

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CD Tec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Clonagem e análise da expressão de cistatinas do carrapato *Ixodes persulcatus*.

Gabriela Alves Sabadin

Pelotas, 2013

GABRIELA ALVES SABADIN

Clonagem e análise da expressão de cistatinas do carrapato *Ixodes persulcatus*.

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador do Estágio: Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Fabrício Rochedo Conceição

Pelotas, Janeiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Leite

Prof. Dr. Geferson Fischer

Dr. Marcelo Mendonça

Prof. Dr. Fabrício Conceição (orientador)

Agradecimentos

Aos meus pais, Rejane e Ítalo e a minha irmã Alexandra, pelo amor e pelo apoio incondicional;

Aos meus dindos tia M^a Luísa e Sérgio, e meus primos Morgana e Maurício, por me acolherem em todos os momentos que precisei;

Aos colegas dos laboratórios, pelos ensinamentos e pelos bons momentos de convivência e confraternização, especialmente ao Rodrigo e ao Luís, pela paciência e dedicação ao me guiarem nos meus primeiros passos;

Aos colegas de graduação, pelos momentos inesquecíveis, especialmente a Karina, ao Wallace e a Francine, por estarem comigo nos momentos mais felizes de que tenho lembrança;

Ao meu orientador, Prof. Fabrício, pela oportunidade de estágio no início da graduação e por todos os ensinamentos;

Ao meu orientador de estagio, Prof. Itabajara, por me receber em seu laboratório de braços abertos, pela dedicação e por estar sempre presente quando precisei;

À Universidade Federal de Pelotas e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTec, pela oportunidade de realizar o curso de graduação;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao CBiot, pela oportunidade de realizar o estágio final da graduação.

“A mente que se abre para uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Resumo

SABADIN, Gabriela. **Clonagem e análise da expressão de cistatinas do carrapato *Ixodes persulcatus***. 2012. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Este trabalho relata as atividades desenvolvidas para a disciplina de Estágio Supervisionado de Conclusão de Curso, do curso de graduação em Biotecnologia da UFPel. O estágio final foi realizado no laboratório de Imunologia aplicada à sanidade animal, integrado ao Centro de Biotecnologia (CBiot) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de agosto de 2012 até dezembro de 2012. Este laboratório possui como linha de pesquisa a identificação de antígenos com potencial para o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra carrapatos de importância na pecuária, uma vez que as infestações por esses parasitas causam grandes prejuízos e os acaricidas utilizados como métodos de controle atual causam problemas ambientais e provocam a seleção de carrapatos resistentes. O objetivo geral deste trabalho foi a produção heteróloga de cistatinas do carrapato xxx. A principal atividade desenvolvida foi a clonagem da região codificante das cistatinas JPIpcys2b e JPIpcys2c em vetor de expressão pET5a e posteriores testes de expressão para obtenção das proteínas de forma recombinante. Além das atividades experimentais, houve discussões semanais de artigos com o grupo e participação em seminários desenvolvidos pelo Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Palavras chave: Carrapato, Cistatina, vacina recombinante.

Abstract

SABADIN, Gabriela. **Molecular cloning and expression analysis of cistatins from *Ixodes persulcatus* tick** 2012. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

This work reports the activities for the discipline supervised for the completion of undergraduate degree in Biotechnology UFPel. The final stage was conducted in “Laboratory of Applied Immunology for Animal Health” situated in the Center of Biotechnology (CBiot), Federal University of Rio Grande do Sul, in the period from August 2012 to December 2012. This laboratory works for identification of antigens with potential for development of a recombinant anti-tick vaccine. Infestations these parasites cause massive damage and acaricides used in current control methods cause environmental problems, and select acaricide-resistant ticks. The aim of this work was to produce heterologous tick cystatin. The main activity was the cloning of cystatin JPIpcys2b and JPIpcys2c in expression vector pET5a and subsequent testing to obtain the recombinant protein. Besides the experimental activities, there were weekly discussions of articles in the laboratory (group seminars) and participation in seminars developed by the Center of Biotechnology at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Keywords: Tick, Cystatin, recombinant vaccine.

Lista de Figuras

Figura 1 – Alinhamento de todas as cistatinas de carrapatos conhecidas	9
Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos clones de cistatinas amplificados por PCR e clivados.....	12
Figura 3 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das cistatinas de <i>Rhipicephalus microplus</i> , <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> , <i>Ixodes ovatus</i> e <i>Ixodes persulcatus</i>	13
Figura 4 – Comparação das sequências de aminoácidos deduzidos entre as cistatinas	14
Figura 5 – Mapa do vetor pET5a.....	20
Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de pET5a.....	21
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos possíveis clones Pet5a/JPIpcys2c e Pet5a/ JPIpcys2b clivados com BamHI e NdeI.....	22
Figura 8 – PCR dos prováveis clones Pet5a/JPIpcys2c e Pet5a/JPIpcys2b.....	23
Figura 9 – Alinhamento entre as sequências da cistatina JPIpcys2b utilizando a ferramenta ClustalW.....	24
Figura 10 – Alinhamento entre as sequências da cistatina JPIpcys2c utilizando a ferramenta ClustalW.....	25
Figura 11 – Sequenciamento do inserto do clone Pet5a/JPIpcys2b	26
Figura 12 – Sequenciamento do inserto do clone Pet5a/JPIpcys2c.....	26
Figura 13 – Wester Blot das proteínas totais de <i>E.coli</i> XL1 BLUE (DE3) C41 transformada com pET5a/JPIpcys2b e pET5a/JPIpcys2c.....	26
Figura 14 – Wester Blot das proteínas totais de <i>E.coli</i> XL1 BLUE (DE3) C43 transformada com pET5a/JPIpcys2b e pET5a/JPIpcys2c.....	27
Figura 15 – Wester Blot das proteínas totais de <i>E.coli</i> XL1 BLUE SI, pLysS, Star, C41, PTTRX, DE3, pLysE e RIL transformadas com pET5a/JPIpcys2b com 6h de indução com IPTG.....	27

Lista de Tabelas

Tabela 1 – <i>Primers</i> iniciadores utilizados na amplificação por PCR.....	16
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

BICIP – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfatase

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade Óptica

Gln – Glutamina

Gly – Glicina

LB – Luria-Bertani

NBT– *nitro-blue tetrazolium*

ORF – *open reading frame*

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase após retrotranscrição

Val – Valina

VTDCe– *accine potential of a tick vitellin-degrading enzyme*

1. Sumário	
2. Introdução	23
2.1 Experimento	23
3. Revisão bibliográfica	24
3.1 O carrapato.....	24
3.2 Acaricidas e vacinas como métodos de controle	27
3.3 Cistatinas.....	28
4. Resultados anteriores	32
4.1 Clonagem das regiões codificantes de cistatinas dos carrapatos <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> , <i>Ixodes persulcatus</i> e <i>Ixodes ovatus</i> no vetor pGEM	32
5. Objetivos	36
5.1 Objetivo geral.....	36
5.2 Objetivos específicos.....	36
6. Metodologia.....	36
6.1 Preparação do vetor pET5a.....	36
6.2 Digestão, purificação e desfosforilação do vetor pET5a.....	36
6.3 Projeto dos <i>primers</i> para clonagem no vetor pET5a, amplificação, digestão e purificação das cistatinas QNRacys2a de <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> (Ra) JPIpcys2a, JPIpcys2c, JPIpcys2b de <i>Ixodes persulcatus</i> (Ip) e JPlocys2a de <i>Ixodes ovatus</i> (Io).	37
6.4 Clonagem das sequências de cistatina no vetor pET5a	39
6.5 Transformação de <i>Escherichia coli</i> XL1 BLUE	39
6.6 Seleção dos plasmídeos recombinantes	39
6.7 Extração dos vetores recombinantes.....	40
6.8 Testes de expressão	40
6.9 Análise dos testes de expressão	41
7. Resultados	41
7.1 Preparação do vetor pET5a.....	41
7.2 Amplificação de QNRacys2a JPIpcys2a, JPIpcys2c, JPIpcys2be JPlocys2a e clonagem de JPIpcys2ce JPIpcys2bno vetor pET5a.....	43
7.3 Confirmação dos clones Pet5a/JPIpcys2c e Pet5a/JPIpcys2b recombinantes.....	43
7.4 Análise da expressão	48

8. Conclusões e perspectivas	50
9. Referências	51

2. Introdução

O presente trabalho descreve as atividades destinadas à disciplina de Estágio Supervisionado de Conclusão, da graduação em Biotecnologia (Bacharelado) pela Universidade Federal de Pelotas. O estágio teve início em agosto de 2012 e foi desenvolvido no laboratório de Imunologia aplicada à sanidade animal, integrado ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal Do Rio Grande do Sul, localizada na cidade de Porto Alegre.

O laboratório tem como principal linha de pesquisa a identificação de proteínas antigênicas do carrapato com potencial vacinal. Em relação às atividades de ensino, participei de discussões semanais de artigos científicos com o grupo e seminários promovidos pelo Centro de Biotecnologia com professores de outras universidades.

2.1 Experimento

Durante o estágio, a principal atividade desenvolvida foi a clonagem das regiões codificantes de cistatina de carrapato e posteriores testes de expressão em sistema heterólogo. O objetivo deste trabalho foi obter o antígeno recombinante a fim de utilizá-lo em futuras análises relacionadas a sua caracterização e seu potencial imunoprotetor.

Os carrapatos são os maiores artrópodes vetores transmissores de patógenos e estão entre os mais importantes transmissores de doenças em bovinos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004), afetando cerca de 80% da população de gado do mundo, principalmente na região subtropical. O custo global anual causado pelo carrapato é estimado entre US\$ 13,9 e US\$ 18,7 bilhões (DE CASTRO et al,1997).

A espécie *Ixodes persulcatus* causa maior impacto na região Europa e Ásia e devido a sua grande variedade de hospedeiros ele é um importante vetor de diversos patógenos. (JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Os carrapatos da espécie *Ixodes ovatus* estão entre os principais transmissores da Erliquiose prevalentemente na região oriental (SHIBATA et al, 2000 e FUJITA e WATANABE, 1994), enquanto que a espécie *Rhipicephalus appendiculatus* acomete uma grande variedade de ruminantes domésticos e selvagens no leste e sul da África (JONGEJAN;

UILENBERG, 2004). Essas espécies de carrapatos foram escolhidas para este trabalho, devido ao impacto que causam na pecuária de corte e leite e às consequentes perdas econômicas.

Atualmente, o controle do carrapato é baseado principalmente em pesticidas e agentes químicos de ação direta (OSTFELD et al, 2006). Entretanto, os problemas no controle através desses métodos são a seleção de carrapatos resistentes e a contaminação do ambiente, dos animais de produção e de seus produtos derivados (DE LA FUENTE et al., 2006). O desenvolvimento de um novo produto para controle de carrapatos é um processo demorado e economicamente desfavorável. Graf et al. (2004) estimam um custo de US\$ 100 milhões para a descoberta e desenvolvimento de um novo produto.

