKEKTEATT
AAA30098 SSGQRCVIEGVAVCKEKSEATT
ACZ55133 SSGQRCVMENGVAVCKEKSDATT
ADQ19688 SSGQRCVMENGVAVCKEKSDATT
ADQ19690 SSGQRCVMENGVAVCKEKSDATT
ACA57829 SSGQRCVMENGVAVCKEKSDATT
ADQ19678 SSGQRCVMENGVAVCKEKSDATT
ADQ19677 SSGQRCVMENGVAVCKEKSDATT
ADQ19679 SSGQRCVMENGVAVCKEKSDATT
AJE29929 SSGQRCVMENGVAVCKEKSDATT
AJE29941 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
AJE29939 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29951 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29933 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29949 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29945 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29937 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29948 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29952 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29946 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29934 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29935 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29944 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29950 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29936 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29947 SSGQRCVMENGVAVCKVVKSEATT
AJE29927 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
AJE29925 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
AJE29926 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
AJE29931 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
AJE29924 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
AJE29942 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
ADQ19681 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
ADQ19680 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
ADQ19682 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
ADQ19689 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
AJE29938 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
AJE29943 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
AJE29928 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
ADQ19687 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
ADQ19686 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
ADQ19684 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
ADQ19685 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
ADQ19683 SSGQRCVMENGVAVCKEKSEATT
** : * :****:**** : : **
```

Bm86p2 aa 560-584

```
AJE29932 KCLDDPECSREPAKDCSNKKEGNGK
AJE29930 KCPDDHFSREPAKDCSCEKENGNGK
AJE29929 KCPDDHECFREPAKDFCSEENNGK
AJE29931 KCPDDHECSREPAKDFCREEGNGK
AAA30098 ECPDDHECYREPAKDCSCEEDNGK
ADQ19681 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ADQ19680 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ADQ19682 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ADQ19689 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ADQ19685 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
AJE29942 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ADQ19687 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ACZ55133 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ADQ19686 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ADQ19684 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ADQ19683 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ADQ19688 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ADQ19690 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ACA57829 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ADQ19678 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ADQ19677 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
ADQ19679 KCPDDHECSRQPAKDCSCEEDNGK
AJE29928 ECPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29938 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29943 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29927 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29925 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29926 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29939 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29940 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29951 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29933 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29949 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29945 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29937 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29948 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29952 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29946 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29934 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29935 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29944 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29950 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29936 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29947 KCPDGHECSREPAKDCSCEEDNGK
AJE29941 KCPDGHECFREPAKDCSCEEDNGK
AJE29924 KCPDGHECFREPAKDCSCEEDNGK
: * * . * :**** * : : ***
```

Bm86p3 aa 170-189

```
AAA30098 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ACZ55133 DSYCSPGSPKGPDRQCKINAC
ADQ19687 DSYCSPGSPKGPDPGQCKDAD
AJE29931 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29932 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29938 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29943 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29927 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29925 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29926 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29941 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29942 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29929 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ADQ19681 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ADQ19680 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ADQ19682 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ADQ19689 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ADQ19686 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ADQ19684 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ADQ19685 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ADQ19683 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ADQ19688 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ADQ19690 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ACA57829 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ADQ19678 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ADQ19677 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
ADQ19679 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29930 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29924 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29939 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29940 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29951 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29933 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29949 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29945 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29937 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29948 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29952 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29946 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29934 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29935 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29944 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29950 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29936 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29947 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29941 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
AJE29924 DSYCSPGSPKGPDPGQCKINAC
*****:*** ** :**
```

Figure S1. Alignment of the sequences of epitopes 1, 2 and 3 of Bm86 proteins from distinct isolates to identify the most conserved regions.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível selecionar os antígenos contra o carrapato *Rhipicephalus microplus*, além de caracterizar e desenvolver uma proteína recombinante com os antígenos selecionados. A expressão da proteína recombinante rRmTI-CG-LTB foi otimizada em meio de cultura TB com rendimento de 10 mg/L⁻¹ de meio. Os determinantes antigênicos foram retidos na proteína, que se mostrou promissora como um imunógeno protetor. O alto desvio padrão apresentado no número e peso de carrapatos são dados preliminares que sugerem proteção (55,6%). No entanto, isso precisa ser melhor avaliado em estudos futuros.

Na expectativa de que uma vacina com eficácia superior às vacinas já comercializadas anteriormente, fez-se necessária a busca por mais do que um antígeno. A vacina produzida neste trabalho pode, juntamente com acaricidas, ser utilizada em programa de controle integrado contra o carrapato, de uma maneira rentável e com uso mínimo de produtos químicos.

