

Alimentação artificial de *Rhipicephalus microplus*: Avaliação do efeito de anticorpos policlonais

Effect of polyclonal antibodies applied by artificial feeding to *Rhipicephalus microplus* ticks

Sandra Antunes

Estudante de doutoramento em Ciências Biomédica, Ramo de Parasitologia.
UEIPM. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais.

Joana Lérias

Bolseira de Investigação. CIISA, Faculdade Medicina.
Veterinária., Universidade Técnica Lisboa.

Octávio Merino

Early Stage Researcher financiado por POSTICK ITN
(Post-graduate training network for capacity building to control ticks and tick-borne diseases).
Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, Universidad Castilla-La Mancha,
Ronda de Toledo, Ciudad Real, Espanha

Virgílio do Rosário

Professor Catedrático jubilado. UEIPM.
Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais.

José de la Fuente

Professor e investigador no Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, Universidad Castilla-La Mancha,
Ronda de Toledo, Ciudad Real, Espanha e no Department of Veterinary Pathobiology,
Center for Veterinary Health Sciences, Oklahoma State University, Stillwater, OK 74078, USA.

Ana Domingos

Investigadora auxiliar com agregação. UEIPM.
Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais.

Resumo

As carraças são ectoparasitas hematófagos obrigatórios que transmitem uma grande variedade de agentes patogénicos sendo considerados os principais vetores de doenças no caso de animais. Os piroplasmas *Babesia bovis* e *B. bigemina* são transmitidos essencialmente por carraças *Rhipicephalus microplus* e *R. annulatus*, consideradas os ectoparasitas de maior impacto económico na produção de gado. O método mais utilizado no controlo destes vectores continua a ser o uso de acaridas apesar das desvantagens que apresentam. As vacinas contra carraças não têm tido o impacto esperado devido à dificuldade em identificar antígenos eficazes. O antígeno calreticulina foi identificado em *R. annulatus* num estudo anterior onde foi demonstrado o seu envolvimento no processo de infecção por *B. bigemina*. Para testar este antígeno em ensaios de vacinação, a sua caracterização prévia é essencial. Uma alternativa de baixo custo para testar antígenos é a observação dos efeitos biológicos causados pela inoculação na carraça de drogas ou anticorpos contra uma determinada proteína. A alimentação artificial de carraças, apesar de não permitir a substituição de ensaios em gado, possibilita a obtenção de dados críticos na selecção de antígenos otimizando recursos. No estudo aqui apresentado pretendemos avaliar o efeito de anticorpos policlonais anti-antígenos de interesse no processo de alimentação e infecção, em carraças fêmea, *R. microplus*, alimentadas artificialmente.

Palavras Chave:

Vector; anticorpos policlonais; alimentação artificial; Babesiose; *Boophilus*.

Abstract

Ticks are obligate haematophagous ectoparasites that can transmit a wide variety of pathogens being considered the principal vectors of disease among animals. The piroplasms *Babesia bigemina* and *B. bovis* are transmitted mainly by *Rhipicephalus microplus* and *R. annulatus* ticks. Acaricides are still the most common method of tick control despite the disadvantages presented by them. Anti-tick vaccines despite promising are still inadequate mainly due to the lack of effective antigens. Calreticulin has been identified as being involved in *B. bigemina* infection in *R. annulatus* ticks in a prior study. It is essential to characterize this antigen before using it on a vaccination trial. A low cost alternative to test antigens is the observation of the biological effects caused by the inoculation of substances or antibodies against that antigen. Tick artificial feeding, even though it doesn't substitute vaccination trials in cattle, it allows to achieve critical data that for sure will optimize resources. Herein polyclonal antibodies raised against calreticulin were supplemented to a blood meal, offered in capillary tubes to partially engorged *R. microplus* females and their effect in feeding process as well as infection was analyzed.

Key Words:

Vector, *Boophilus*, polyclonal antibodies; artificial feeding; babesiose.

Introdução

O conceito “*One health*” reconhece a necessidade do trabalho conjunto de veterinários, médicos e cientistas ambientais dada a interface dinâmica entre pessoas, animais e ambiente. Este conceito é cada vez mais importante para doenças zoonóticas, tais como as doenças transmitidas por carrças que dependem de animais como reservatório [1]. As carrças são artrópodes resilientes e constantes no meio ambiente com um ciclo de vida complexo. Estes ectoparasitas hematófagos têm um efeito directo negativo no hospedeiro vertebrado enquanto se alimentam e mais importante actuam também com vectores, bem como reservatórios, de diversos agentes patogénicos [2].

As carrças *Rhipicephalus microplus*, anteriormente designadas *Boophilus microplus* são os ectoparasitas mais importantes na produção de gado bovino uma vez que não só levam a redução de peso, afectam a produção de leite e carne mas também estão envolvidos na transmissão de babesiose bovina (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e de anaplasmose (*Anaplasma marginale*) [3, 4] que são as doenças transmitidas por carrças (DTC's) mais prevalentes e com maiores custos na área de produção de gado [5].

A utilização de acaricidas químicos é uma das maiores componentes de entre os métodos de controlo actualmente utilizados, no entanto a sua aplicação é, na maioria dos casos incorrecta, o que provoca uma eficácia limitada em termos de redução das infestações; para além deste factor negativo a sua utilização promove não só a selecção de ixodídeos resistentes, como está associada a contaminação ambiental e contaminação do leite e carne [6, 7]. O desenvolvimento de novos acaricidas com características melhoradas seria uma perspectiva possível mas é um processo longo e dispendioso, reforçando a necessidade de alternativas. O desenvolvimento de vacinas anti carrça é uma alternativa com um potencial significativo visto que poderá combinar antígenos promovendo o combate tanto ao vector como ao agente patogénico [6, 8]. O objectivo principal de uma vacina contra artrópodes vectores é o controlo das infestações do vector tendo como consequência a redução de prevalência de doença transmitida por vector (DTV's). O impacto das vacinas nas DTV's pode ser confirmado por (a) redução da população de vectores levando a uma menor exposição dos hospedeiros susceptíveis a agentes patogénicos, (b) redução da capacidade vectorial do artrópode e, preferencialmente, (c) uma combinação destes últimos factores [9, 10]. Com a excepção do antígeno BM86, direccionado contra *R. microplus*, que alcançou o desejado *status* de vacina comercial [11-14], a identificação de antígenos eficazes continua a ser a maior limitação no desenvolvimento de novas vacinas [15]. Os avanços na caracterização de genomas de carrças bem como o uso da bioinformática, RNA de interferência (RNAi), mutagenese, transcriptómica, proteómica entre outras tecnologias, permitiu avanço significativo na área de

identificação de potenciais antígenos, tendo nos últimos anos aparecido um número considerável de nova informação [8, 16-23].