Existem muitos aspectos envolvidos na interação parasito-hospedeiro durante a alimentação do carrapato (WILLADSEN, 2001). Enquanto estão aderidos ao hospedeiro, os carrapatos secretam através da saliva, moléculas que modulam os componentes da resposta imune humoral e celular do hospedeiro, facilitando também a transmissão de patógenos. Apesar do efeito supressor e imunomodulador da saliva do carrapato, algumas moléculas são reconhecidas, resultando em resposta imune humoral e geração de anticorpos (BIOSCI, 2009). A produção de anticorpos contra proteínas do carrapato possibilita a utilização de vacinas como uma nova perspectiva em relação ao controle desse parasita. O desenvolvimento de vacinas para o controle do carrapato tem sido proposto como uma alternativa promissora frente aos métodos de controle atuais (MILLER et al., 2012). A vacina como uma tecnologia comercialmente disponível é baseada na forma recombinante da proteína intestinal Bm86 de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (WILLADSON, 2008) Devido ao grande potencial das vacinas para controlar infestações, outras proteínas de importância na alimentação do carrapato vêm sendo estudadas como antígenos vacinais (PARIZI, et al., 2012)

As cistatinas compreendem uma superfamília de proteínas evolutivamente relacionadas e atuam como inibidores competitivos e reversíveis de proteinases cisteínicas, atuando em diversos processos biológicos (SCHWARZ, et al., 2012) Sequências que codificam cistatinas foram encontradas no transcriptoma de glândulas salivares (sialoma) de várias espécies de carrapatos (VALENZUELA et al.,

2002) e (RIBEIRO et al., 2006). O silenciamento de um gene de cistatina em *Amblyomma americanum* por RNA interference reduziu significativamente a capacidade de alimentação do carrapato (KARIM et al., 2005). As cistatinas salivares Sialostatina L e Sialostatina L2 de *Ixodes scaluiparis* foram caracterizadas funcionalmente e atuam como inibidoras da inflamação e supressoras a resposta imune (KOTSYFAKIS et al., 2007), (KOTSYFAKIS et al., 2006) e (SA-NUNES et al., 2009). Kotsyfakis et al. (2007) relataram uma importante interferência da Sialostatina L sobre a maturação de células dendríticas, enquanto a vacinação de cobaias com Sialostatina L2 diminuiu a capacidade de alimentação dos parasitas (KOTSYFAKIS et al., 2008)

Visto que as cistatinas representam um alvo interessante como antígeno vacinal, o objetivo do presente trabalho é a clonagem e expressão de cistatinas de carrapato. Deste modo, através da obtenção dos antígenos recombinantes, será possível caracterizá-los, a fim de determinar suas atividades biológicas e utilizá-los para imunização, com o intuito de testar sua capacidade de proteção e proteção cruzada contra/entre diferentes espécies de carrapato.

3. Revisão bibliográfica

3.1 O carrapato

Os carrapatos são artrópodes que se alimentam exclusivamente de sangue de vertebrados, linfa, ou tecidos digeridos. Compreendem 889 espécies conhecidas. Destas, 702 pertencem à família “Ixodidae” (carrapatos duros), 186 à família Argasidae (carrapatos moles) e um à família Nuttalliellidae (NIJHOF et al, 2011). Os carrapatos estão entre os maiores vetores de agentes patogênicos no mundo (PETER et al, 2005). Em 1893, Smith e Kilborne descobriram que durante a alimentação, o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* era responsável pela transmissão do parasita e protozoário *Babesia bigemin*, aumentando ainda mais a relevância do carrapato para a saúde humana e animal. Esta descoberta fundamentou a ideia de que os carrapatos não são apenas ectoparasitas que podem danificar a pele, mas que são transmissores de patógenos e causadores de doenças.

As doenças transmitidas por carrapatos representam uma grande limitação da produção pecuária e tem um impacto econômico considerável para as populações rurais, afetando não só na sua oferta de alimentos, mas também na sua renda diária e em outras atividades agrícolas. Quatro grupos de doenças transmitidas por carrapatos estão entre as de maior relevância para a produção pecuária: teileriose, babesiose, anaplasmose e pericardite (DANTAS-TORRES et al., 2012). Apesar dos carrapatos possuírem um histórico de transmissão de determinados patógenos bem descrito na literatura, estudos mais aprofundados têm demonstrado a detecção de novos micro-organismos patogênicos em algumas espécies de carrapatos e seu potencial como vetor para novos agentes (DUH et al., 2010; HORNOK et al., 2010; KAEWMONGKOL et al., 2011; PACHECO et al., 2007, 2011).

A alimentação do parasita é essencial para sua sobrevivência, crescimento, progressão na fase de desenvolvimento e reprodução, envolvendo uma série complexa de eventos comportamentais. Através da alimentação, o carrapato pode adquirir um micro-organismo patogênico de um hospedeiro infectado e, posteriormente, transmitir o patógeno para outro hospedeiro. A duração do tempo em que cada espécie permanece ligada ao hospedeiro é variável, mas a maioria delas fica durante dias alimentando-se do sangue do animal (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008). Essa é uma das principais razões que aumenta a eficiência do carrapato como vetor (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

O ciclo de vida dos carrapatos duros é classificado de acordo com o número de hospedeiros necessários para ele completar os três estágios do ciclo. Deste modo, cada espécie pode completar seu ciclo em um, dois ou três hospedeiros. Os carrapatos Ixodidae possuem três estágios de desenvolvimento: larva, ninfa e adulto. A cada mudança de estágio, o carrapato abandona o hospedeiro, realiza a mudança de estágio no ambiente, e volta a se fixar no hospedeiro. A maioria das espécies, como por exemplo, *Dermacentor variabilis*, *Ixodes ricinus* e *Ixodes scapularis* necessitam de três hospedeiros para completar seu ciclo. Em geral, os carrapatos permanecem vinculados ao animal somente durante a fase de alimentação (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008). A maioria dos carrapatos possui um hospedeiro preferencial. A espécie *Ixodes texanus*, por exemplo, alimenta-se quase exclusivamente de guaxinins, o *Rhipicephalus*

microplus, prefere o gado ou outros ungulados. No entanto, espécies como *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* possuem mais de 100 hospedeiros, e outras como *Ixodes ricinus* e *Ixodes persulcatus* alimentam-se em mais de 200 diferentes animais (ANDERSON, J.F, 1989; ANDERSON, MAGNARELLI, 1993). A grande diversidade de animais que servem como hospedeiro para essas espécies pode estar relacionada com o aumento da transmissão de parasitas, uma vez que a maioria dos carrapatos necessita de mais de um hospedeiro para completar seu ciclo de vida.

Durante a evolução, os carrapatos desenvolveram diversos mecanismos para escapar da resposta imune do hospedeiro. As secreções salivares do carrapato, depositadas durante a alimentação, contém moléculas vasodilatadoras, anti-inflamatórias, anti-hemostáticas e imunomoduladoras (DÉRUAZ et al., 2008; KOTSYFAKIS et al., 2006). Trabalhos demonstram que componentes da saliva podem inibir inúmeras funções do sistema imune, incluindo a resposta imune inata e a inflamação cutânea (KERN et al., 2011), a ativação do complemento (SCHUIJT, T.J. et al., 2011), a produção de citocinas pró-inflamatórias (RAMACHANDRA; WIKEL, 1992), a actividade das células NK, A actividade de células dendríticas (KOPECKÝ; KUTHEJLOVÁ, 1998), A actividade de Células TCD4 (JUNCADELLA; ANGUITA, 2009), e a atuação de alarminas (*alarmins*) (SCHRAMM et al., 2011).

O efeito imunossupressor da saliva tem uma função importante para a alimentação adequada do carrapato, uma vez que reduz a atividade do sistema imune do hospedeiro sobre o parasita. Entretanto, os patógenos transmitidos por carrapatos também são beneficiados por desse mecanismo, pois aumenta a sua patogenicidade e facilita a infecção no organismo do animal (SCHUIJT et al., 2011; HORKÁ et al., 2009). Apesar de existirem diversas moléculas imunossupressoras na saliva do carrapato, muitos trabalhos têm mostrado a produção de anticorpos do hospedeiro contra proteínas do parasita (CUNHA et al., 2012; PARIZI et al., 2012; GALAÏ et al., 2012; JEYABAL et al., 2012), ampliando as perspectivas relacionadas a uma vacina eficaz contra infestações.

3.2 Acaricidas e vacinas como métodos de controle

A redução de carrapatos em campos de criação de gado ainda é o método mais eficaz para prevenir as doenças transmitidas por carrapatos (OSTFELD et al., 2006). A principal medida utilizada para controlar infestações por esses parasitas é a aplicação de acaricidas químicos no ambiente em que eles procuram seus hospedeiros. Os acaricidas utilizados normalmente são letais e algumas aplicações no campo geralmente são eficazes para a redução do número de carrapatos (STAFFORD; KITRON, 2002). Os acaricidas organofosforados, carbamatos e piretróides são relativamente baratos e reduzem de maneira eficaz a quantidade de carrapatos em ambientes infestados (SCHULZE et al. 1991, 2001). O Carbaril (um carbamato) e o clorpirifo (um organofosforado) são alguns dos acaricidas mais utilizados para o controle de carrapatos (STAFFORD; KITRON, 2002), porém alguns produtos que continham esses compostos foram proibidos devido sua alta toxicidade para os vertebrados (SCHULZE et al. 2001). Além disso, todos os acaricidas comerciais são letais para a maioria dos invertebrados, causando a diminuição da população de insetos importantes para o ambiente como os polinizadores e os predadores de artrópodes (SCHAUBER et al., 1997). Apesar de existirem efeitos indesejáveis dos acaricidas químicos sobre os demais invertebrados, eles geralmente não são considerados em ensaios para avaliação da eficiência do produto a campo (OSTFELD et al.,2006). Finalmente, a aplicação frequente de acaricidas a campo causa a seleção de carrapatos resistentes (SACHIN et al. 2011).

Mais recentemente foram descritos antígenos que induzem proteção imunológica de hospedeiros vertebrados contra infestações de carrapatos. A viabilidade de controlar esse parasita através de imunização de hospedeiros com antígenos selecionados de carrapatos foi demonstrada com o desenvolvimento de vacinas que reduziram infestações de bovinos por *Rhipicephalus*. (DE LA FUENTE et al., 2003; WILLADSEN et al., 2006). Em relação aos acaricidas, o controle de carrapatos por vacinação tem as vantagens de não contaminar o ambiente e nem provocar a seleção de resistentes a drogas. Além disso, as vacinas desenvolvidas podem conter múltiplos antígenos e, dessa maneira, prevenir a infestação por mais de uma espécie de carrapato. Mesmo que uma vacina seja constituída por apenas um antígeno, é possível que ele induza a atuação do sistema imune para outros

antígenos similares, promovendo, assim, a proteção cruzada para diferentes espécies carrapatos.

A descoberta de antígenos protetores, juntamente com formulações de vacinas adequadas e a avaliação de testes a campo são os principais componentes necessários para o desenvolvimento de vacinas contra carrapatos (DE LA FUENTE et al., 2006). Nesse sentido, alguns antígenos foram testados na forma de proteínas recombinantes em vacinas contra infestações por carrapato (WILLADSEN et al., 1996; ANDREOTTI et al., 2002; TRIMNELL et al., 1999; WANG; NUTTALL, 1999; IMAMURA et al., 2005; ALMAZÁN et al., 2005; WEISS; KAUFMAN, 2004). Apesar dos resultados positivos alcançados na maioria dos desafios, as únicas vacinas comercialmente disponíveis contra carrapatos contém o antígeno Bm86 do intestino de *Rhipicephalus microplus*. Estas vacinas reduziram o número de fêmeas ingurgitadas, o seu peso e sua capacidade reprodutiva. Assim, o maior efeito da vacina foi a redução da infestação larval em gerações subsequentes (WILLADSEN et al. 1989; RAND et al., 1989; RODRIGUEZ et al., 1994; DE LA FUENTE; KOCAN 2003; DE LA FUENTE et al., 2007). Aplicações bem sucedidas de vacina baseada no antígeno Bm86 para controlar infestações por *Rhipicephalus microplus* foram relatadas na Austrália, no Brasil, em Cuba, e em outros países da América Latina (DE LA FUENTE et al., 2007; DE LA FUENTE; KOCAN 2003). Além disso, ensaios utilizando o antígeno vacinal Bm86 mostraram sua eficácia contra diferentes isolados de *Rhipicephalus microplus* (PENICHET et al., 1994; DE LA FUENTE et al., 1995; FRAGOSO; HOSHMAND 1998; DE VOS et al., 2001) e contra outras espécies de carrapatos (de Vos, S. et al. 2001; Perez-Perez, D. et al. 2010)

3.3 Cistatinas

As cistatinas são inibidores reversíveis de cisteíno-proteases e compreendem uma superfamília de proteínas evolutivamente relacionadas. As proteases do tipo papaína e as catepsinas B, H e L de mamíferos são as principais proteases inibidas por cistatinas. (TURK et al., 1991). Estes inibidores estão presentes em uma grande variedade de organismos como vertebrados, invertebrados, plantas e protozoários (VRAY et al., 2002; TURK; BODE, 1998; TURK; STOKA, 2008).