Para responder a pergunta se é possível uma vacina global contra o carrapato *R. microplus*, conclui-se que as análises *in silico* da sequência aminoacídica da proteína Bm86-CG da população brasileira de *R. microplus*, ao serem comparadas com as sequências de Bm86 de outras populações de carrapatos ao redor do mundo possibilitaram obter três epítopos isolados da proteína Bm86-CG.

Considerando a extensão de toda sequência e o polimorfismo funcional observados entre cepas de *R. microplus* de diferentes regiões geográficas, pode-se concluir que é sim possível a obtenção de uma vacinação efetiva contra esses carrapatos bovinos usando um único antígeno universal baseado em Bm86.

Cabe também fazer uma crítica aos processos vacinais que se utilizam apenas de proteínas antigênicas de carrapatos. Novas ferramentas com potencial poliantigênico, como os estudo de transfecção, poderiam utilizar antígenos de carrapatos e antígenos dos patógenos transmitidos por estes. Dessa forma, gerariam não somente potenciais vacinais, mas conhecimento aprofundado das vias de tráfego e mecanismos da respostas imune do hospedeiro.

Em geral, o uso de dados do genoma em conjunto com novas abordagens relacionadas à transfecção e ao genoma, serão fundamentais para fechar as atuais lacunas do conhecimento em direção a melhor compreensão da biologia desses organismos, essas novas abordagens experimentais provavelmente serão as chaves que levarão ao desenvolvimento de métodos aperfeiçoados de controle.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. **Celular and molecular immunology**. Philadelphia: Saunders, 1997.
- AGUIRRE, A. A. R.; GARCIA M. V.; COSTA, I. N. D.; CSORDAS, B. G.; RODRIGUES, V. D. S.; MEDEIROS, J. F.; ANDREOTTI, R. New records of tick-associated spotted fever group Rickettsia in an Amazon-Savannah ecotone, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 4, p. 1038-1044, May 2018.
- AGUIRRE, A. A. R.; LOBO, F. P.; CUNHA, R. C.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R. Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. **Veterinary Parasitology**, v. 221, p. 30-38, May 2016.
- ALLISON, A. C.; BYARS, N. E. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. **Molecular Immunology**, v. 28, n. 3, p. 279-284, Mar. 1991.
- ALVES-BRANCO, F. P. J.; ECHEVARRIA, F. A. M.; SIQUEIRA, A. S. **Garça vaqueira (*Egretta ibis*) e o controle biológico do carrapato (*Boophilus microplus*)**. EMBRAPA-UEPAE Bagé, Comunicado Técnico 1, 1983, 4 p.
- ALVES-BRANCO, F.P.J.; SAPPER, M. F. M.; ARTILES, J. M. Diagnóstico de resistência de *Boophilus microplus* a piretróides. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11, 1992, Gramado. **Anais...** Gramado: SOVERGS, 1992. p. 44.
- ANDREOTTI, R. A synthetic bmti n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 66-70, 2007.
- ANDREOTTI, R. Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 15, n. 3, p. 97-100, 2006.
- ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil** (online). 1. ed. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2010. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/DOC180.pdf>. Acesso em: 15 out. 2018.
- ANDREOTTI, R.; BARROS, J. C.; GARCIA, M. V.; RODRIGUES, V. S.; HIGA, L. O. S.; DUARTE, P. O.; BLECHA, I. M. Z.; BONATTE-JUNIOR, P. Cattle tick infestation in Brangus cattle raised with Nellore in central Brazil. **Semina Ciências Agrárias**, v. 39, p. 1099-1114, 2018.
- ANDREOTTI, R.; CUNHA, R. C.; SOARES, M. A.; GUERRERO, F. D.; LEITE, F. P.; DE LEÓN, A. A. Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. **Vaccine**, v. 30, n. 47, p. 6678-6685, 2012.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; BARROS, J. C. Protective action of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus*

(Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 1-2, p. 341-345, Oct. 2013.

ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K. C.; SASAKI, S. D.; SAMPAIO, C. A.; TANAKA, S.; S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International immunopharmacology**, v. 2, n. 4, p. 557-563, Mar. 2002.

ANDREOTTI, R.; PEDROSO, M. S.; CAETANO, A. R.; MARTINS, N. F. Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants Bm86 Campo Grande strain, Bm86 and Bm95. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 93-98, 2008.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**, v. 19, n. 17-19, p. 2666- 2672, Mar. 2001.

BARROS-BATTESTI, M. D., ARZUA, M., BECHARA, G. H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, VOX/ICTTD-13/Butantan, 2006. p. 223.