Recentemente foram identificados genes diferencialmente expressos em carrças *Rhipicephalus* fêmeas infectadas por *B. bigemina* usando genómica funcional [18]. A proteína Calreticulina (CRT) foi identificada como estando envolvida no processo de transmissão de *B. bigemina* em carrças *Rhipicephalus*. A CRT é uma proteína muito conservada tendo sido identificada em diversos organismos com a excepção de leveduras e procariotas [24]. Em carrças CRT é uma proteína que existe nas glândulas salivares e saliva sendo que devido às suas funções anti coagulação e de complemento, muito provavelmente é essencial na transmissão de agentes patogénicos e no processo de alimentação. Assim a possibilidade de usar esta proteína numa vacina contra carrças é evidenciada [25]. De facto esta proteína foi já utilizada em diversos estudos de imunização [26-28] com alguns resultados positivos. No entanto em ensaios de imunização com CRT recombinante em gado bovino, contra *R. microplus*, os resultados não foram encorajadores devido á baixa capacidade imunogénica desta proteína em bovinos [28].

A caracterização de potenciais antígenos protectores por vacinação tem um custo muito elevado especialmente quando direccionados a *R. microplus*. Esta carrça tem uma elevada especificidade de hospedeiro [29] e sua produção em laboratório tem muitos constrangimentos [30]. Assim a necessidade da existência de bovinos é quase sempre obrigatoriedade aquando da condução de experiências laboratoriais. Uma alternativa de baixo custo para testar novos compostos é a directa inoculação nas carrças de drogas ou anticorpos contra determinada proteína. Apesar de não abolir totalmente o uso de bovinos reduz significativamente a sua necessidade [31]. A alimentação artificial de carrças é uma técnica amplamente utilizada para diferentes propósitos [31-34], para além de mimetizar o processo natural de alimentação tem a vantagem de ser possível manipular a refeição de sangue. A técnica de alimentação artificial por tubos capilares pode ser utilizada em estudos de imunização/vacinação uma vez que anticorpos policlonais ou monoclonais podem ser suplementados á refeição [31, 32] e o seu efeito em parâmetros biológicos pode ser analisado posteriormente. Este é um método aparentemente rápido, simples e de baixo custo para caracterizar e seleccionar antígenos que futuramente poderão integrar um estudo de vacinação em bovinos.

No presente estudo grupos de carrças fêmeas adultas (*R. microplus* parcialmente alimentadas) foram alimentadas com sangue bovino suplementado de anticorpos policlonais anti CRT e também com sangue bovino infectado com *B. bigemina* suplementado dos mesmos anticorpos. A técnica de alimentação artificial por tubos capilares foi utilizada para analisar o efeito de anticorpos policlonais em parâmetros biológicos e na infecção por *B. bigemina*.

Materiais e métodos

O presente estudo foi desenvolvido em concordância com o guia de uso e manipulação de animais laboratoriais da Universidade de Querétaro, México.

1. Expressão e purificação de calreticulina recombinante

A sequência codificante correspondente à CRT foi obtida por PCR (*Polymerase chain reaction*). As sequências iniciadoras/*Primers* 5'-CACC AT GCG GCT TCT CTG CAT TTT G -3 e 5'- CAG TTC TTC GTG CTT GTG GTC -3' foram desenhadas usando como modelo a sequência presente no *Genbank*, AY395253. 200 ng cDNA de *R. annulatus* foram utilizados com o kit de PCR Advantage® 2 PCR polymerase mix (Clontech). Os produtos de PCR positivos foram purificados usando o kit illustra GFX™ PCR DNA (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante e posteriormente sequenciadas pela StabVida (Almada, Portugal) e analisadas. Para a expressão de rCRT com cauda poli-histidina foi utilizado o kit de expressão Champion™ pET101 directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen Life Technologies). Sumariamente, a sequência obtida anteriormente por PCR foi inserida no plasmídeo vector pET101/D-TOPO que depois foi utilizado para transformar células *E. coli* OneShot® cells (Invitrogen Life Technologies). A correcta inserção da sequência de interesse nos plasmídeos foi confirmada por sequenciação e o mesmo vector foi depois usado para transformar células BL21 Star™ (DE3) One Shot cells (Invitrogen Life Technologies). A expressão de rCRT foi induzida por IPTG (isopropiltiogalactosídeo) numa concentração final de 0,5 mM. A cultura celular foi lisada por sonicação e partir da fracção solúvel dos extractos as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna HisTrap HP (GE Healthcare). A pureza da amostra foi determinada por gel de SDS-PAGE e a concentração da rCTR foi calculada a partir do método de Bradford usando BSA (*bovine serum albumin*) como padrão.

2. Produção de anticorpos policlonais

Murganhos BALB/c de 4-6 semanas foram imunizados intraperitonealmente com 20µg de rCRT emulsionada com adjuvante de Freund incompleto (Sigma-Aldrich) em intervalos de 3 semanas até ser obtido um título de anticorpo satisfatório. Depois de 4 imunizações foi colhido sangue da cauda de cada murganho e o título de anticorpo foi determinado por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) indirecta. Depois de mais uma imunização para impulsionar a produção de anticorpos o murganho com melhor resposta imunogénica foi sacrificado por deslocamento cervical e todo sangue foi colhido. Por centrifugação o soro foi separado dos restantes compostos sanguíneos. O soro foi posteriormente utilizado em Western blotting como anticorpo primário para determinação do reconhecimento correcto da rCRT bem como nos ensaios de alimentação

artificial. Soro controlo, proveniente de murganhos imunizados apenas com PBS foi obtido de igual forma.