As cistatinas participam de reações importantes para o bom funcionamento do metabolismo celular, pois regulam a atividade das proteases, protegendo a célula de proteólises inadequadas e controlando a degradação de proteínas intracelulares ou extracelulares (TURK et al., 1991). Elas também estão envolvidas em diversos processos biológicos em vertebrados, incluindo a apresentação de antígenos, o desenvolvimento do sistema imune, a homeostase da epiderme, a quimiotaxia de neutrófilos durante a inflamação e a apoptose (REDDY et al., 1995; HONEY, 2003; WILLE et al., 2004; LOMBARDI et al., 2005). Todas as cistatinas têm ação inibitória e modulatória na atividade das proteinases, mas cada cistatina possui ação específica de fundamental importância em diversos fluidos biológicos (UHLMANN et al., 2001).

A atividade inibitória das cistatinas é atribuída principalmente a três regiões de interação com as cisteíno-proteases: (i) Um ou dois resíduos de Gly perto da região amino-terminal; (ii) Região central conservada do sítio ativo Gln-X-Val-X-Gly (QXVXG); (iii) Um resíduo de triptofano (W) na segunda alça (β -hairpin loop 2) perto da região carboxi-terminal, com a possibilidade de que outras regiões contribuam com a atividade (HABIB; FAZILI, 2007).

As cistatinas são classificadas em três famílias de acordo com a homologia das sequências, a presença ou ausência de pontes de dissulfureto e a localização fisiológica (SCHWARZ et al., 2012). A primeira família das cistatinas, as do tipo 1, ou Stefins, são proteínas intracelulares de baixo peso molecular (aproximadamente 11 kDa), sem peptídeo sinal, sem cadeias laterais de carboidratos e sem pontes dissulfureto. Nas cistatinas do tipo 1, o motivo conservado QXVXG, juntamente com o resíduo de Gly da região amino-terminal e duas alças (β -hairpin loops 1 e 2) formam uma estrutura que interage com a fenda catalítica das cisteíno-proteases (GRZONKA et al., 2001) (Figura 1). As cistatinas tipo 2, da segunda família, possuem uma massa molecular próxima a 15 kDa, contêm peptídeo sinal e pontes dissulfureto na região carboxi terminal da molécula e geralmente não possuem glicosilação (DICKINSON, 2002). Contêm o domínio da Gly amino-terminal conservado e o segmento QXVXG na alça 1. (Figura 1). Diferentemente das cistatinas do tipo 1, essas possuem um dipeptídeo PW conservado na alça 2 (Figura 1). Na cistatina C, uma cistatina do tipo 2, o domínio conservado SND, situado entre a glicina da região amino-terminal e a alça 1, é

essencial para sua atividade inibitória (TURK; BODE, 1998; ZAVASNIK-BERGANT, 2008) (Figura 1). normalmente 8 pontes dissulfeto (OHKUBO et al., 1984; MÜLLER-ESTERL et al., 1985). Em eucariotos, estão envolvidas na inibição da atividade de proteicas que extravasam do lisossomo e de proteínas derivadas de micro-organismos, além de coordenar imunidade adaptativa (SCHARFSTEIN et al., 2007).

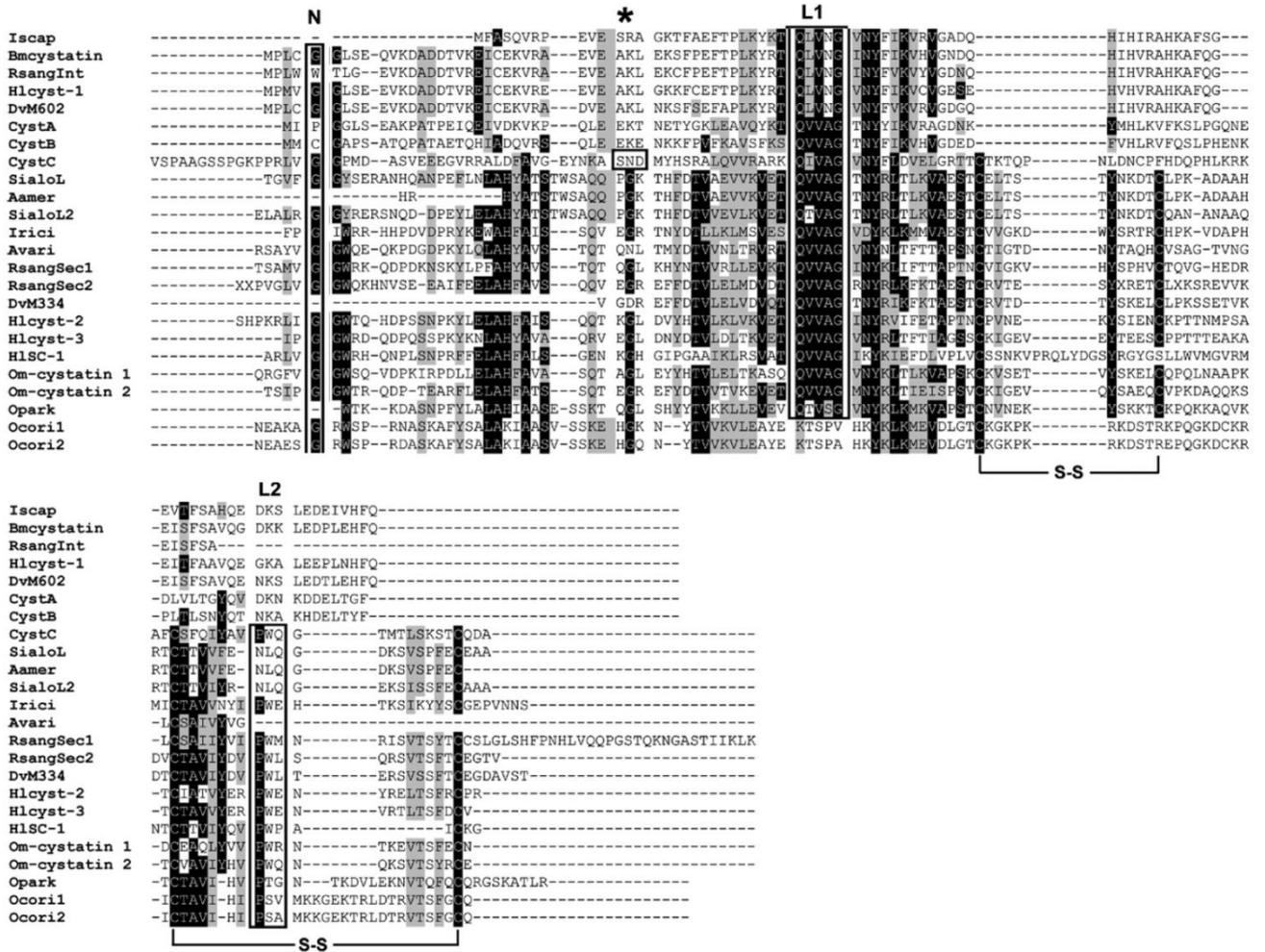


Figura 1 – Alinhamento de todas as cistatinas de carrapatos conhecidas. Todos os tipos 1 e 2 cistatinas de carrapato da literatura foram alinhadas utilizando o programa ClustalW. As cistatinas apresentadas não possuem peptídeo sinal. A glicina N-terminal (sinalizada com um N na parte superior do alinhamento), o segmento QXVXG (representado como L1 na parte superior do alinhamento), e a alça 2 com o péptido de PW, quando presentes (sinalizado com L2 a cima do alinhamento) do domínio cistatina estão destacadas pelos retângulos. As possíveis pontes dissulfureto, que são formados entre resíduos de cisteína de cistatinas secretadas (tipo 2) estão marcados com (SS) na parte inferior do alinhamento motivo SND da cistatina C está destacado por um retângulo e marcado com um asterisco na parte superior do alinhamento. Os domínios de cistatina conservados e outros resíduos de aminoácidos conservados das cistatinas são realçados em preto; resíduos idênticos estão em cinza. As cistatinas do tipo 1 são apresentadas como: ISCAP: cistatina de *Ixodes scapularis* (AAY66864); Bmcystatin de *Rhipicephalus microplus* (ABG36931); RsangInt: cistatina intracelular de *Rhipicephalus sanguineus* (ACX53850); Hlcyst-1 de *Haemaphysalis longicornis* (ABZ89553); DvM602 de *Dermacentor variabilis* (ACF35512); CystA, B: Cistatina humana A (P01040) e B (P04080). As cistatinas do tipo 2 são: CystC: Cistatina humana C (P01034); sialo L, L2: Sialostatin L (AAM93646) e L2 de *Ixodes scapularis* (AAY66685); Amer: cistatina de *A. americanum*; Irici: cistatina de *Ixodes ricinus* (CAD68002); Avari: cistatina de *Amblyomma variabilis* (DAA34288); RsangSec1 (ACX53922), RsangSec2 (ACX53862): cistatinas secretadas de *Rhipicephalus sanguineus*, DvM334: cistatina de *Dermacentor variabilis* (ACF35514); Hlcyst-2 (ABC94582), Hlcyst-3 (ABZ89554), HISC-1 de *Haemaphysalis longicornis* (BAI59105); Om-cistatina 1 (AAS01021), Om-cistatina 2 de *Ornithodoros moubata* (AAS55948); Opark: cistatina de *Oreophryne parkeri* (ABR23498); Ocori 1 (ACB70345), Ocori 2 (ACB70343): cistatinas de *Oreophryne coriaceus*.

FONTE: SCHWARZ, A. et al., 2012, p.118.

As cistatinas das famílias 1 e 2 tem sido descritas em várias espécies de carrapatos como importantes proteínas para sua fisiologia e alimentação, por isso são visadas como antígenos eficientes para uma vacina contra esses parasitas (SCHWARZ et al., 2012). Karim et al. (2006) demonstraram a influente atuação das cistatinas na alimentação do carrapato através do silenciamento do gene dessa proteína em *Amblyomma americanum* utilizando RNA interference. Outro trabalho relata a atuação da cistatina Hlcyst-1 como um regulador da digestão da hemoglobina de bovinos em carrapatos da espécie *Haemaphysalis longicornis* (YAMAJI, K. et al., 2010). Lima et al. (2006) descreveram a participação da cistatina Bm (*Bmcystatin*) na embriogênese de *Rhipicephalus microplus*, uma vez que ela demonstrou uma ação inibitória sob a Cisteíno Endopeptidase Degradadora de Vitelina (VTDCE), uma proteína que está envolvida na degradação da vitelina durante a embriogênese e fase larval do carrapato. Estes estudos apontam a

importante atuação das cistatinas na alimentação e fisiologia do carrapato, aumentando as perspectivas relacionadas à utilização dessas proteínas para uma vacina eficiente.

4. Resultados anteriores

Os experimentos desenvolvidos no presente trabalho representam a continuidade de trabalhos desenvolvidos pelo estudante de doutorado Luis Fernando Parizi, por isso, os resultados gerados anteriormente por ele foram gentilmente cedidos, pois são relevantes para compreensão deste relatório.

4.1 Clonagem ddas região codificantes de cistatinas dos carrapatos *Rhipicephalus appendiculatus*, *Ixodes persulcatus* e *Ixodes ovatus* no vetor pGEM

Foram projetados oligonucleotídeos iniciadores para as regiões codificantes com alta similaridade a sequências de cistatinas de *Rhipicephalus microplus* e *Ixodes scapularis*, baseando-se nas sequências gênicas depositadas no Genbank. Para a amplificação por RT-PCR foram utilizados RNAs extraídos de partenóginas da cada uma das três espécies. Os fragmentos amplificados do tamanho previsto para as regiões codificantes de cistatinas foram purificados e clonados no vetor pGEM-T (Figura 2).

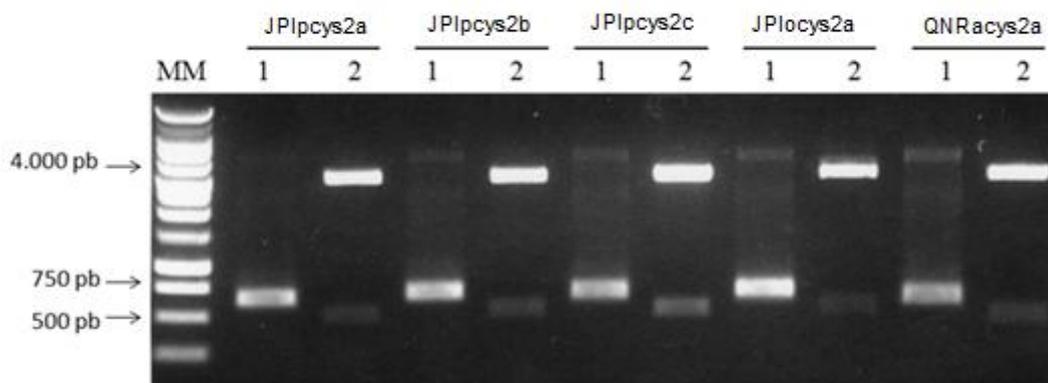


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos clones de cistatinas amplificados por PCR e clivados. MM, marcador de massa molecular; 1, amplicons da região codificante da cistatinas gerados por PCR do plasmídeo pGEM-T utilizando-se os primers T7 e SP6; 2, plasmídeos pGEM-T contendo a região codificante da cistatina clivados com a enzima de restrição *EcoR* I. A respectiva regiões codificantes de cada clone estão sublinhadas a cima da figura.