BASTOS, R. G.; MASSARO, W. U.; DONALD, P. K.; SCOLES, G. A. The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute *Babesia bovis* infection. **Parasites & Vectors**, v. 3, p.111, 2010.

BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; BARBOSA, C. S. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 89-96, 2011.

BONA, C. A.; CASARES, S.; BRUMEANU, T. D. Towards development of T-cell vaccines. **Immunology Today**, v. 19, n. 3, p.126-132, 1998.

BRASHEARS, M. M.; CHAVES, D. B. The diversity of beef safety: A global reason to strengthen our current systems. **Meat Science**, v. 132, p. 59-71, 2017.

BRAUN, M. C.; HE, J.; WU, C. Y.; KELSALL, B. L. Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor beta1 and beta2 chain expression. **Journal Experimental of Medicine**, v. 189, n. 3, p. 541-552, Feb. 1999.

BRODERSON, J. R. A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. **Laboratory animal Science**, v. 39, n. 5, p. 400-405, Sept.1989.

BROSSARD M, WIKEL SK. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129, p. 161-176, 2004.

BROWN, W. C.; ZHAO, S.; WOODS, V. M.; DOBBELAERE, D. A. E.; RICE-FIGHT, A. C. *Babesia bovis*-specific CD4+T cell clones from immune cattle express either the Th0 or Th1 profile of cytokines. **La Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**, v. 46, n. 1-2, p. 65-69, 1993.

BRUM, J. G. W. **Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* (Grimont et al., 1981): etiopatogenia e sazonalidade**. 1988. 95 f. Tese

(Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1988.

BURGER, T. D.; SHAO, R.; BARKER, S. C. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 76, p. 241-253, July 2014.

CANALES, M.; ENRÍQUEZ, A.; RAMOS, E.; CABRERA, D.; DANDIE, H.; SOTO, A.; FALCÓN, V.; RODRÍGUEZ, M.; DE LA FUENTE, J. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. **Vaccine**, n. 15, v. 4, p. 414-422, May 1997.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **The Journal of Infection Disease**, v. 184, n. 3, p. 337-344, Aug. 2001.

COLWELL, D. D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 1, p. 14-21, Nov. 2011.

CONTRERAS, M.; VILLAR, M.; ALBERDI, P.; DE LA FUENTE, J. Vaccinomics Approach to Tick Vaccine Development. **Methods in Molecular Biology**, v.1404, p. 275-286, 2016.

CORDOVÉS, C. O. **Carrapato: controle ou erradicação**. 2. ed. Guaíba: Agropecuária, 1997.

CORY, S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. **Annual Review Immunology**, v. 13, p. 513-544, 1995.

CSORDAS, B. G.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; GIACHETTO, P. F.; BLECHA, I. M.; ANDREOTTI, R. New insights from molecular characterization of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 3, p. 317-326, Sept. 2016.

CUNHA, R. C.; PÉREZ DE LEÓN, A. A.; LEITE, F. P.; PINTO, L. DA S.; DOS SANTOS, JÚNIOR A. G.; ANDREOTTI, R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 254-262, July - Sept. 2012.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437-446, 2012.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 26-37, 2010.

de CASTRO, J.J. Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. **Veterinary Parasitology**, v. 71, v. 2-3, p. 77-97, 1997.

AVIS, D.; MOREIN, B.; AKERBLUM, L.; LOVGREN-BENGTSSON, K.; VAN GILS, M. E.; BOGERS, W. M.; TEEUWSEN, V. J.; HEENEY, J. L. A recombinant prime, peptide boost vaccination strategy can focus the immune response on to more than one epitope even

though these may not be immunodominant in the complex immunogen. **Vaccine**, v. 15, n. 15, p. 1661-1669, 1997.

DAGERT, M.; EHRLICH, S. D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. **Gene**, v. 6, n. 1, p. 23-28, May 1979.

DAYHOFF, M. O.; SCHWARTZ, R. M.; ORCUTT, B. C. A model of evolutionary change in proteins. In: DAYHOFF, M. O. **Atlas of Protein Sequence and Structure**. Silver Spring: National Biomedical Research Foundation, 1978. p. 345-352.

DE LA FUENTE, J.; RODRÍGUEZ, M.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; GARCÍA-GARCÍA, J. C.; MÉNDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDÉS, M.; ENRIQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUÉ, O.; MACHADO, H.; LLEONART, R.; DE ARMAS, C. A.; REY, S.; RODRÍGUEZ, J. L.; ARTILES, M.; GARCÍA, L. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with GAVAC against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 16, n. 4, p. 366-373, 1998.

DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ-VALLE, M.; GARCIA-GARCIA, J. C. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 617-621, 2000.

DE LA VEGA, R.; DIAZ, G.; GALAN, M.; FERNANDEZ, C. Anatomy and histology of the female reproductive system of *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE). **Revista de Salud Animal**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2012.

DE MEEÛS, T.; KOFFI, B. B.; BARRE, N.; GARINE-WICHATITSKY, M.; CHEVILLON, C. Swift sympatric adaptation of a species of cattle tick to a new deer host in New Caledonia. **Infection Genetics and Evolution**, v. 10, p. 976-983, 2010.

DE VOS, S.; ZEINSTRAL, L.; TAOUFIK, A.; WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 25, n. 3, p. 245-261, 2001.

DOBLER, G. Zoonotic tick-borne flaviviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 221-228, 2010.

DOSZTÁNYI, Z.; CSIZMOK, V.; TOMPA, P.; SIMON, I. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3433-3434, Aug. 2005.

DOUCE, G.; FONTANA, M.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; DOUGAN, G. Intranasal immunogenicity and adjuvanticity of site-directed mutant derivatives of cholera toxin. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2821-2828, July 1997.

DUH, D.; PUNDA-POLIC, V.; AVSIC-ZUPANC, T.; BOUYER, D.; WALKER, D. H.; POPOV, V. L.; JELOVSEK, M.; GRACNER, M.; TRILAR, T.; BRADARIC, N.; KURTTI, T. J.; STRUS J. *Rickettsia hoogstraalii* sp. nov., isolated from hard and soft-bodied ticks. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 977-984, Apr. 2010.

ELDER, J. K.; KEARNAN, J. F.; WATERS, K. S.; DUNWELL, G. H.; EMMERSON, F. R.; KNOTT, S. G.; MORRIS, R. S. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistance cattle and pasture spelling. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, n. 5, p. 219-231, May 1980.

ELSON, C. O.; EALDING, W. Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen. **The Journal of Immunology**, v. 133, p. 2892-2897, 1984.

EMINI, E. A.; HUGHES, J. V.; PERLOW, D. S.; BOGER, J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**, v. 55, p. 836-839, 1985.

ESTES, D. M.; HIRANO, A.; HEUSSLER, V. T.; DOBBELAERE, D. A. E.; BROWN, W. C. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of 67 recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. **Cellular Immunology**, v. 163, p. 268-279, 1995.

FREUND, J. The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization. **American Society for Clinical Pathology**, v. 21, p. 645 - 656, 1951.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na Região Sudeste do Brasil. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, v.8, p.46-61, 1993.

FURLONG, J.; PRATA, M. C. A.; MARTINS, J. R. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, n. 159, p. 26-32, 2007.

GONZALES, J. C.; SILVA, N. R. da.; FRANCO, N.; PEREIRA, I. H. de O. A vida livre do *Boophilus microplus* (Can. 1887). **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 3, n. 1, p. 21-28, dez. 1975.

GONZALES, J. C. 2003. **O controle do carrapato do boi**. 3. ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, RS, 2003.

GOUGH, J. M.; KEMP, D. H. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. **Journal of Parasitology**, v. 79, p. 900-907, 1993.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R.; BARROS, A. T.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H.; LEÓN, A. A.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, June 2014.

GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nature Review Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 505-507, July 2007.

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 163-171, 2016.

- HORN, S. C.; DUBIN, L. C.; SEVERO, J. E. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos no Brasil. In: Brasil, Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**, n. especial, 2. ed., 1983.
- HÜE, T.; PETERMANN, J.; BONNEFOND, R.; MERMOUD, I.; RANTOEN, D.; VUOCOLO, T. Experimental efficacy of a vaccine against *Rhipicephalus australis*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 73, n. 2, p. 245-256, Oct. 2017.
- HUMBERT, M.; RASMUSSEN, R. A.; ONG, H.; KAISER, F. M.; HU, S. L.; RUPRECHT, R. M. Inducing cross-clade neutralizing antibodies against HIV-1 by immunofocusing. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, p. 3937, Dec. 2008.
- HUNTER, R. L. Overview of vaccine adjuvants: present and future. **Vaccine**, v. 20, p. 7-12, May 2002.
- IYER, A. V.; GHOSH, S.; SINGH, S. N.; DESHMUKH, R. A. Evaluation of three 'ready to formulate' oil adjuvants for foot-and-mouth disease vaccine production. **Vaccine**, v.19, n. 9-10, p. 1097-1105, Dec. 2000.