3. Alimentação artificial

Sangue bovino não infectado e infectado por Babesia bigemina

Para obter sangue infectado por *B. bigemina*, um vitelo Holstein de 6 meses foi esplenectomizado e 2 semanas mais tarde foi inoculado intravenosamente com 2×10^8 *B. bigemina* (estirpe Modellet) crio-preserveda. A infecção foi monitorizada pela temperatura corporal animal, hematócrito e esfregaços de sangue periférico. 5 a 6 dias depois da inoculação 500 ml de sangue bovino foi recolhido da veia jugular. O sangue não infectado foi obtido de igual forma de um bovino saudável livre de babesiose e anaplasiose.

Obtenção de carraças R. microplus

As carraças *R. microplus* (cepa Media Joya, CENAPA, México) utilizadas neste estudo foram produzidas na Universidade de Querétaro, Mexico. Originalmente estas carraças foram recolhidas de gado naturalmente infestado. Um vitelo de raça Holstein de 3 a 4 meses livre de babesiose e anaplasiose foi utilizado para obter as fêmeas *R. microplus*. O vitelo foi infestado no dia zero com 0.5 gramas de larvas *R. microplus* e 20 a 21 dias depois fêmeas adultas parcialmente alimentadas foram retiradas manualmente do vitelo.

Alimentação artificial por tubos capilares

As carraças recuperadas foram limpas, pesadas e fixas sobre uma bandeja de poliestireno (214 x 114 mm) com ajuda de fita-cola de dupla face. As fêmeas com peso inferior a 20 mg ou superior a 60 mg foram rejeitadas bem como as fêmeas com danos no aparelho bucal. Estes ensaios foram realizados em ambiente controlado a temperatura de 26-28°C e humidade relativa superior a 85%. Foram formados grupos experimentais de 15 fêmeas e a alimentação decorreu por 28h do seguinte modo: Grupo alimentado com sangue bovino, grupo alimentado com sangue bovino suplementado com soro anti-rCRT, grupo alimentado com sangue bovino suplementado de soro controlo. O mesmo desenho experimental foi utilizado para sangue bovino infectado com *B. bigemina*. Cerca de 10µl de soro foi oferecido a cada carraça. Tubos capilares de vidro (75 mm x 1,0 x 1.5 mm) sem anticoagulante foram cheios com a refeição sanguínea e colocados sobre as peças bucais das carraças estimulando a alimentação. Os tubos capilares foram reposicionados e substituídos sempre que necessário ou de 3 em 3 horas. Depois da alimentação as fêmeas foram retiradas das bandejas de poliestireno, pesadas para determinar ingestão de sangue e colocadas num tubo eppendorf 2 ml furado na tampa e mantidas numa incubadora a 27°C e humidade relativa de 85% para promover digestão de sangue e oviposição. A 5 carraças por grupo foi permitida a oviposição, tendo sido determinado o peso dos ovos. As restantes, 2 a 3 dias depois de terminada a alimentação, foram utilizadas para extracção de DNA e RNA a fim de determinar níveis de infecção e expressão de CRT. As comparações de incremento de peso bem como de peso de oviposição foram realizadas primeiro utilizando a ANOVA sendo que a hipótese nula proposta é que não existem diferenças significativas no incremento de peso ou oviposição dos grupos, seguida de uma análise

pelo teste *t*-student quando comparação de apenas 2 grupos ou ANOVA de factor único para comparação de 3 ou mais grupos com a hipótese nula de que não existem diferenças significativas entre os grupos.

Determinação de infecção por *B. bigemina*

Os níveis de infecção foram determinados por *PCR* quantitativo do gene 18s rDNA (Genbank AY603402) utilizando os primers 5'-AATAACAATACAGGGCTTTTCGTCT-3' e 5'-AACGCGA-GGCTGAAATACAAC-3'. A normalização foi feita contra o gene da carraça 16S rDNA pelo método $\Delta\Delta$ CT [35, 36]. Os níveis de infecção foram comparados entre carraças alimentadas com sangue infectado suplementado com soro anti rCRT e carraças alimentadas com sangue infectado e soro controlo através do teste *t*-student de variância desigual ($P \leq 0.05$).

Expressão diferencial do gene CRT

Foram comparados os níveis de expressão do gene CRT entre grupos utilizando *PCR* em tempo real com transcrição reversa. Os primers utilizados 5'-TGAGAGTCTTGTGGGGAAGG-3' e 5'-CGTCATCCTCCTTCTTGCTC-3' amplificam um fragmento de 171 pares de bases [18]. O kit utilizado foi o iScript One-Step RT-PCR Kit w/ SYBR Green (BioRad) no termociclador BioRad IQ5 com as condições finais de 10min a 50°C para transcrição reversa, seguido de 5min a 95°C para inativação da enzima transcriptase seguido de 40 ciclos de 15seg a 95°C, 30seg a 55°C e 30seg a 68°C. Os níveis de mRNA foram normalizados utilizando o gene de referência 16S rRNA (5'-GACA-AGAAGACCCTA-3' e 5'-ATCCAACATCGAGGT-3' previamente descritos por Zivkovic [37]) pelo método $\Delta\Delta$ CT [35, 36]. As diferenças entre grupos foram analisadas pelo teste *t*-student ($P \leq 0.05$).