Através da análise por sequenciamento, houve a confirmação da clonagem de três regiões codificantes de cistatinas de *Ixodes persulcatus*, uma região codificante de cistatina de *Ixodes ovatus* e uma região codificante de cistatina uma de *Rhipicephalus appendiculatus*. O alinhamento dos aminoácidos deduzidos a partir da sequência das regiões codificantes das cistatinas clonadas com os seu respectivos similares. dos carrapatos *Rhipicephalus microplus* e *Ixodes persulcatus*, assim como a conservação dos domínios das sequencias das cistatinas, estão nas figuras 3 e 4.

A análise das regiões codificantes indica que essas cistatinas pertencem a família 2 das cistatinas, pois conservam os domínios responsáveis por formar o sítio de ligação com as cisteinoendopeptidases, assim como as quatro cisteínas, importantes para a correta estrutura secundária dessas proteínas e o peptideo sinal. Exceção feita a sequência do gene de cistatina JPIpcys2c de *Ixodes persulcatus*, que apresentou substituições em aminoácidos nos domínios QXVXG e PW (figura 3 e 4).

Realizou-se a análise da similaridade entre as sequências codificadoras das cistatinas clonadas resultando em valores entre 40-99% e 25-99% de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente. Essa análise revelou também que a maioria das sequencias de aminoácidos das cistatinas possuem uma similaridade entre 25-

47%.Essas regiões conservadas estão localizadas principalmente nos domínios que caracterizam as cistatinas (figura 3).

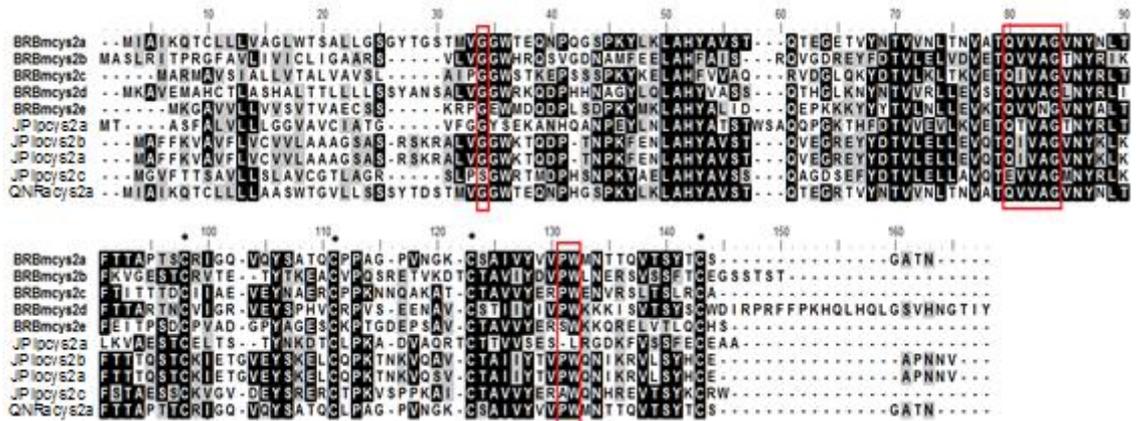


Figura 3 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidos das cistatinas de *Rhipicephalus microplus* (BRBmcys2a, BRBmcys2b, BRBmcys2c, BRBmcys2d, BRBmcys2e), *Rhipicephalus appendiculatus* (QNRacys2a), *Ixodes ovatus* (JPlocys2a) e *Ixodes persulcatus* (JPlocys2a, JPlocys2b e JPlocys2c). Os domínios que caracterizam as cistatinas estão destacados nas caixas vermelhas. Os asteriscos estão destacando as 4 cisteínas características da família 2 das cistatinas.

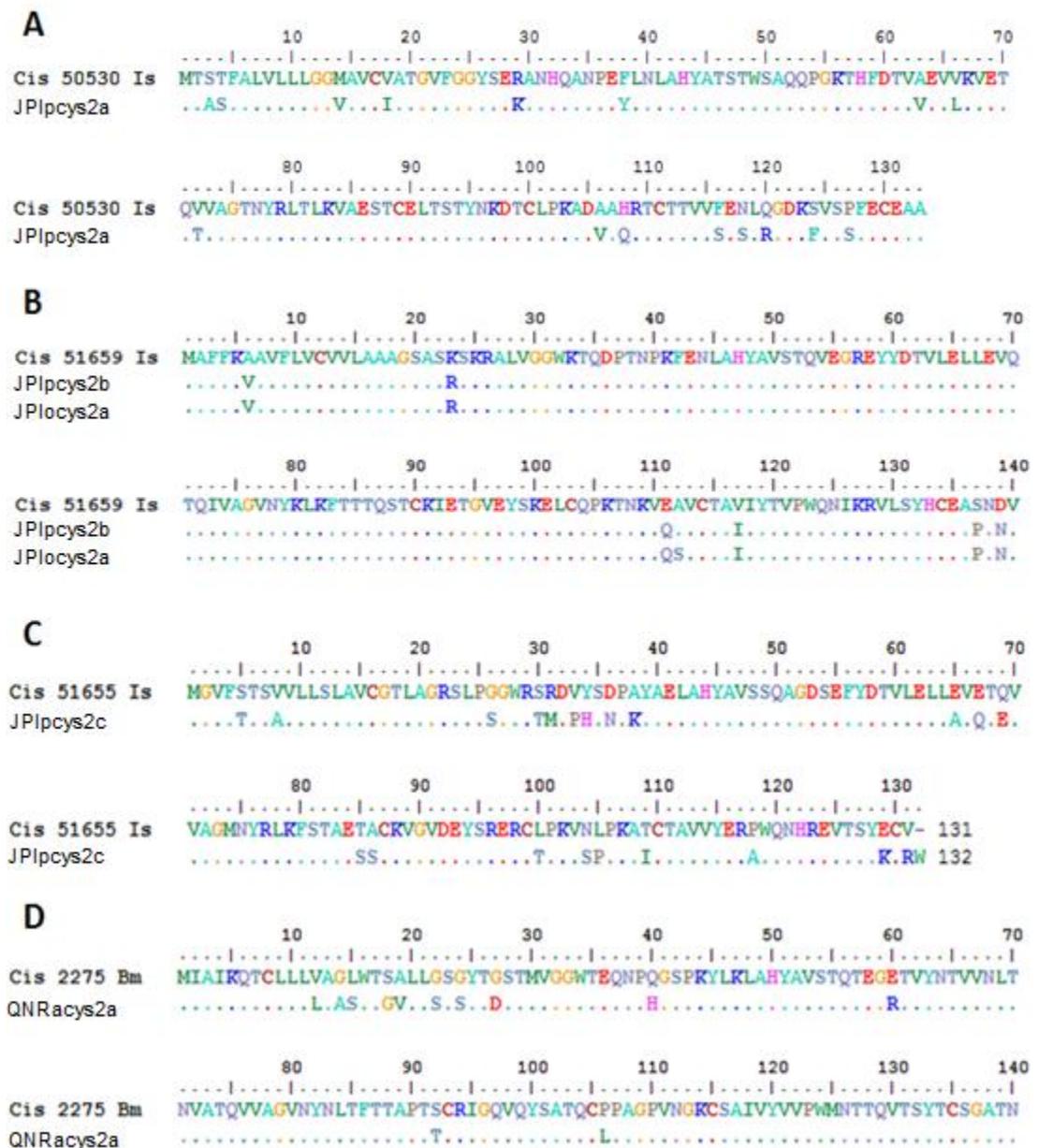


Figura 4 – Comparação das seqüências de aminoácidos deduzidos entre as cistatinas. Alinhamento dos aminoácidos correspondentes às seqüências de cistatinas clonadas dos carrapatos *Ixodes persulcatus* (A, B e C), *Ixodes ovatus* (B) e *Rhipicephalus appendiculatus* (D), alinhadas com as cistatinas dos carrapatos *Ixodes scapularis* e *Rhipicephalus microplus*. Ip, *Ixodes persulcatus*; Io, *Ixodes ovatus*; Ra, *R. appendiculatus*; Is, *Ixodes scapularis*; Bm, *Rhipicephalus microplus*.

As sequencias das cistatinas obtidas no presente trabalho indicam que elas estão agrupadas entre as demais cistatinas, não formando um grupo específico.

5. Objetivos

5.1 Objetivo geral

Produção heteróloga de cistatinas de carrapato, visando sua utilização como vacina ou como inibidor do carrapato.

5.2 Objetivos específicos

- Clonar as regiões codificantes das cistatnas QNRacys2a, JPIpcys2a, JPIpcys2c, JPIpcys2be JPIlocys2a no vetor pET5a
- Expressar as proteínas QNRacys2a, JPIpcys2a, JPIpcys2c, JPIpcys2b e JPIlocys2a em *Escherichia coli*.

6. Metodologia

6.1 Preparação do vetor pET5a

Foram utilizados 70 µL de células termocompetentes de *Escherichia coli* TOP10 e 1 µL do vetor pET5a para o processo de transformação, o qual foi realizado por choque térmico. As células foram cultivadas em placa de LB sólido suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina a 37°C *overnight*. Para produção de pET5a uma colônia isolada do LB sólido foi selecionada e submetida a um processo de extração de DNA plasmídeo com fenol-clorofórmio, pelo método midiprep. O DNA resultante da extração foi analisado e quantificado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

6.2 Digestão, purificação e desfosforilação do vetor pET5a

O vetor obtido por extração plasmídeo foi digerido com as enzimas BamHI e NdeI para liberação dos sítios de ligação com o inserto e, em seguida, purificado utilizando o *kit* GeneClean II (MP biomedical). O DNA purificado foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Após a digestão do vetor, procedeu-se a reação de desfosforilação para prevenir sua religação, utilizando a enzima CIAP em tampão próprio por 5 minutos a 50 °C e 15 minutos por 65 °C.

6.3 Projeto dos *primers* para clonagem no vetor pET5a, amplificação, digestão e purificação das cistatinas QNRacys2a de *Rhipicephalus appendiculatus* (Ra) JPIpcys2a, JPIpcys2c, JPIpcys2b de *Ixodes persulcatus* (Ip) e JPlocys2a de *Ixodes ovatus* (Io).

Os *primers* para a amplificação das cistatinas foram projetados a partir das sequências das cistatinas obtidas anteriormente. As sequências dos sítios de restrição para as enzimas BamHI e Nde, assim como a sequência de nucleotídeos da cauda de histidina, foram adicionadas à sequência via primer. Os *primers Forward* e *reverse* e os genes amplificados por eles estão listados na tabela abaixo.

Tabela 1 – *Primers* iniciadores utilizados na amplificação por PCR. Os nucleotídeos em vermelho representam as trincas dos códon de iniciação (*start códon*) e terminação (*stop códon*) presentes na sequência das ORFs de interesse. Os nucleotídeos sublinhados representam o sítio de reconhecimento e clivagem das enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*.