- JAVARONI, R.C.A; TALAMON, J; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O., Estudo da degradação de lindano em solução aquosa através da radiação gama. **Química Nova**, v. 14, p. 237-239, 1991.
- JAWALE, C. V.; LEE, J. H. *Salmonella enterica* serovar enteritidis ghosts carrying the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit are capable of inducing enhanced protective immune responses. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 6, p. 799-807, June 2014.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. s3-s14, 2004.
- KATZ, J. M.; LU, X.; YOUNG, S, A.; GALPHIN, J. C. Adjuvant activity of the heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli* for oral administration of inactivated influenza virus vaccine. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 175, n. 2, p. 352-363, Feb. 1997.
- KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, v. 5, n. 2, p. 47-56, Feb. 1989.
- KAWAMURA, K.; YAMADA, T.; KURIHARA, K.; TAMADA, T.; KUROKI, R.; TANAKA, I.; TAKAHASHI, H.; NIIMURA, N. X-ray and neutron protein crystallographic analysis of the trypsin-BPTI complex. **Acta Crystallographica Section D**, v. 67, n. 2 p.140-148, Feb. 2011.
- KEMP, D. H.; STONE, B. F.; BINNINGTON, K. C. Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions, and the host response. In: OBENCHAIN, F. D.; GALUN, R. **Physiology of ticks**. Oxford: Pergamon Press Ltd, 1982, 119-167 p.

BARROS, A. T.; SCHUMAKER, T. T.; KOLLER, W. W.; KLAFKE, G. M.; ALBUQUERQUE, T. A.; GONZALEZ, R. Mechanisms of pyrethroid resistance in *Haematobia irritans* (Muscidae) from Mato Grosso do Sul state. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 136-142, Jan. Mar. 2013.

KRAICZY, P.; WÜRZNER, R. Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 1-2, p. 31-44, Jan. 2006.

KRAWCZAK, F. S.; MARTINS, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; BINDER, L. C.; COSTA, F. B.; NUNES, P. H.; GREGORI, F.; LABRUNA, M. B. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a parasite of wild mammals in Southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 1, p. 28-37, Jan. 2015.

KUMAR, B.; AZHAHIANAMBI, P.; GHOSH, S. DNA Vaccination in Chickens. **Vaccine Design**, v. 1404, p. 459-482, 2016.

KUSI, K. A.; FABER, B. W.; RIASA, T. V.; THOMAS, A. W.; KOCKEN, C. H.; REMARQUE, E. J. Generation of humoral immune responses to multi-allele PfAMA1 vaccines; effect of adjuvant and number of component alleles on the breadth of response. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. e15391, Nov. 2010.

LABRUNA, M. B.; MATTAR, V.; S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; DE SOUSA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, May 2011.

LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; MARCILI, A.; BARBIERI, A. R.; NUNES, P. H.; HORTA, M. C.; VENZAL, J. M. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 511, Sept. 2016.

LEENAARS, P. P.; HENDRIKSEN, C. F.; ANGULO, A. F.; KOEDAM, M. A.; CLAASSEN, E. Evaluation of several adjuvants as alternatives to the use of Freund's adjuvant in rabbits. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.40, n. 3, p. 225-241, Mar. 1994.

LEENAARS, P. P.; KOEDAM, M. A.; WESTER, P. W.; BAUMANS, V.; CLAASSEN, E.; HENDRIKSEN, C. F. Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. **Laboratory Animals**, v. 32, n. 4, p. 387-406, Oct. 1998.

LESSARD, J. C. Growth media for *E. coli*. **Methods in Enzymology**, v. 533, p. 181-189, 2013.

LEW-TABOR, A. E., RODRIGUEZ-VALLE. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick-borne diseases. **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 7, n. 4, p. 573-585, 2016.

LIOY, E.; SUAREZ, J.; GUZMAN, F.; SIEGRIST, S.; PLUSCHKE, G.; PATARROYO, M. E. Synthesis, biological, and immunological properties of cyclic peptides from *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 40, n. 14, p. 2631-2635, 2001.

LOW, V. L.; TAY, S. T.; KHO, K. L.; KOH, F. X.; TAN, T. K.; LIM, Y. A.; ONG, B. L.; PANCHADCHARAM, C.; NORMA-RASHID, Y.; SOFIAN-AZIRUN, M. Molecular characterisation of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: new insights into the cryptic diversity and distinct genetic assemblages throughout the world. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 341, June 2015.