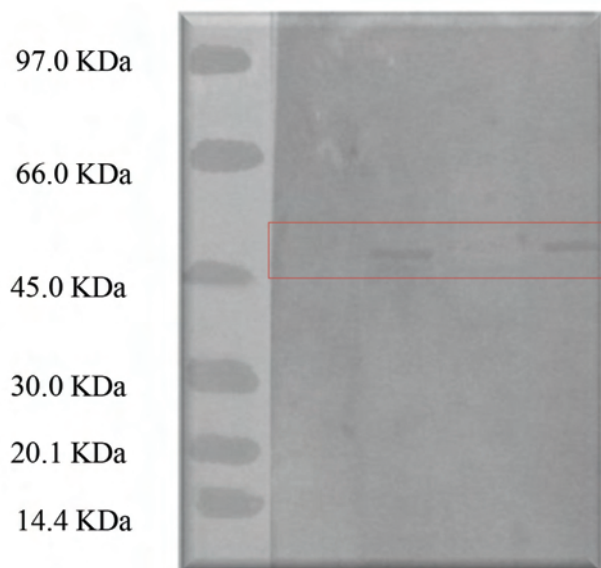


Fig. 2 - Análise por *Western blotting* da expressão da rCRTx6His utilizando anticorpo anti-histidina. Poço 1: Marcador de peso molecular, Low Molecular Weight calibration kit for SDS electrophoresis (GE Healthcare); Poço 2: Cultura de *E. coli* BL21 transformada não induzida a 37°C por 1 hora; Poço 3: Indução de proteína a 37°C por 1 hora; Poço 4: Cultura de *E. coli* BL21 transformada não induzida a 37°C por 2 horas; Poço 5: Indução de proteína a 37°C por 2 horas;

Resultados e Discussão

O gene calreticulina (CRT) foi seleccionado para estudos de caracterização. A sequência amplificada de cerca de 1250 pb (figura 1) foi comparada com sequências disponíveis de *R. annulatus* (AAR29939), *R. microplus* (AGK88372), *R. sanguineus* (AY395275), *Ixodes scapularis* (AY690335), *Amblyomma americanum* (U07708) e *Dermacentor variabilis* (AY241957) e como esperado foi obtida uma alta similaridade entre as sequências (Tabela 1).

Deve ser no entanto referido que a sequência utilizada para comparação possui apenas 1100pb (limitação do método

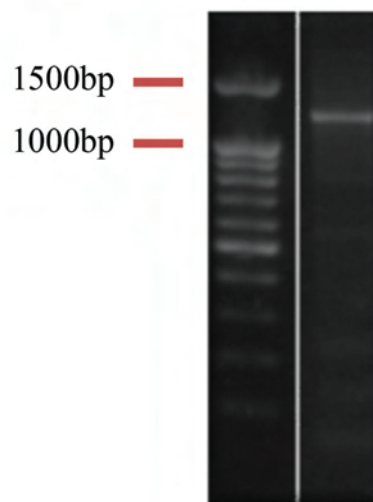


Fig. 1 - Amplificação do fragmento de interesse por *PCR*. Os resultados foram analisados por electroforese num gel de agarose a 1%/ 0.5x TBE com SYBRsafe. Poço 1: marcador de 100pb (Promega); Poço 2: Fragmento amplificado com cerca de 1250pb.

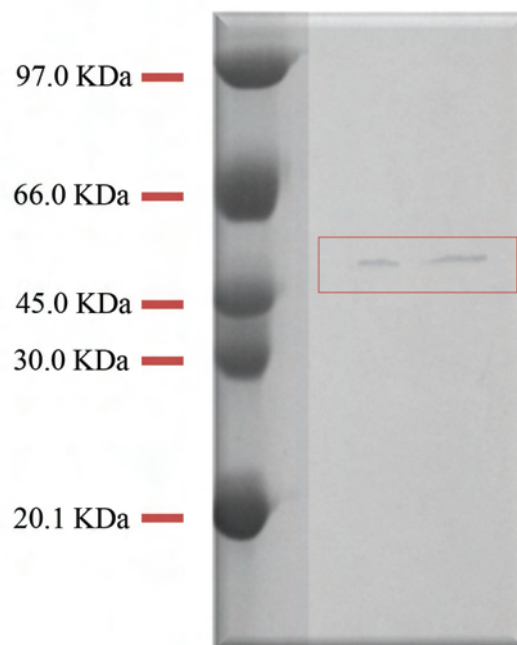


Fig. 3 - rCRT purificada. Gel SDS-PAGE a 12.5% corado com Coomassie-blue. Poço 1: Marcador de peso molecular, Low Molecular Weight calibration kit for SDS electrophoresis (GE Healthcare); Poço 2 e 3: 1µg de proteína recombinante purificada.

Tabela 1 - Comparação do fragmento obtido por PCR com seqüências nucleotídicas de CRT disponíveis na base de dados Genbank. Semelhança expressa em percentagem.

Seqüência CRT	<i>R. microplus</i> AY395254	<i>R. annulatus</i> AY395253	<i>R. sanguineus</i> AY395275	<i>I. scapularis</i> AY690335	<i>A. americanum</i> U07708	<i>D. variabilis</i> AY241957
Seqüência CRT	100	93,5	87,3	77,6	82,8	86
<i>R. microplus</i> AY395254.1	100	99,1	93,5	76,9	86,3	89,9
<i>R. annulatus</i> AY395253.1		100	93,3	77	86,2	89,8
<i>R. sanguineus</i> AY395275.1			100	76	85,5	89,5
<i>I. scapularis</i> AY690335.1				100	77	76,8
<i>A. americanum</i> U07708.1					100	87,8
<i>D. variabilis</i> AY241957.1						100