Gene	Primer	Sequencia
JPIpcys2a	cis- 50530-ip-pet5- for	5' TTTTTCATATGACTGCTTCCTTCGCTTTGGTC 3'
	cis- 50530-ip-pet5- rev	5'AAAAAGGATCCCTAGTGGTGGTGGTGGT GGTG GCTGCTTCACACTCGAAGGAGC 3'
JPIpcys2b e JPIocys2a	cis- 51659-ip/io- pet5-for	5' TTTTTCATATGGCTTTCTTCAAGGTTGCCGTATTC 3'
	cis- 51659-ip/io- pet5-rev	5'AAAAAGGATCCCTAGTGGTGGTGGTGGT GGTGGACATTATTAGGAGCTTCGCAGTGGTAGG 3'
JPIpcys2c	cis- 51655-ip-pet5- for	5' TTTTTCATATGGGCGTGTTCCACCACCAG 3'
	cis- 51655-ip-pet5- rev	5' AAAAAGGATCCCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGC CCAC GGCACCTTGACTTGT 3'
QNRacys2a	cis-2275- ra-pet5-for	5' TTTTTCATATGATAGCGATCAAGCAGACCTGCT 3'
	cis-2275- ra-pet5-rev	5' AAAAAGGATCCCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT TTG TTGCGCCGGAACACGT 3'

Devido a alta similaridade entre duas cistatinas, o primer cis-51659-ip/io-pet5-for foi utilizado para amplificar os genes JPIpcys2b e JPlocys2a. As sequências codificadoras das cistatina foram amplificadas pela técnica de PCR utilizando a enzima polimerase Elongase, num volume final de 50 µl por reação. As reações de PCR foram realizadas usando 35 ciclos de desnaturação (94 °C), anelamento (59 °C) e extensão (68 °C). Os produtos da reação de PCR foram analisados e quantificados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para garantir maior pureza dos insertos, as cistatinas foram digeridas com as enzimas BamHI e NdeI e, em seguida, purificadas utilizando o kit *kit* GeneClean II (MP biomedical)

6.4 Clonagem das sequencias de cistatina no vetor pET5a

As regiões codificantes QNRacys2a, JPIpcys2a, JPIpcys2c, JPIpcys2b e JPlocys2a foram ligados ao vetor pET5a em uma reação que continha 1 unidade do vetor para 3 unidades de inserto. A reação foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) à 16 °C, *overnight*. O produto das reações de ligação foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1%.

6.5 Transformação de *Escherichia coli* XL1 BLUE

Foram utilizados 70 µL de células eletrocompetentes de *E. coli* XL1 BLUE e 1 µL dos produtos das reações de ligação para o processo de transformação, o qual foi realizado por eletroporação. Após a transformação, as células foram cultivadas em placa de LB sólido suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina nas mesmas condições descritas anteriormente.

6.6 Seleção dos plasmídeos recombinantes

Algumas colônias bacterianas isoladas que cresceram em LB sólido suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina foram selecionadas e submetidas ao processo extração plasmídeo com fenol-clorofórmio, pelo método miniprep. O DNA resultante foi digerido com as enzimas BamHI e NdeI e analisado em gel de agarose 0,8%. Entre as amostras analisadas no gel, aquelas que apresentaram um padrão de bandas que sugerem a clonagem foram submetidas a PCR para confirmar a presença do inserto. As amostras em que o PCR foi positivo foram purificadas com Polietilenoglicol e sequenciadas por sequenciamento automático de DNA, no

sequenciador capilar ABI 3130xl (Life Technologies), na unidade de genética médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Através do resultado do sequenciamento, foram analisados a presença do vetor pET5a e dos respectivos insertos e sua integridade, a presença do códon de iniciação e do stop códon, a presença da sequência codificante para a cauda de histidina e sua integridade, os sítios de reconhecimento e restrição para as enzimas BamHI e NdeI e a correta fase de leitura.

6.7 Extração dos vetores recombinantes

Os clones recombinantes para o plasmídeo pET5a foram cultivados em meio LB suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina. A partir deste cultivo, foi realizada uma extração de DNA plasmideal pelo método midiprep. O DNA extraído foi submetido à PCR para confirmar a presença dos clones referidos e excluir hipótese de contaminações. O DNA resultante das extrações foi analisado e quantificado por eletroforese em gel de agarose 0,8%

6.8 Testes de expressão

Foram realizados diversos testes a fim de estabelecer um protocolo de expressão ótimo desta proteína. No primeiro teste, os clones pET5a/ JPIpcys2b e pET5a/ JPIpcys2c foram utilizados para transformação da bactéria termocompetente *E coli*. cepas BL21 (DE3) C41 e BL21 (DE3) C43 por choque térmico. As bactérias transformadas foram cultivadas em LB sólido suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina nas mesmas condições descritas anteriormente. Uma colônia recombinante de cada cepa foi selecionada, inoculada em 2,5 mL de LB suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina e cultivado *overnight*. Este pré-inóculo foi lavado e adicionado a 30 mL de SOB sem ampicilina, que foi incubado à 37 °C até a fase log de crescimento (DO600 entre 0,6 e 0,8), quando então a expressão da cistatina foi induzida com 0,4 mM de IPTG (isopropiltio-β-D-galactosídeo) e a temperatura foi diminuída para 25°C *overnight*. Após a indução foram coletadas frações após 2, 4, 6 e 24 horas de cultivo para testes. No segundo teste de expressão, o clone pET5a/ JPIpcys2b foi selecionado para transformação de *E coli*. BL21 das cepas SI, Plyss, Star, C41, PTTRX, DE3, PlysE e Ril. As bactérias transformadas foram cultivadas em LB sólido suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de

ampicilina nas mesmas condições descritas anteriormente. Uma colônia recombinante de cada cepa foi selecionada, inoculada em 2,5 mL de SOBamp e cultivado *overnight*. Este pré-inóculo foi lavado e adicionado a 30 mL de SOB sem ampicilina, que foi incubado à 37 °C até a fase log de crescimento (DO600 entre 0,6 e 0,8), quando então a expressão da cistatina foi induzida com 1 mM de IPTG (isopropiltio- β -D-galactosideo) e a temperatura foi mantida em 37°C *overnight*. Após 6h de indução, foi coletada uma alíquota de cada cultivo para testes.

6.9 Análise dos testes de expressão

Os testes de expressão foram analisados pela técnica de SDS-PAGE 14% seguido de *Western blot* (WB) com anticorpo anti-cauda de histidina, utilizando como controle positivo a proteína Cisteíno Endopeptidase Degradadora de Vitelina (VTDC, 35Kda). As proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond ECL* (Amersham Biosciences) durante 1h à 70 V. As membranas foram bloqueadas com leite em pó 5 %, *overnight* à 4 °C, seguido de 3 lavagens com PBS. Posteriormente, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente com anti-cauda de histidina. Após 3 lavagens com PBS-T e uma com tampão de revelação fosfatase, as reações foram reveladas com Tampão de Revelação Fosfatase contendo NBT e BCIP.

7. Resultados

7.1 Preparação do vetor pET5a

O vetor pET5a é um vetor de expressão para *E. coli* e possui sítios de reconhecimento e restrição para as enzimas BamHI e NdeI. (Figura 4)

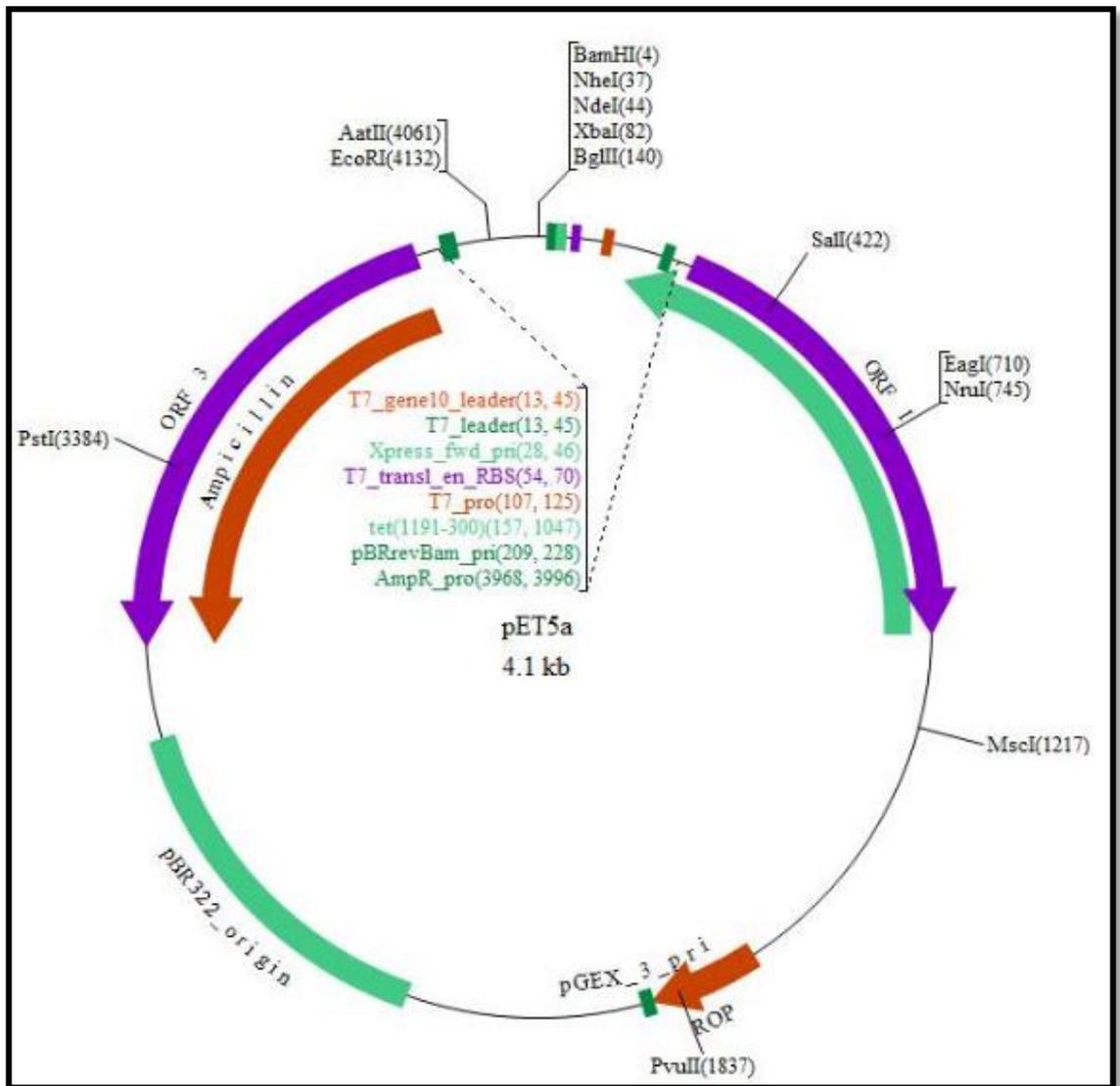


Figura 5 – Mapa do vetor pET5a obtido em <http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pET5a.htm>

O vetor pET5a foi extraído, digerido e purificado com sucesso, gerando um fragmento de aproximadamente 4.100 pb (Figura 6). Após desfosforilação esse vetor foi utilizado para clonagem das regiões codificantes das cistatina.

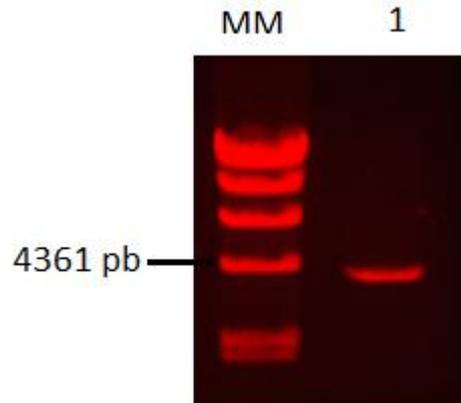


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% de pET5a. 1: Marcador de DNA contendo Lambda DNA digerido com Hind III. 2: pET após digestão e purificação.

7.2 Amplificação de QNRacys2a JPIpcys2a, JPIpcys2c, JPIpcys2be JPIlocys2a e clonagem de JPIpcys2ce JPIpcys2bno vetor pET5a

As regiões codificantes QNRacys2a, JPIpcys2a, JPIpcys2c, JPIpcys2b e JPIlocys2a foram eficientemente amplificado por PCR. Após digestão com as enzimas BamHI e NdeI e purificação, as cinco regiões codificantes foram utilizados para ligação em pET5a. A transformação de *E. coli* XL1BLUE apenas teve sucesso com os clones Pet5a/JPIpcys2ce Pet5a/JPIpcys2b, uma vez que o processo de transformação com os clones Pet5a/ QNRacys2a Pet5a/JPIpcys2a Pet5a/JPIlocys2a não gerou colônias nas placas de LB suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina.