LUTZ, B. M. J. **A nacionalidade da mulher casada perante o Direito Internacional Privado**. 1933, Tese de Livre Docência - Faculdade de Direito de Niterói, Rio de Janeiro, 1933.

MARCHLER-BAUER, A.; BO, Y.; HAN, L.; HE, J.; LANCZYCKI, C. J.; LU, S.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; GEER, R. C.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; WANG, Z.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; GEER, L. Y.; BRYANT, S. H. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. 200-203, Jan. 2017.

MATIAS, J.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; AGUIRRE, A. DE A.; BARROS, J. C.; CSORDAS, B. G.; ANDREOTTI, R. Spotted fever group Rickettsia in *Amblyomma dubitatum* tick from the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 107-110, Mar. 2015.

McGUIRE, T.C.; MUSOKE, A.J.; KURTTI, T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. **Immunology**, v. 38, p. 249-256, 1979.

MUÑOZ-LEAL, S.; TOLEDO, L. F.; VENZAL, J. M.; MARCILI, A.; MARTINS, T. F.; ACOSTA, I. C. L.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: Ornithodoros) associated with stream-breeding frogs (Anura: Cycloramphidae: Cycloramphus) in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 5, p. 682-692, 2017.

MUSEU DO CARRAPATO. Embrapa Gado de Corte (online). Campo Grande; 2012. Disponível em: <https://cloud.cnpqc.embrapa.br/controlado-carrapato-ms/museu-do-carrapato/>. Acesso em: 15 out. 2018.

NATURE. Nature is part of Springer Nature (online); 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/subjects/recombinant-vaccine>. Acesso em: 15 out. 2018.

NICHOLSON, W. L.; ALLEN, K. E.; MCQUISTON, J. H.; BREITSCHWERDT, E. B.; LITTLE, S. E. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 205-212, Apr. 2010.

NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J. R. Significant changes in epidermal Langerhans cells of guinea pigs infested with ticks (*Dermacentor andersoni*). **Immunology**, v. 51, p. 133-141, 1984.

NOLAN J. Acaricide resistance in single and multi-host ticks and strategies for control. **Parassitologia**, v. 32, n. 1, p. 145-153, Apr.1990.

NUÑEZ, J. L.; MUÑOZ COBENAS, M. E.; MOLTEDO, H. L. **Boophilus microplus, la garrapata comun del ganado vacuno**. 1. ed. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1982.

OKITSU, S. L.; KIENZL, U.; MOEHLE, K.; SILVIE, O.; PEDUZZI, E.; MUELLER, M. S.; SAUERWEIN, R. W.; MATILE, H.; ZURBRIGGEN, R.; MAZIER, D.; ROBINSON, J. A.; PLUSCHKE, G. Structure-activity-based design of a synthetic malaria peptide eliciting sporozoite inhibitory antibodies in a virosomal formulation. **Chemistry & Biology**, v. 14, n. 5, p. 577-587, 2007.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P.; CATROXO, M. H.; BOUYER, D. H.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5207-5211, Aug. 2011

PADDOCK, C.D. The science and fiction of emerging rickettsioses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 133-143, May 2009.

PARIZI, L. F.; RECK, J. Jr.; OLDIGES, D. P.; GUIZZO, M. G.; SEIXAS, A.; LOGULLO, C.; DE OLIVEIRA, P. L.; TERMIGNONI, C.; MARTINS, Jr.; VAZ IDA, S. Jr. Multiantigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation. **Vaccine**, v.30, n. 48, p.6912-6917, Nov. 2012.

PEPPER, J. W. Defeating pathogen drug resistance: Guidance from evolutionary theory. **Evolution**, v. 62, n. 12, p. 3185–3191, Dec. 2008.

PETERMANN, J.; BONNEFOND, R.; MERMOUD, I.; RANTOEN, D.; MEYNARD, L.; MUNRO, C.; LUA, L. H. L.; HÜE, T. Evaluation of three adjuvants with respect to both adverse effects and the efficacy of antibody production to the Bm86 protein. **Experimental and Applied Acarology**, v. 72, n. 3, p. 303-315, July 2017.

PFEIFFER, B.; PEDUZZI, E.; MOEHLE, K.; ZURBRIGGEN, R.; GLUCK, R.; PLUSCHKE, G.; ROBINSON, J. A. A virosome-mimotope approach to synthetic vaccine design and optimization: synthesis, conformation, and immune recognition of a potential malariavaccine candidate. **Angewandte Chemie International Edition English**, v. 42, n. 21, p. 2368-2371, May 2003.