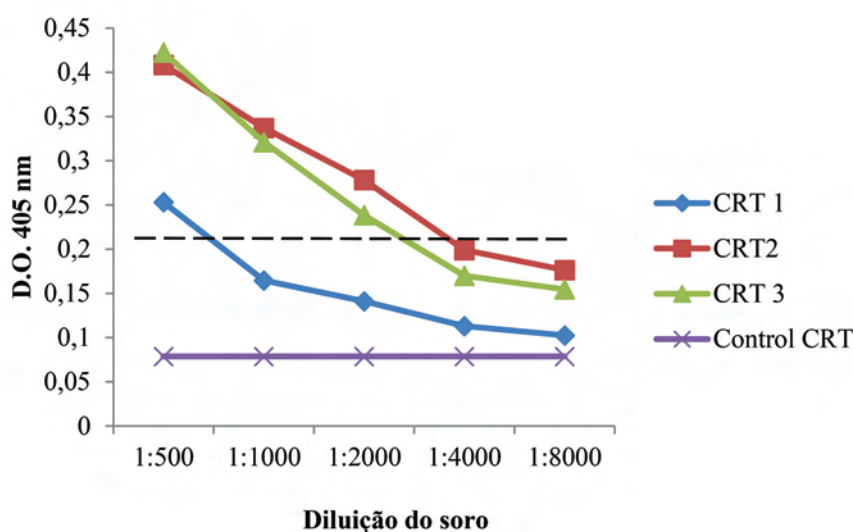


Fig. 4 - Título do soro de cada murgancho depois de 4 imunizações rCRT. A linha descontinua a preto representa o triplo do valor de D. O. do soro controle.

de sequenciação). Como pode ser observado pela figura 1 o fragmento possui tamanho superior pelo que foi decidido prosseguir para a expressão da proteína. Foi obtida a proteína recombinante com o peso esperado de cerca de 46kDa [26, 38] e purificada (figura 2 e 3).

A rCRT foi utilizada na imunização de murganchos BALB/c. Foram realizadas 5 imunizações e a resposta imunogénica foi seguida por ELISA (figura 4). O murgancho com melhor título de anticorpo foi seleccionado e sacrificado para colheita total do sangue.

Foi obtido cerca de 500 µl de soro policlonal que foi posteriormente utilizado nos ensaios de alimentação artificial de carraças. Grupos de carraças fêmeas adultas foram recolhidos de um vitelo livre de babesiose e alimentadas artificialmente (figura 5).

A tabela 1 sumariza os resultados obtidos relativamente aos parâmetros associados ao processo de alimentação nos ensaios de alimentação artificial. Como pode ser observado houve um incremento de peso significativo em todos os gru-

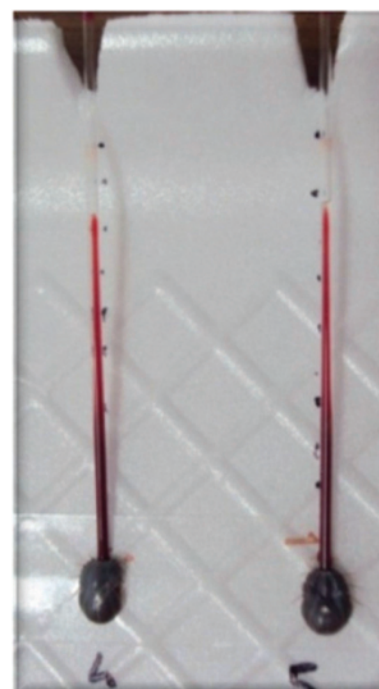


Fig. 5 - Alimentação artificial de *R. microplus*. Fêmeas parcialmente alimentadas foram recuperadas manualmente de um vitelo, limpas, pesadas e fixas numa bandeja de poliestireno com fita-cola de dupla face. As carraças foram alimentadas por 28 horas usando tubos capilares como exemplifica a foto.

pos sendo que a menor percentagem de incremento de peso ocorreu no grupo alimentado com sangue infectado e soro controle e o maior aumento ocorreu no grupo alimentado apenas com sangue infectado.

Estatisticamente não foram observadas diferenças significativas na % de incremento de peso entre o grupo alimentado com sangue bovino e o grupo alimentado com sangue infectado ($P > 0,05$) o que está de acordo com estudos anteriores que relatam a inexistência de influência da infecção na ingestão de sangue em *R. microplus* [39, 40]. Sendo assim os grupos poderão ser agrupados para analisar os parâmetros associados à alimentação. Comparando os 3 grupos verifica-se que existem diferenças significativas entre os grupos (ANOVA $F=4.23$ $P=0.018$). O grupo não exposto a anticorpos de qualquer tipo tem um incremento de peso superior aos restantes. Os grupos alimentados com soro (controle e anti-CRT) não apresentam diferenças significativas na percentagem de incremento de peso (teste *t*-student $P > 0.05$). Dadas as funções associadas à proteína CRT que parece ser essen-

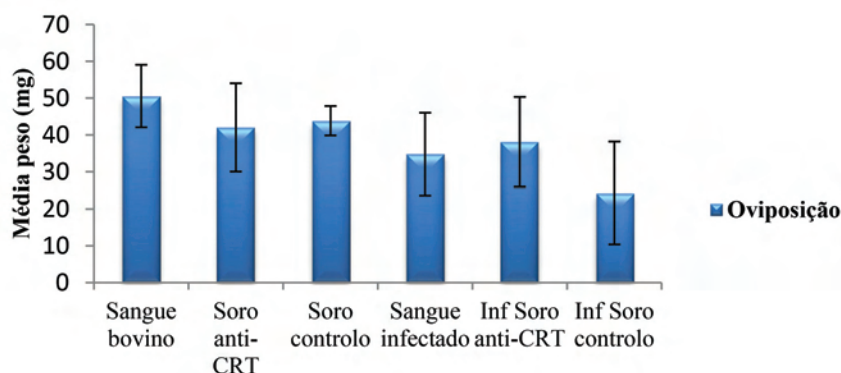


Fig. 6 - Oviposição média dos grupos de carraças alimentadas por tubos capilares. A 5 fêmeas por grupo, aleatoriamente escolhidas, foi permitido oviposição. Cada exemplar foi colocado num tubo eppendorf de 2 ml furado na tampa e colocado numa incubadora a 28°C e humidade relativa acima de 85% promovendo a oviposição.