7.3 Confirmação dos clones Pet5a/JPIpcys2c e Pet5a/JPIpcys2b recombinantes

Para confirmação dos clones foram utilizados os métodos de clivagem com enzimas de restrição, PCR e sequenciamento. Após a digestão com BamHI e NdeI, foi possível analisar em gel de agarose 0,8% fragmentos nos tamanhos de aproximadamente 20 kb, 4500 pb e 4000 pb (Figura 7).

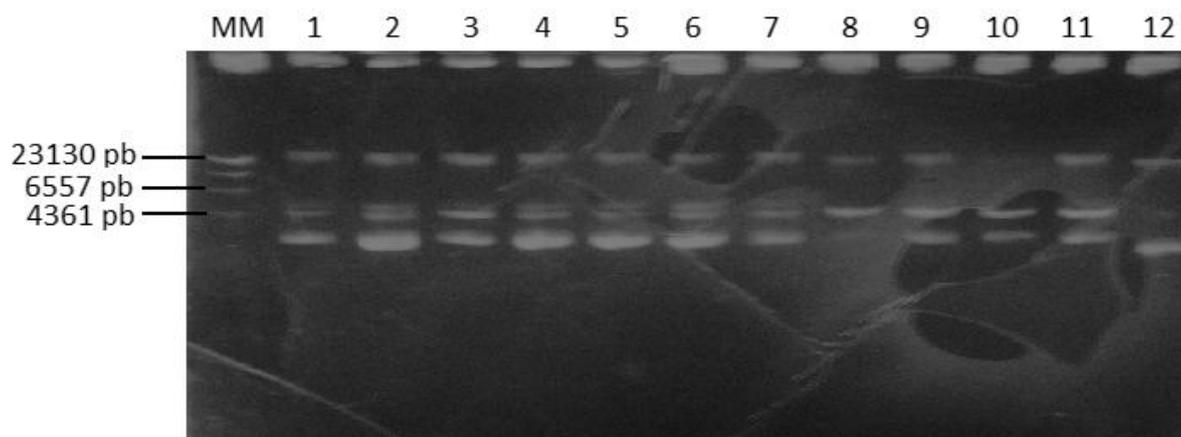


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos possíveis clones Pet5a/JPIpcys2c e Pet5a/JPIpcys2b clivados com BamHI e NdeI. MM- Marcador de DNA contendo Lambda DNA digerido com Hind III. 1-6– DNA extraído de colônia contendo o possível clone Pet5a/JPIpcys2c. 7-12– DNA extraído de colônia contendo o possível clone Pet5a/JPIpcys2b.

Apesar do fragmento esperado de aproximadamente 420 pb não ser localizado em nenhuma das amostras, os fragmentos de aproximadamente 4500 pb indicam que as sequencias codificantes das cistatinas continuaram ligadas ao vetor mesmo após o processo de digestão, sugerindo que o processo de clivagem pelas enzimas, ou por apenas uma delas, não foi totalmente eficiente. O fragmento de 20kb possivelmente representa o vetor circular em sua forma *supercoiled*, o de 4000pb o vetor linearizado clivado em dois sítios de restrição e o de 4500 o vetor linearizado, juntamente com o inserto, clivado em apenas um dos sítios de restrição. Assim, os clones selecionados para o PCR e sequenciamento foram aqueles que apresentaram um fragmento de 4500 pb. Das amostras com esse padrão de banda, foram selecionadas 4 para o teste de PCR, duas do clone Pet5a/JPIpcys2c e duas do clone Pet5a/JPIpcys2b. Houve amplificação de uma amostra clonada com Pet5a/JPIpcys2c e de uma amostra clonada com Pet5a/JPIpcys2b (figura 8).

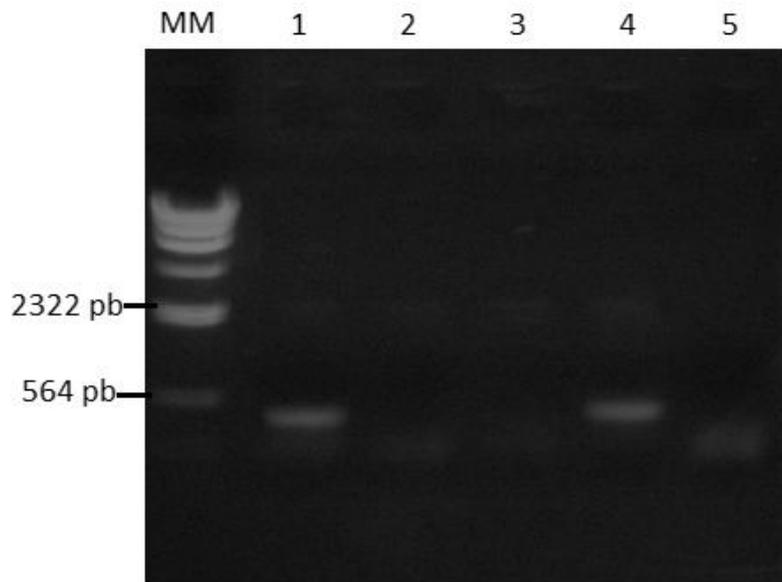


Figura 8 – PCR dos prováveis clones Pet5a/JPIpcys2ce Pet5a/JPIpcys2b. MM- Marcador molecular HindIII. 1 e 2– Prováveis clones Pet5a/JPIpcys2c. 3 e 4– prováveis clones Pet5a/ JPIpcys2b. 5– controle negativo.

Os prováveis clones amplificados na reação de PCR foram sequenciados utilizando os primers T7 e Clockwise (pET5a) e alinhados com a sequência das respectivas cistatinas originais obtida em trabalhos anteriores (figuras 9 e 10). Além disso, foi analisada e confirmada a correta clonagem do inserto no vetor pET5a, a presença do códon de iniciação e do stop códon, a presença da sequência codificante para a cauda de histidina e sua integridade. (Figuras 9, 10, 11 e 12)

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Original JPIpcys2b          ATGGCTTTCTTCAAGGTTGCCGTATTCCCTGGTTTGTGTGGTCCCTCGCAGC 50
SequenciamentoClockwise  ATGGCTTTCTTCAAGGTTGCCGTATTCCCTGGTTTGTGTGGTCCCTCGCAGC 50
SequenciamentoT7         ATGGCTTTCTTCAAGGTTGCCGTATTCCCTGGTTTGTGTGGTCCCTCGCAGC 50
*****

Original JPIpcys2b          GGCCGGGTCGGCGAGCAGGTCAAAGAGGGCCCTGGTCCGAGGCTGGAAGA 100
SequenciamentoClockwise  GGCCGGGTCGGCGAGCAGGTCAAAGAGGGCCCTGGTCCGAGGCTGGAAGA 100
SequenciamentoT7         GGCCGGGTCGGCGAGCANNNCAAAAGAGGGCCCTGGTCCGAGGCTGGAAGA 100
*****

Original JPIpcys2b          CGCAGGACCCAACCAACCCCAAGTTCGAGAATCTGGCGCACTACGCAGTC 150
SequenciamentoClockwise  CGCAGGACCCAACCAACCCCAAGTTCGAGAATCTGGCGCACTACGCAGTC 150
SequenciamentoT7         CGCAGGACCCAACCAACCCCAAGTTCGAGAATCTGGCGCACTACGCAGTC 150
*****

Original JPIpcys2b          TCTACCCAAGTCGAAGGTCGAGAATACTACGACACGGTCCCTCGAGCTCTT 200
SequenciamentoClockwise  TCTACCCAAGTCGAAGGTCGAGAATACTACGACACGGTCCCTCGAGCTCTT 200
SequenciamentoT7         TCTACCCAAGTCGAAGGTCGAGAATACTACGACACGGTCCCTCGAGCTCTT 200
*****

Original JPIpcys2b          GGAGGTGCAGACTCAGATTGTGGCCGGCGTGAAC TACAAGTTGAAGTTTA 250
SequenciamentoClockwise  GGAGGTGCAGACTCAGATTGTGGCCGGCGTGAAC TACAAGTTGAAGTTTA 250
SequenciamentoT7         GGAGGTGCAGACTCAGATTGTGGCCGGCGTGAAC TACAAGTTGAAGTTTA 250
*****

Original JPIpcys2b          CAACGACTCAATCGACGTGCAAGATCGAAACCGGCGTGAATACTCCAAG 300
SequenciamentoClockwise  CAACGACTCAATCGACGTGCAAGATCGAAACCGGCGTGAATACTCCAAG 300
SequenciamentoT7         CAACGACTCAATCGACGTGCAAGATCGAAACCGGCGTGAATACTCCAAG 300
*****

Original JPIpcys2b          GAGCTTTGCCAGCCTAAGACAAAACAAGGTTCAAGCTGTATGCACCGCAAT 350
SequenciamentoClockwise  GAGCTTTGCCAGCCTAAGACAAAACAAGGTTCAAGCTGTATGCACCGCAAT 350
SequenciamentoT7         GAGCTTTGCCAGCCTAAGACAAAACAAGGTTCAAGCTGTATGCACCGCAAT 350
*****

Original JPIpcys2b          CATCTACACAGTTCATGGCAGAACATCAAGCGGGTTTTGTCTTACCCT 400
SequenciamentoClockwise  CATCTACACAGTTCATGGCAGAACATCAAGCGGGTTTTGTCTTACCCT 400
SequenciamentoT7         CATCTACACAGTTCATGGCAGAACATCAAGCGGGTTTTGTCTTACCCT 400
*****

Original JPIpcys2b          GCGAAGCTCCTAATAATGTC 420
SequenciamentoClockwise  GCGAAGCTCCTAATAATNTC 420
SequenciamentoT7         GCGAAGCTCCTAATAATGTC 420
***** **

```

Figura 9– Alinhamento entre as sequências da cistatina JPIpcys2b utilizando a a ferramenta ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). A sequência original da região codificante (OriginalJPIpcys2b) foi alinhada com a sequência do inserto do possível clone pET5a/JPIpcys2b obtida por sequenciamento com os primers clockwise (SequenciamentoClockwise) e T7 (SequenciamentoT7). Os pares de base idênticos a todas às sequências estão indicados na linha inferior por asterisco (*).

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

OriginalJPIpcys2c          ATGGGCGTGTTACCACCAGCGCGGTCCCTGCTGAGCTTGGCAGTTTGCGG  50
Sequenciamentoclockwise  ATGGGCGTGTTACCACCAGCGCGGTCCCTGCTGAGCTTGGCAGTTTGCGG  50
Sequenciamentot7         ATGGGCGTGTTACCACCAGCGCGGTCCNGCTGAGCTTGGCAGTTTGCGG  50
*****

OriginalJPIpcys2c          TACCCTGGCGGGAAGATCGCTGCCTAGTGGCTGGAGGACGATGGACCCCC  100
Sequenciamentoclockwise  TACCCTGGCGGGAAGATCGCTGCCTAGTGGCTGGAGGACGATGGACCCCC  100
Sequenciamentot7         TACCCTGGCGGGAAGATCGCTGCCTAGTGGCTGGAGGACGATGGACCCCC  100
*****

OriginalJPIpcys2c          ACAGCAATCCCAAGTACGCCGAGCTGGCCCACTACGCCGTTTCGAGCCAA  150
Sequenciamentoclockwise  ACAGCAATCCCAAGTACGCCGAGCTGGCCCACTACGCCGTTTCGAGCCAA  150
Sequenciamentot7         ACAGCAATCCCAAGTACGCCGAGCTGGCCCACTACGCCGTTTCGAGCCAA  150
*****

OriginalJPIpcys2c          GCGGGGACAGCGAGTTCTATGACACTGTCTGGAGCTCTTAGCAGTGCA  200
Sequenciamentoclockwise  GCGGGGACAGCGAGTTCTATGACACTGTCTGGAGCTCTTAGCAGTGCA  200
Sequenciamentot7         GCGGGGACAGCGAGTTCTATGACACTGTCTGGAGCTCTTAGCAGTGCA  200
*****

OriginalJPIpcys2c          GACTGAGGTGGTCCGCTGGAATGAACTACCGGCTCAAGTTCAGCACGGCTG  250
Sequenciamentoclockwise  GACTGAGGTGGTCCGCTGGAATGAACTACCGGCTCAAGTTCAGCACGGCTG  250
Sequenciamentot7         GACTGAGGTGGTCCGCTGGAATGAACTACCGGCTCAAGTTCAGCACGGCTG  250
*****

OriginalJPIpcys2c          AGAGTTCCTGCAAAGTGGGACTGGATGAATATTCCCGAGAACGGTGCACG  300
Sequenciamentoclockwise  AGAGTTCCTGCAAAGTGGGACTGGATGAATATTCCCGAGAACGGTGCACG  300
Sequenciamentot7         AGAGTTCCTGCAAAGTGGGACTGGATGAATATTCCCGAGAACGGTGCACG  300
*****

OriginalJPIpcys2c          CCCAAAGTCAGTCCGCCCAAAGCAATCTGCACTGCCGTGGTGTACGAGCG  350
Sequenciamentoclockwise  CCCAAAGTCAGTCCGCCCAAAGCAATCTGCACTGCCGTGGTGTACGAGCN  350
Sequenciamentot7         CCCAAAGTCAGTCCGCCCAAAGCAATCTGCACTGCCGTGGTGTACGAGCG  350
*****

OriginalJPIpcys2c          CGCCTGGCAAAATCACCGTGAAGTCACAAGTCACAAGTGCCGTGGG  396
Sequenciamentoclockwise  CGCCTGGCAAAATCACCGTGAAGTCACAAGTCACAAGTGCCGTGGG  396
Sequenciamentot7         CGCCTGGCAAAATCACCGTGAAGTCACAAGTCACAAGTGCCGTGGG  396
*****