PIESMAN, J.; EISEN, L. Prevention of tick-borne diseases. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 323–343, 2008.

RAND, K. N.; MOORE, T.; SRISKANTHA, A.; SPRING, K.; TELLAM, R.; WILLADSEN, P.; COBON, G. S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 86, n. 24, p. 9657-9661, Dec. 1989.

REY, L. **Parassitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RICHARDS, C. M.; AMAN, A. T.; HIRST, T. R.; HILL, T. J.; WILLIAMS, N. A. Protective mucosal immunity to ocular herpes simplex virus type 1 infection in mice by using *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit as an adjuvant. **Journal of Virology**, v. 75, n. 4, p. 1664-1671, Feb. 2001.

ROBERTS, J. A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). I. Development of ticks on *Bos taurus*. **Journal of Parasitology**, v. 54, n. 4, p. 663-666, Aug. 1968.

RODRÍGUEZ, M.; RUBIERA, R.; PENICHER, M.; MONTESINOS, R.; CREMATA, J.; FALCÓN, V.; SÁNCHEZ, G.; BRINGAS, R.; CORDOVÉS, C.; VALDÉS, M.; LLEONART, R.; HERRERA, L.; DE LA FUENTE, J. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal of Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 135-146, Mar. 1994.

RODRÍGUEZ-VALLE, M.; TAOUFIK, A.; VALDÉS, M.; MONTERO, C.; IBRAHIN, H.; HASSAN, S. M.; JONGEJAN, F.; DE LA FUENTE, J. Efficacy of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 against *Hyalomma dromedarii* and *Amblyomma cajennense* tick infestations in camels and cattle. **Vaccine**, v. 30, n. 23, p. 3453-3458, May 2012.

RODRIGUEZ-VALLE, M.; MOOLHUIJZEN, P.; PIPER, E. K.; WEISS, O.; VANCE, M.; BELLGARD, M.; LEW-TABOR, A. *Rhipicephalus microplus* lipocalins (LRMs): Genomic identification and analysis of the bovine immune response using *in silico* predicted B and T cell epitopes. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 9, p. 739-752, Aug. 2013.

SHARAV, T.; WIESMULLER, K. H.; WALDEN, P. Mimotope vaccines for cancer immunotherapy. **Vaccine**, v. 25, n. 16, p. 3032-3027, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York; 2001.

SIMMONS, C. P.; GHAEM-MAGAMI, M.; PETROVSKA, L.; LOPES, L.; CHAIN, B. M.; WILLIAMS, N. A.; DOUGAN, G. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 53, n. 3, p. 218-226, Mar. 2001.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of ticks**. 2. ed. Oxford University Press: New York, 2014.

SPRENT, J. Immunological memory. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, p.371-379, 1997.

STILLS, H. F. Jr.; BAILEY, M. Q. The use of Freund's complete adjuvant. **Laboratory Animals**, v. 20, p. 25-30, 1991.

STILLS, H. F. Jr. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **Journal Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 46, n. 3, p. 280-293, 2005.

SUTHERST, R. W.; BOURNE, A. S. Modelling non-equilibrium distributions of invasive species: a tale of two modeling paradigms. **Biological Invasions**, v. 11, n. 6, p. 1231-1237, 2009.

SUTHERST, R. W.; JONES, R. J.; SCHNITZERLING, H. J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, v. 295, p. 320-321, 1982.

TABOR, A. E.; ALI, A.; REHMAN, G.; ROCHA GARCIA, G.; ZANGIROLAMO, A. F.; MALARDO, T.; JONSSON, N. N. Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*-Host Interface: A Review of Resistant and Susceptible Host Responses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 506, Dec. 2017

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TEODORO, R. L.; MARTINEZ, M. L.; SILVA, M. V. G. B.; MACHADO, M. A.; VERNEQUE, R. D. S. Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: experiência brasileira. In: V SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 2004. **Anais...** Pirassununga, SP, 2004.

TREE BIO. **FigTree** (online). London; 2016. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>. Acesso em: 15 out. 2018.

ULMER, J. B.; VALLEY, U.; RAPPUOLI, R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions. **Nature Biotechnology**, n. 24, p. 1377–1383, 2006.

VALTULINI, S.; MACCHI, C.; BALLANTI, P.; CHEREL, Y.; LAVAL, A.; THEAKER, J. M.; BAK, M.; FERRETTI, E.; MORVAN, H. Aluminium hydroxide-induced granulomas in pigs. **Vaccine**, v. 23, n. 30, p.3999-4004, June 2005.