Tabela 2 - Parâmetros associados com o processo de alimentação de fêmeas *R. microplus* parcialmente engorgitadas, alimentadas artificialmente por tubos capilares.

Grupos	Peso antes de AA (mg) med ± SD	Peso após AA (mg) med ± SD	Incremento de peso (mg) med ± SD	Incremento de peso % med ± SD
A-Sangue Bovino	32,7±6,8	116,6±19,9	83,8±20,7	134,1±48,1
B- Sangue inf. (<i>B. bigemina</i>)	32,9±9,4	126,2±41,6	93,3±36	195,2±45,6
C- Sangue + Soro anti-CRT	29,7±2,7	110,9±20,8	81,2±21,7	139,1±47,8
D- Sangue + Soro control	30,1±4,6	127,3±29,2	97,2±27,1	162,1±41,7
E- Sangue inf. + Soro control	30,3±8,3	91,4±29,2	61,1±26,1	104,5±43,3
F- Sangue inf. + Soro anti CRT	36,7±7,6	125,7±37,6	89,1±33,6	122,8±42,6

15 fêmeas por grupo foram alimentadas artificialmente por tubos capilares. Sangue infectado com *B. bigemina* a 0.7% de parasitemia ou sangue sem infecção suplementado ou não de anticorpos foi apresentado às carraças. Cerca de 10µl de soro foi oferecido a cada espécimen. Depois de 28h as carraças foram pesadas e colocadas numa incubadora por 2-3 dias para promover a digestão de sangue.

Tabela 3 - Níveis de infecção por *Babesia bigemina* de fêmeas parcialmente engorgitadas após alimentação artificial por tubos capilares

Níveis de infecção <i>B. bigemina</i> (Med ± DP)	
Sangue infectado <i>B. bigemina</i>	7,89E-03 ± 2,25E-02
Sangue infectado + soro controlo	4,36E-03 ± 9,07E-03
Sangue infectado + soro anti CRT	2,74E-03 ± 7,96E-03

15 fêmeas por grupo foram alimentadas artificialmente por tubos capilares com sangue bovino infectado com *B. bigemina* a uma parasitemia de 0.7% suplementado ou não com soro de murganho durante 28h. Os níveis de infecção foram calculados por PCR em tempo real usando o método $\Delta\Delta Ct$ usando o gene da carraça 16s rDNA como referência.

cial no processo de alimentação e transmissão de agentes patogénicos [18, 26, 41, 42], este resultado não era esperado, esperando-se uma redução no peso dos exemplares alimentados com anticorpos anti-CRT. O mesmo sucedeu no caso do parâmetro oviposição (figura 6) que demonstra não ser influenciado pela infecção (teste *t*-student $P > 0,05$) e ao comparar grupos alimentados com soro controlo e soro anti-CRT também não se observam diferenças significativas (teste *t*-student $P > 0,05$).

Este resultado pode dever-se a essencialmente ao facto da baixa imunogenicidade da proteína pois é uma proteína altamente conservada [27, 42, 43]. Desta forma a quantidade de anticorpos efectivamente anti CRT poderá ser baixa demais para promover eficazmente o bloqueio da proteína nativa na carraça. A análise por ELISA antes da colheita do soro do murganho demonstra um título baixo ou seja a semelhança entre a rCRT e a CRT existente no murganho é muito alta e o organismo falha a reconhecer a proteína recombinante como estranha. Por outro lado a comparação da sequência da proteína CRT com CRTs de mamíferos mostra que existem algumas diferenças entre estas proteínas o que sugere que existem epitopos que poderão ser indicados para a produção de anticorpos. A maior diferença encontrada é a ausência do sinal de retenção no retículo endoplasmático no caso das CRTs de carraças [42] que leva a que as proteínas sejam direccionadas para via secretora [25, 41]. Os domínios C e P são as regiões com maior grau de identidade [25, 44]. Assim possivelmente seria necessário aumentar o número de imunizações para obter um soro mais rico em anticorpos anti CRT. Uma alternativa viável é a produção de anticorpos monoclonais direccionados para estes epitopos diferentes. Além

da vantagem de serem direccionados apenas contra um epitopo, a tecnologia de obtenção de anticorpos monoclonais apresenta também o benefício de controlo de quantidade. O uso de soro no presente estudo se por um lado aumentou o número de anticorpos disponíveis na refeição, por outro limitou o controlo da quantidade de anticorpos específicos ingeridos pelos exemplares.

Em relação aos níveis de infecção por *Babesia bigemina* existe uma aparente redução nos níveis de infecção das carraças alimentadas com sangue infectado suplementado de soro anti-CRT quer quando comparado com o grupo alimentado apenas com sangue infectado ($\pm 65\%$) quer com o grupo alimentado com suplemento de soro controlo ($\pm 37\%$) (Tabela 2). No entanto estas diferenças não são estatisticamente significativas (teste *t*-student $P > 0,05$).

De igual forma a quantidade de anticorpos parece não ter sido suficiente para influenciar significativamente os níveis de infecção. No entanto a sugestão de que a infecção é reduzida aquando a ingestão de anticorpos anti-CRT está presente, incentivando a investigação do papel desta proteína no processo de infecção.

Relativamente á expressão do gene CRT verifica-se que existe uma diferença significativa na expressão deste gene entre o grupo alimentado com sangue infectado e o grupo alimentado com sangue saudável (teste *t*-student, $P > 0,05$) tal como verificado anteriormente [18] havendo um aumento de expressão na população alimentada com sangue infectado. Verifica-se ainda que no caso de alimentação com soro anti-CRT e sangue não infectado em comparação com alimentação de soro controlo existe uma diferença quase significativa ($P=0,06$) sendo significativa quando comparado com o grupo alimentado apenas com sangue ($P < 0,01$) sugerindo um efeito da ingestão de anticorpos anti-CRT na expressão do gene havendo um decréscimo de expressão nos grupos alimentados com anticorpos anti-CRT. No caso dos grupos experimentais alimentados com sangue infectado não foram verificadas diferenças significativas entre grupos. Comparando o grupo alimentado apenas com sangue infectado e o grupo alimentado com soro-anti-CRT verifica-se uma diferença nos níveis de CRT quase significativa ($P=0,06$) havendo neste caso um aumento de expressão no grupo com suplemento de soro anti-CRT. São necessários mais estudos para comprovar o envolvimento desta proteína no processo de infecção.