```

Figura 10– Alinhamento entre as seqüências da cistatina JPIpcys2c utilizando a a ferramenta ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). A seqüência original da região codificante (OriginalJPIpcys2c) foi alinhada com a seqüência do inserto do possível clone pET5a/ JPIpcys2c obtida por sequenciamento com os primers clockwise (Sequenciamentoclockwise) e T7 (Sequenciamentot7). Os pares de base idênticos a todas às seqüências estão indicados na linha inferior por asterisco (*).

Figura 13– Wester Blot das proteínas totais de *E.coli* XL1 BLUE (DE3) C41 transformada com pET5a/ JPIpcys2b e pET5a/JPIpcys2c. 1-4- Cepa transformada com pET5a/ JPIpcys2b após indução *overnight*, por 6h, 4h e 2h, respectivamente. 5- *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas). 6-9- Cepa transformada com pET5a/JPIpcys2c após indução *overnight*, por 6h, 4h e 2h, respectivamente. 10- Controle VTDCE (35kDa).



Figura 14– Wester Blot das proteínas totais de *E.coli* XL1 BLUE (DE3) C43 transformada com pET5a/JPIpcys2b e pET5a/JPIpcys2c. 1-4- Cepa transformada com pET5a/JPIpcys2c após indução por 2h, por 4h, por 6h e *overnight*. 5- Controle positivo. Proteína VTDCE (35kDa) 6- *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas) 7-10- Cepa transformada com pET5a/JPIpcys2b após indução por 2h, por 4h, por 6h e *overnight*.

Pela análise do Wester Blot do segundo teste de expressão não foi possível observar expressão das cistatinas (Figura 15).



Figura 15– Wester Blot das proteínas totais de *E.coli* XL1 BLUE SI, pLysS, Star, C41, PTTRX, DE3, pLysE e RIL transformadas com pET5a/ JPIpcys2b com 6h de indução com IPTG. 1- *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas). 2- Controle positivo. Proteína VTDCE (35kDa) 3- Extrato total de *E.coli* SI. 4- Extrato total de *E.coli* pLysS. 5- Extrato total de *E.coli* Star. 6- Extrato total de *E.coli* C41. 7- Extrato total de *E.coli* PTTRX. 8- Extrato total de *E.coli* DE3. 9- Extrato total de *E.coli* pLysE 10- Extrato total de *E.coli* RIL.

8. Conclusões e perspectivas

As regiões codificantes JPlpcys2b e JPlpcys2c foram eficientemente clonados no vetor de expressão pET5a. As sequências QNRacys2a, JPlpcys2a e JPlocys2a ainda necessitam serem clonadas no mesmo vetor para posterior expressão heteróloga. Os testes de expressão das cistatinas clonadas indicam que as condições utilizadas devem ser modificadas, uma vez que não houve sinal revelado pelo Wester Blot. Portanto, serão realizados novos testes, utilizando diferentes temperaturas, concentração de IPTG, outras cepas de *E. coli* e adição de ampicilina durante o cultivo. Após a otimização da expressão, a proteína recombinante será utilizada para caracterização através de ensaios bioquímicos de inibição de cisteínoproteases e imunização de animais para averiguar sua antigenicidade, proteção e proteção cruzada através de testes de desafio.

O estágio de conclusão de curso no Laboratório de Imunologia Aplicado à Sanidade Animal gerou, além dos resultados experimentais, resultados pessoais, relacionados ao aprendizado de técnicas básicas para minha formação acadêmica e profissional, à discussão de artigos e troca de ideias com os colegas e ao entrosamento com novos grupos de pesquisa.

9. Referências

- ALMAZÁN, C.; KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F.; DE LA FUENTE J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. **Vaccine**. v.23, n.46, p.5294–5298, 2005.
- ANDERSON, J.F. Epizootiology of *Borrelia* in *Ixodes* tick vectors and reservoir hosts. **Rev. Infect. Dis.**, v.11, n.6, p.1451–1459, 1989
- ANDERSON, J.F.; MAGNARELLI, L.A. Epizootiology of Lyme disease-causing borreliae **Clin. Dermatol.** v.11 n.3, p.339–351, 1993.
- ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K.C.; SASAKI SD, SAMPAIO C.A.; TANAKA A.S. BmTI antigens induce a bovine protective 815 immune response against *Boophilus microplus* tick. **Int Immunopharmacol.** v. 2, n.4, p.557–563, 2002.
- CUNHA, R.C.; PÉREZ DE LEÓN, A.A.; LEITE, F.P.; PINTO, L. DA S.; Santos Júnior A.G.; Andreotti R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.21, n.3, p.254-62, 2012.
- DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B.B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends Parasitol.** v.28 n.10 p.437-446, 2012.
- DE CASTRO, J.J.; JAMES, A.D.; MINJAUW, B.; DI GIULIO, G.U.; PERMIN, A.; PEGRAM, R.G.; CHIZYUKA, H.G.B.; SINYANGWE, P. Long term studies on the economic impact of ticks on Sanga cattle in Zambia. **Experimental and Applied Acarology**, v.21, n.1, p.3–19, 1997
- DE LA FUENTE, J.; ALMAZAN, C.; CANALES, M.; DE LA LASTRA, J.M.; KOCAN, K.M.; WILLADSEN, P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. **Ani. Heal. Res. Rev.** v.8, n.1, p.23–28, 2007.
- DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M. Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations. **Exp Rev Vaccines**. v.2, n.4, p.583–593, 2003.
- DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. **Parasite Immunol.**, v.28 n.7, p. 275–283, 2006.
- DÉRUAZ M.; FRAUENSCHUH A.; ALESSANDRI A.L.; DIAS J.M.; COELHO F.M.; RUSSO R.C.; FERREIRA B.R.; GRAHAM G.J.; SHAW J.P.; WELLS T.N.; TEIXEIRA M.M.; POWER C.A.; PROUDFOOT A.E.; Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. **J. Exp. Med.** v.205 n.9 p.2019-31, 2008
- DICKINSON, D.P. Salivary (SD-type) cystatins: over one billion years in the making-but to what purpose? **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.** v.13, n.6, p.485-846, 2002
- 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. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.60 n.1, p.977–984, 2010

FRANCISCHETTI, I.M.; SA-NUNES, A.; MANS B.J.; SANTOS I.M.; RIBEIRO J.M. The role of saliva in tick feeding. **Front Biosci.** v.1 n.14 p.2051-88, 2009.

GALAÏ, Y.; CANALES, M.; SAÏD, M.B.; GHARBI, M.; MHADHBI, M. JEDIDI, M.; DE LA FUENTE, J. DARGHOUTH, M.A. Efficacy of Hyalomma scupense (Hd86) antigen against Hyalomma excavatum and H. scupense tick infestations in cattle. **Vaccine.** v.30, n.49, p.7084-9, 2012.

GRAF, J.F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING N.; SABATINI, G.A.; MOLENTO, M.B.; BORDIN, E.L.; ARANTES, G.J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology.** v.129 n.1, p.427–442, 2004.

GRZONKA, Z.; JANKOWSKA, E.; KASPRZYKOWSKI, F.; KASPRZYKOWSKA, R.; LANKIEWICZ, L.; WICZK, W.; WIECZERZAK, E.; CIARKOWSKI, J.; DRABIK, P.; JANOWSKI, R.; KOZAK, M.; JASKÓLSKI, M.; GRUBB, A. Grubb Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochim. Pol.**, v.48 n.1 p.1–20, 2001.

HABIB, H.; FAZILI, K. M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology.** v.2, n.3, p.068-085, 2007.

HONEY, K.; RUDENSKY, A.Y. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. **Nat. Rev. Immunol.**, v.3 n.6 p. 472–482, 2003.

HORKÁ, H.; CERNÁ-KÝCKOVÁ, K.; SKALLOVÁ, A.; KOPECKÝ, J. Tick saliva affects both proliferation and distribution of Borrelia burgdorferi spirochetes in mouse organs and increases transmission of spirochetes to ticks. **Int. J. Med. Microbiol.** v.299, n.5, p.373-80, 2009.

HORNOK S.; MELI ML.; PERRETTEN A.; FARKAS R.; WILLI B, BEUGNET F.; LUTZ H.; HOFMANN-LEHMANN R. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. **Vet. Microbiol.** v.140 n.1-2 p.98-104. 2009

IMAMURA, S.; DA SILVA VAZ, J.R. I.; SUGINO, M.; OHASHI, K.; ONUMA, M. A serine protease inhibitor (serpin) from Haemaphysalis longicornis as an anti-tick vaccine. **Vaccine.** v.23, n.10, p.1301–1311, 2005.

JEYABAL, L.; KUMAR, B.; RAY, D.; AZAHAHIANAMBI, P.; GHOSH, S. Vaccine potential of recombinant antigens of Theileria annulata and Hyalomma anatolicum anatolicum against vector and parasite. **Vet. Parasitol.** v.188 n.3-4, p.231-8, 2012.

JONGEJAN, F. and UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology,** v.129 n.3, p.3–14, 2004.

JUNCADELLA, I.J.; ANGUITA, J. The immunosuppressive tick salivary protein, Salp15. **Adv. Exp. Med. Biol.** v.66 n.6 p.121-31, 2009.

KAEWMONGKOL G.; KAEWMONGKOL S.; OWEN H, FLEMING P.A.; ADAMS P.J.; RYAN U.; IRWIN P.J.; FENWICK S.G. Candidatus Bartonella antechini: a novel Bartonella species detected in fleas and ticks from the yellow-footed antechinus (Antechinus flavipes), an Australian marsupial. **Vet. Microbiol.** v.149 n.3-4 p.517-21, 2010.

KAEWMONGKOL, G.; KAEWMONGKOL, S.; OWEN, H.; FLEMING, P.A.; ADAMS, P.J.; RYAN, U.; IRWIN, P.J.; FENWICK, S.G. Candidatus Bartonella antechini: a novel Bartonella species detected in fleas and ticks from the yellow-footed antechinus (*Antechinus flavipes*), an Australian marsupial. **Vet Microbiol.** v.149 n.3-4 p.517-521, 2010

KARIM, S., MILLER, N.J., VALENZUELA, J., SAUER, J. R. AND MATHER, T. N. RNAi-mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.334, n.4, p.1336-1342, 2005.

KARIM, S.; MILLER, N.J.; VALENZUELA, J.; SAUER, J.R.; MATHER, T.N.; RNAi-mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.334, n.4, p.1336-42, 2005.

KERN A.; COLLIN E.; BARTHEL C.; MICHEL C.; JAULHAC B.; BOULANGER N. Tick saliva represses innate immunity and cutaneous inflammation in a murine model of lyme disease. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v.11, n.10 p.1343-1350, 2011

KOPECKÝ J.; KUTHEJLOVÁ M. Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro. **Parasite. Immunol.** v.20, n.4, p.169–174, 1998.