VARGAS, M.; MONTERO, C.; SÁNCHEZ, D.; PÉREZ, D.; VALDÉS, M.; ALFONSO, A.; JOGLAR, M.; MACHADO, H. RODRÍGUEZ, E.; MÉNDEZ, L.; LLEONART, R.; SUÁREZ, M.; FERNÁNDEZ, E.; ESTRADA, M. P.; RODRÍGUEZ-MALLÓN, A.; FARNÓS, O. Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavac^{plus} vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. **BMC Veterinary Research**, v. 6, p. 43, Sept. 2010.

VERMEULEN, N. M. J.; VILJOEN, G. J.; BEZUIDENHOUT, J. D.; VISSER, L.; NEITZ, A.W. H. Kinetic properties of toxic protease inhibitors isolated from tick eggs. **International Journal of Biochemistry**, v. 20, p. 621– 631, 1988.

VITA, R.; MAHAJAN, S.; OVERTON, J. A.; DHANDA, S. K.; MARTINI, S.; CANTRELL, Jr.; WHEELER, D. K. SETTE, A.; PETERS, B. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 1, p. 339-343, Oct. 2018.

XU-AMANO, J.; KIYONO, H.; JACKSON, R. J.; STAATS, H. F.; FUJIHASHI, K.; BURROWS, P. D.; ELSON, C. O.; PILLAI, S.; MCGHEE, Jr. Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 178, n. 4, p. 1309-1320, Oct. 1993.

- WIKEL, S. K.; RAMACHANDRA, R. N.; BERGMAN, D. K. Tick-induced modulation of the host immune response. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 59-66, Feb. 1994.
- WIKEL, S. K. Host immunity to ticks. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 1-22, 1996.
- WIKEL, S. K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 6, p. 851-859, June 1999.
- WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, v. 129, p. 367-387, 2004.
- WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G. S.; HUNGERFORD, J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 110, n. 1, p. 43-50, 1995.
- WILLADSEN, P.; RIDING, G. A.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H.; TELLAM, R. L.; NIELSEN, J. N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G. S.; GOUGH, J. M. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, v. 143, n. 4, p. 1346-1351, Aug. 1989.
- WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. **Parasitology Today**, v. 15, n. 7, p. 258-262, 1999.
- WILLADSEN, P.; MCKENNA, R. V.; RINDING, G. A. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. **International Journal for Parasitology**, v. 18, n. 2, p. 183-189, 1988.
- WILLADSEN, P.; RINDING G. A. Characterization of a Proteolytic-Enzyme Inhibitor with Allergenic Activity. Multiple functions of a parasite-derived protein. **The Biochemical Journal**, v. 177, p. 41-47, 1979.
- WILLADSEN, P.; RINDING G. A. On the biological role of a proteolytic-enzyme inhibitor from the ectoparasitic tick *Boophilus microplus*. **The Biochemical journal**, v. 189, n. 2, p. 295-303, 1980.
- WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. Vaccination with "concealed" antigens for tick control. **Parasitology Today**, v. 4, n. 7, p. 196-198, 1988.
- WILSON, A. D.; ROBINSON, A.; IRONS, L.; STOKES, C. R. Adjuvant action of cholera toxin and pertussis toxin in the induction of IgA antibody response to orally administered antigen. **Vaccine**, v. 11, n. 2, p. 113-118, 1993.
- WOLF, R. W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L.; BRAGA, I. A.; COSTA, Jdos. S.; MARTINS, T. F.; MARCILI, A.; PACHECO, R de. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novel Babesia and Hepatozoon agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 449-456, Apr. 2016.

ANEXO



Pelotas, 16 de novembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)

Para: Dr. Rodrigo Casquero Cunha

Biotechnology – Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Senhor Pesquisador:

A CEEA analisou a solicitação o projeto intitulado: **“Vacinas recombinantes contra o carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*”**, processo nº23110.004889/2015-47, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Orientamos que o mesmo seja submetido à análise por um Comitê de Ética Humano, para aprovação do questionário que consta no projeto

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4889-2015).

Vigência do Projeto: 17/11/2015 a 30/08/2019

Espécie/Linhagem: *Mus musculus*/BALB/c e *Bos taurus*/Holandês

Nº de animais: 98 camundongos e 30 bovinos

Idade: 28 dias (camundongos) e 6-12 meses (bovinos)

Sexo: Fêmeas

Origem: Biotério Central-UFPel (camundongos) e Fazenda da região de Pelotas/RS

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2015

Assinatura do Professor Responsável: _____