Conclusões Gerais

O objectivo central do presente foi comprovar o método de alimentação artificial de carraças como um método efectivo na escolha de antígenos passíveis de integrar um estudo de vacinação animal. A alimentação artificial de fêmeas *R. microplus* foi estabelecida com sucesso tendo havido um incremento de peso muito significativo em todos os grupos experimentais. A proteína recombinante calreticulina foi expressa com êxito no sistema de expressão *E. coli* no entanto devido a ser um proteína muito conservada a imunização de murganhos resultou numa baixa resposta imunitária por parte dos murganhos levando a que não fossem conseguidos títulos altos de anticorpo anti CRT. Assim a alimentação artificial de carraças com soro anti-CRT não teve os resultados esperados visto que não foram observadas reduções significativas quer no incremento de peso, quer no peso da progénie (ovos). O mesmo sucedeu nos níveis de infecção por *B. bigemina* nos grupos alimentados com sangue infectado que, apesar de aparentemente decrescerem no grupo alimentado com soro anti-CRT, não são estatisticamente significativos. Com estes resultados pode concluir-se que apesar da técnica de alimentação artificial de carraças ser uma ferramenta útil na selecção de antígenos eficazes contra carraças, a calreticulina não parece ser um bom candidato desenvolvimento de vacinas recombinantes. São necessários mais estudos focados em epitopos específicos desta proteína que possam superar a alta conservação da proteína na resposta imunitária do vertebrado. Anticorpos monoclonais poderão também ser a chave para a obtenção de resultados mais encorajadores uma vez que além de serem direccionados/específica de um epitopo a quantidade de anticorpos pode ser controlada.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal, projecto PTDC/CVT/112050/2009. A Sandra Antunes foi também financiada pela FCT com a bolsa de doutoramento SFRH/BD/48251/2008. Octávio Merino é financiado pelo Post-graduate training network for capacity building to control ticks and tick-borne diseases integrado no programa FP7-PEOPLE – ITN (EU Grant No. 238511).