KOTSYFAKIS M.; SÁ-NUNES A.; FRANCISCHETTI I.M.; MATHER T.N.; ANDERSEN J.F.; RIBEIRO J.M. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. **J Biol Chem.** v.281, n.36 p.26298-307, 2006.

KOTSYFAKIS M.; SÁ-NUNES A.; FRANCISCHETTI I.M.; MATHER T.N.; ANDERSEN J.F. RIBEIRO J.M. antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. **lol. Chem.** v.281, n.36, p.26298-307, 2006

KOTSYFAKIS, M.; ANDERSON, J. M.; ANDERSEN, J. F.; CALVO, E.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; VALENZUELA, J. G.; RIBEIRO, J. M. C. Cutting edge: immunity against a 'silent' salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. **J. Immunol.** v.181, n.8 p.5209-5212, 2008.

KOTSYFAKIS, M.; KARIM, S.; ANDERSEN, J.F.; MATHER, T.N.; RIBEIRO, J.M. Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. **J Biol Chem.** v.282 n.40 p.29256- 29263, 2007

LIMA, C.A.; SASAKI, S.D.; TANAKA, A.S. Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus* **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.347 n.1, p. 44–50, 2006

LOMBARDI G, BURZYN D, MUNDIÑANO J, BERGUER P, BEKINSCHTEIN P, COSTA H, CASTILLO LF, GOLDMAN A, MEISS R, PIAZZON I, NEPOMNASCHY I.J. Cathepsin-L influences the expression of extracellular matrix in lymphoid organs and plays a role in the regulation of thymic output and of peripheral T cell number. **J Immunol.** V.174, n.11, p.7022-32, 2005.

MARCHAL C.; SCHRAMM F.; KERN A.; LUFT B.J.; YANG X.; SCHUIJT T.J.; HOVIUS J.W.; JAULHAC B.; BOULANGER N. Antialarmin effect of tick saliva during the transmission of Lyme disease. **Infect. Immun.** v.79 n.2 p.774-85, 2011

MULENGA, A.; SUGIMOTO, C.; SAKO, Y.; OHASHI, I.K.; MUSOKE, A.; SHUBASH, M.; ONUMA, M. Molecular characterization of a Haemaphysalis longicornis tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. **Infect Immun.** v.67, n.4, p.1652–1658, 1999.

MÜLLER-ESTERL, W.; FRITZ, H.; MACHLEIDT, W.; RITONJA, A.; BRZIN, J.; KOTNIK, M.; TURK, V.; KELLERMANN, J.; LOTTSPEICH, F. Lottspeich Human plasma kininogens are identical with alpha-cysteine proteinase inhibitors. Evidence from immunological, enzymological and sequence data. **FEBS Lett.**, v.182, n.2 p. 310–314, 1985.

NIJHOF, A.M.; GUGLIELMONE, A.A.; HORAK, I.G. TicksBase. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2011 Annual Checklist. Disponível em: <http://data.gbif.org/datasets/resource/1572>. Acesso em: 25 nov. 2012, 16:20:00.

OHKUBO, K.; KURACHI, T.; TAKASAWA, H.; SHIOKAWA, M.; SASAKI, M. Isolation of a human cDNA for alpha 2-thiol proteinase inhibitor and its identity with low molecular weight kininogen. **Biochemistry**. v.23, n.4, p.5691–5697, 1984.

OSTFELD, R.S.; PRICE, A.; HORNBOSTEL, V.L.; BENJAMIN, M.A.; KEESING, F.; Controlling ticks and tick-borne zoonoses with biological and chemical agents. **Bioscience**, v.56, n.5, p.383–394, 2006

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. **Appl. Environ. Microbiol.** v.77, n.15, p.5207–5211, 2011.

PARIZI, L.F.; GITHAKA, N.W.; LOGULLO, C.; KONNAI, S.; MASUDA, A.; OHASHI, K.; DA SILVA VAZ, I. JR. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. **Vet J.** v.194, n.2 p.158-165, 2012.

PARIZI, L.F.; RECK, J. Jr.; OLDIGES, D.P.; GUIZZO, M.G.; SEIXAS, A.; LOGULLO, C.; DE OLIVEIRA, P.L.; TERMIGNONI, C.; MARTINS, J.R.; DA SILVA VAZ, I. Jr. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus: A field evaluation. **Vaccine**. v.30, n.48, p.6912-7, 2012.

PETER, R.J.; VAN DEN BOSSCHE, P.; PENZHORN, B.L.; SHARP B. Tick, fly, and mosquito control—lessons from the past, solutions for the future **Vet. Parasitol**, v. 132 n. 3 (2005), p. 205–215

RAMACHANDRA R.N.; WIKEL S.K. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. **J Med Entomol.** v.29 n.5 p.818–826 1992

RAND, K.N.; MOORE, T.; SRISKANTHA, A.; SPRING, K.; TELLAM, R.; WILLADSEN, P.; COBON, S.G. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.86, n.24 p.9657–9661, 1989.

REDDY, V.Y.; ZHANG, Q.Y.; WEISS, S.J. Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.92, n.9, p.3849–992 3853, 1995.

RIBEIRO, J. M.; ALARCON-CHAIDEZ, F. B.; FRANCISHETTI, I. M.; MANS, B. J.; MATHER, T. N.; VALENZUELA, J. G. AND WIKEL, S. K. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 36, n.2, p.111-129, 2006.

RODRÍGUEZ, M.; RUBIERA, R.; PENICHER M.; MONTESINOS, R.; CREMATA, J.; FALCÓN, V.; SÁNCHEZ, G.; BRINGAS, R.; CORDOVÉS, C.; VALDÉS, M. High level expression of the B. microplus Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **J. Biotechnol.** v.33, n.2, p.135-46, 1994.

SACHIN, K.; SOUVIK, P.; KUMAR, S.A.; RINESH, K.; SHANKAR, T.S.; PALLAB, C.; RAY, D.D.; RAWAT, A.K.S.; GHOSH, S. Diazinon resistant status *Rhipicephalus* (*Boophilus*) microplus collected from different agro-climatic regions of India. **Vet. Parasitol.** v.181, n.2, p.274–281, 2011.

SA-NUNES, A.; BAFICA, A.; ANTONELLI, L. R.; CHOI, E. Y.; 1007 FRANCISCHETTI, I. M. B.; ANDERSEN, J. F., SHI, G.; CHAVAKIS, T.; RIBEIRO, J.M.C.; KOTSYFAKIS, M. The immunomodulatory action of Sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. **J. Immunol.** v.182, n.12 p.7422-7429, 2009.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; SVENSJÖ, E.; GRANATO, A.; MONTEIRO, A.C. Kininogens coordinate Adaptive immunity through the proteolytic release of bradykinin, an endogenous danger signal driving dendritic cell maturation. **Scand. J. Immunol.** v.66, n.2, p.128–136, 2007

SCHAUBER, E. M.; EDGE, W. D.; WOLFF, J.O. Insecticide effects on small mammals: Influence of vegetation structure and diet. **Ecological Applications.** v.7, n.1 p.143–157, 1997

SCHUIJT T.J.; COUMOU J.; NARASIMHAN S.; DAI J.; DEPONTE K.; WOUTERS D.; BROUWER M.; OEI A.; ROELOFS J.J.; VAN DAM A.P.; VAN DER POLL T.; VAN'T VEER C.; HOVIUS J.W.; FIKRIG E. A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the lyme disease agent. **Cell Host Microbe.** v.10 n.2 p.136-46, 2011.

SCHULZE, T. L., G. C. TAYLOR, R. A. JORDAN, E. M. BOSLER, AND J. K. SHISLER. Effectiveness of selected granular acaricide formulations in suppressing populations of *Ixodes dammini* (Acari, Ixodidae). **J Med Entomol.** v.28, n.5 p.624-9, 1991.

SCHULZE, T.L.; JORDAN, R.A.; HUNG, R.W.; TAYLOR, R.C.; MARKOWSKI, D.; CHOMSKY, M.S. Efficacy of granular deltamethrin against *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) nymphs: short-term control of nymphs and larvae. **Journal of Medical Entomology.** v.28, n.5, p.344–346, 1991.

SCHWARZ, A.; VALDÉS, J.J; KOTSYFAKIS, M. The role of cystatins in tick physiology and blood feeding. **Ticks Tick Borne** v.3, n.3, p.117-127 2012.

SLÁMOVÁ, M.; SKALLOVÁ, A.; PÁLENÍKOVÁ, J.; KOPECKÝ, J. Effect of tick saliva on immune interactions between *Borrelia afzelii* and murine dendritic cells. **Parasite Immunology**. v.33 n.12 p.654–660, 2011.

SMITH, T.; KILBORNE, F.L. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever US Department of Agriculture Bureau of Animal Industry Bulletin, v.1, p. 1–301, 1893.

TRIMNELL, A.R.; DAVIES, G.M.; LISSINA, O.; HAILS, R.S.; NUTTALL P.A. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. **Vaccine** v.23, n.34, p.4329–4341, 2005.

TURK V.; STOKA, V.; TURK, D. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. **Front. Biosci.**, v.13 n.1 p. 5406–5420, 2008.

TURK, V.; BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Lett.** v. 285, n.2, p.213-9, 1991

UHLMANN, E.J.; HOCK, K.G.; ISSITT, C.; SNEERINGER, M.R.; CERVELLI, D.R.; GORMAN, R.T.; COTT, M.G. Reference intervals for plasma cystatin C in healthy volunteers and renal patients, as measured by the dade behring BN II system, and correlation with creatinine. **Clin. Chem.**, v. 47, n. 11, p.2031-2033, 2001.

VALENZUELA, J.G.; FRANCISCHETTI, I.M.; PHAM, V.M.; GARFIELD, M.K.; MATHER, T.N.; RIBEIRO, J.M. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. **Exp. Biol.** v. 25 n.18, 2002.

VRAY, B.; HARTMANN, S.; HOEBEKE, J. Immunomodulatory properties of cystatins Cell. **Mol. Life Sci.**, v.59 n.9, p.1503–1512, 2002.

WANG,H.; NUTTALL, P.A. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. **Cell Mol. Life Sci.** v.56, n.3, p.286–295.

WEISS, B.L.; KAUFMAN, W.R. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.101, n.16, p.5874-9, 2004

WILLADSEN, P. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope **Trends. Parasitol**, v.24, n.4, p.164–167, 2008.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitol**. v.129, n.1, p.367–S387, 2004.

WILLADSEN, P. Exploring the use of an anti-tick vaccine as a tool for the integrated eradication of the cattle fever tick, *Rhipicephalus (Boophilus)annulatus*. **Vaccine**. v.30, n.38, p.5682-5687, 2012.

WILLADSEN, P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. **Vet. Parasitol.**, v.101 n.3-4,p. 353–367, 2001.

WILLADSEN, P.; RIDING, G.; MCKENNA, R.V.; KEMP, D.H.; TELLAM, R.L.; NIELSEN, J.N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G.S.; GOUGH, J.M. Immunological control of the parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **J Immunol**. v.143, n.4, p.1346–1351, 1989

WILLADSEN, P.; SMITH, D.; COBON, G.; MCKENNA, R.V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. **Parasite Immunol.** v.18, n.5, p.241–246, 1996.

WILLE, A.; GERBER, A.; HEIMBURG, A.; REISENAUER, A.; PETERS, C.; SAFTIG, P.; REINHECKEL, T.; WELTE, T.; BÜHLING, F. Cathepsin L is involved in cathepsin D processing and regulation of apoptosis in A545 human lung epithelial cells. **Biol. Chem.** v.385, n.7, p.665–670, 2004.

YAMAJI, K.; TSUJI, N.; MIYOSHI, T.; HATTA, T.; ALIM, M.A.; ANISUZZAMAN, K.U.; SHIBIKI, S.; FUJISAKI, K. Hlcyst-1 and Hlcyst-2 are potential inhibitors of HICPL-A in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. **J. Vet. Med. Sci.** v.72, n.5, p. 599–604, 2010.

ZAVASNIK-BERGANT, T. Cystatin protease inhibitors and immune functions. *Front. Biosci.* v.13 n.1, p. 4625–4637, 2008