Bibliografia

1. Breitschwerdt EB: Comparative medical importance of a one health approach to emerging tick-borne diseases; in Press TNA (ed) Critical needs and gaps in understanding prevention, amelioration, and resolution of lyme and other tick-borne diseases. Washington, D.C., The National Academies Press, 2011, pp 49-53.
2. Jongejan F, Lilenberg G: The global importance of ticks. *Parasitology* 2004;129:S3-S14.
3. Almazan C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, de la Fuente J: Identification and characterization of rhipicephalus (boophilus) microplus candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology Research* 2010;106:471-479.
4. Peter RJ, Van den Bossche P, Penzhorn BL, Sharp B: Tick, fly, and mosquito control - lessons from the past, solutions for the future. *Journal of the South African Veterinary Association-Tydskrif Van Die Suid-Afrikaanse Veterinere Vereniging* 2009;80:121-121.
5. Suarez CE, Noh S: Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology* 2011;180:109-125.
6. Graf JF, Gogolewski R, Leach-Bing N, Sabatini GA, Molento MB, Bordin EL, Arantes GJ: Tick control: An industry point of view. *Parasitology* 2004;129:S427-S442.
7. George JE, Pound JM, Davey RB: Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology* 2004;129:S353-S366.
8. Guerrero FD, Miller RJ, de Leon AAP: Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *International Journal for Parasitology* 2012;42:421-427.
9. de la Fuente J, Kocan KM, Blouin EF: Tick vaccines and the transmission of tick-borne pathogens. *Veterinary Research Communications* 2007;31:85-90.
10. Merino O, Alberdi P, Pérez de la Lastra J, de la Fuente J: Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 2013;3
11. Canales M, Almazan 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 Biotechnology* 2009;9
12. Rodriguez M, Rubiera R, Penichet M, Montesinos R, Cremata J, Falcon V, Sanchez G, Bringas R, Cordoves C, Valdes M, Leonart R, Herrera L, Delafuente J: High-level expression of the b-microplus bm86 antigen in the yeast pichia-pastoris forming highly immunogenic particles for cattle. *Journal of Biotechnology* 1994;33:135-146.
13. Willadsen P, Riding GA, McKenna RV, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, Lahnstein J, Cobon GS, Gough JM: Immunological control of a parasitic arthropod - identification of a protective antigen from boophilus-microplus. *Journal of Immunology* 1989;143:1346-1351.
14. Willadsen P: Tick control: Thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology* 2006;138:161-168.
15. Parizi LF, Githaka NW, Logullo C, Konnai S, Masuda A, Ohashi K, Vaz IdS, Jr.: The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. *Veterinary Journal* 2012;194:158-165.
16. Almazan C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J: Identification of protective antigens for the control of ixodes scapularis infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 2003;21:1492-1501.
17. Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YFC, Siebert PD: Suppression subtractive hybridization: A versatile method for identifying differentially expressed genes. *Cdna Preparation and Characterization* 1999;303:349-380.
18. Antunes S, Galindo RC, Almazan C, Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Shkap V, do Rosario V, de la Fuente J, Domingos A: Functional genomics studies of rhipicephalus (boophilus) annulatus ticks in response to infection with the cattle protozoan parasite, babesia bigemina. *International Journal for Parasitology* 2012;42:187-195.
19. Drewes CC, Dias RYS, Hebeda CB, Simons SM, Barreto SA, Ferreira Junior JM, Chudzinski-Tavassi AM, Farsky SHP: Actions of the kunitz-type serine protease inhibitor amblyomin-x on vegf-a-induced angiogenesis. *Toxicon* 2012;60:333-340.
20. 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 and Tick-Borne Diseases* 2012;3:179-187.
21. Mulenga A, Kim TK, Ibelli AMG: Deorphanization and target validation of cross-tick species conserved novel amblyomma americanum tick saliva protein. *International Journal for Parasitology* 2013;43:439-451.
22. Shahein YE, Abouelella AM, Hussein NA, Hamed RR, El-Hakim AE, Abdel-Shafy S, Tork SE: Identification of four novel rhipicephalus annulatus upregulated salivary gland proteins as candidate vaccines. *The protein journal* 2013;32:392-398.
23. Heekin A, Guerrero F, Bendele K, Saldivar L, Scoles G, Dowd S, Gondro C, Nene V, Dikeng A, Brayton K: Gut transcriptome of replete adult female cattle ticks, rhipicephalus (boophilus) microplus, feeding upon a babesia bovis-infected bovine host. *Parasitol Res* 2013;Jun 10. [Epub ahead of print]
24. Persson S, Rosenquist M, Sommarin M: Identification of a novel calreticulin isoform (crt2) in human and mouse. *Gene* 2002;297:151-158.
25. Kaewhom P, Stich RW, Needham GR, Jittapalpong S: Molecular analysis of calreticulin expressed in salivary glands of rhipicephalus (boophilus) microplus indigenous to thailand. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Prediction and Prevention* 2008;1149:53-57.
26. Gao J, Luo J, Fan R, Fingerle V, Guan G, Liu Z, Li Y, Zhao H, Ma M, Liu J, Liu A, Ren Q, Dang Z, Sugimoto C, Yin H: Cloning and characterization of a cDNA clone encoding calreticulin from haemaphysalis qinghaiensis (acari : Ixodidae). *Parasitology Research* 2008;102:737-746.
27. Parizi LF, Rech H, Sanchez Ferreira CA, Imamura S, Ohashi K, Onuma M, Masuda A, Vaz IdS, Jr.: Comparative immunogenicity of haemaphysalis longicornis and rhipicephalus (boophilus) microplus calreticulins. *Veterinary Parasitology* 2009;164:282-290.
28. Rachinsky A, Guerrero FD, Scoles GA: Proteomic profiling of rhipicephalus (boophilus) microplus midgut responses to infection with babesia bovis. *Veterinary Parasitology* 2008;152:294-313.
29. Willadsen P, Kemp DH, McKenna RV: Bloodmeal ingestion and utilization as a component of host specificity in the tick, boophilus-microplus. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde-Parasitology Research* 1984;70:415-420.
30. Loomis EC: Rearing of boophilus-microplus (acarina-ixodidae) on laboratory rabbit. *Annals of the Entomological Society of America* 1971;64:598.
31. Gonsioroski AV, Bezerra IA, Utiumi KU, Driemeier D, Farias SE, Vaz IdS, Jr., Masuda A: Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in rhipicephalus (boophilus) microplus females. *Experimental Parasitology* 2012;130:359-363.
32. Almazan C, Blas-Machado U, Kocan KM, Yoshioka JH, Blouin EF, Mangold AJ, de la Fuente J: Characterization of three ixodes scapularis cDNAs protective against tick infestations. *Vaccine* 2005;23:4403-4416.
33. Broadwater AH, Sonenshine DE, Hynes WL, Ceraul S, De Silva AM: Glass capillary tube feeding: A method for infecting nymphal ixodes scapularis (acari : Ixodidae) with the Lyme disease spirochete borrelia burgdorferi. *Journal of Medical Entomology* 2002;39:285-292.
34. Matsuo T, Inoue N, Ruheta MR, Taylor D, Fujisaki K: Tickcidal effect of monoclonal antibodies against hemocytes, om21, in an adult female tick, ornithodoros moubata (acari : Argasidae). *Journal of Parasitology* 2004;90:715-720.
35. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C) method. *Methods* 2001;25:402-408.
36. Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H: Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel "Gene expression's c-t difference" Formula. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 2006;84:901-910.
37. Zivkovic Z, Torina A, Mitra R, Alongi A, Scimeca S, Kocan KM, Galindo RC, Almazan C, Blouin EF, Villar M, Nijhof AM, Mani R, La Barbera G, Caracappa S, Jongejan F, de la Fuente J: Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. *Bmc Immunology* 2010;11:12.
38. Fliegel L, Burns K, MacLennan DH, Reithmeier RAF, Michalak M: Molecular-cloning of the high-affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal-muscle sarcoplasmic-reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 1989;264:21522-21528.
39. Guglielmo AA, Mangold AJ, Aguirre DH, Gaido AB, Deolsen AA: The effect of infection by babesia sp on some biological parameters of engorged females of boophilus microplus. *Folia Parasitologica* 1989;36:1-6.
40. Cen-Aguilar JF, Rodriguez-Vivas RI, Dominguez-Alpizar JL, Wagner GG: Studies on the effect of infection by babesia sp. On oviposition of boophilus microplus engorged females naturally infected in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology* 1998;78:253-257.
41. Jaworski DC, Simmen FA, Lamoreaux W, Coons LB, Muller MT, Needham GR: A secreted calreticulin protein in ixodid tick (amblyomma-americanum) saliva. *Journal of Insect Physiology* 1995;41:369-375.
42. Michalak M, Corbett EF, Mesaali N, Nakamura K, Opas M: Calreticulin: One protein, one gene, many functions. *Biochemical Journal* 1999;344:281-292.
43. Xu GA, Fang QQ, Keirans JE, Durden LA: Cloning and sequencing of putative calreticulin complementary DNAs from four hard tick species. *Journal of Parasitology* 2004;90:73-78.
44. Ferreira CAS, Vaz IdS, da Silva SS, Haag KL, Valenzuela JG, Masuda A: Cloning and partial characterization of a boophilus microplus (acari : Ixodidae) calreticulin. *Experimental Parasitology* 2002;101:25-34.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não existem quaisquer conflitos de interesse.