

FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

BRUNA FERREIRA LEAL

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA RICA EM GLICINAS E DA PARAMIOSINA DO  
CARRAPATO *Rhipicephalus microplus***

Porto Alegre  
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BRUNA FERREIRA LEAL

**Caracterização de uma proteína rica em glicinas e da paramiosina  
do carrapato *Rhipicephalus microplus***

Porto Alegre

2017

BRUNA FERREIRA LEAL

**Caracterização de uma proteína rica em glicinas e da paramiosina  
do carrapato *Rhipicephalus microplus***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e Molecular da  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do  
Sul.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr.

Porto Alegre

2017

## Ficha Catalográfica

L435 Leal, Bruna Ferreira

Caracterização de uma proteína rica em glicinas e da paramiosina do carrapato *Rhipicephalus microplus* / Bruna Ferreira Leal . – 2017.

143 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira.

Co-orientador: Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Júnior.

1. *Rhipicephalus microplus*. 2. paramiosina. 3. proteína rica em glicinas. 4. proteínas salivares. 5. relação parasito-hospedeiro. I. Ferreira, Carlos Alexandre Sanchez. II. Vaz Júnior, Itabajara da Silva. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BRUNA FERREIRA LEAL

**Caracterização de uma proteína rica em glicinas e da paramiosina  
do carrapato *Rhipicephalus microplus***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira

Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Prof. Dr. Cristiano Valim Bizarro

Porto Alegre

2017

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira pela oportunidade, pela dedicação e pelo aprendizado proporcionado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr. pelo auxílio e pelo aprendizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do RioGrande do Sul (FAPERGS), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM) pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Imunologia e Microbiologia da PUCRS, principalmente Stephanie Wagner Gallo, Bruna Kern Donamore, Belisa Ávila Rodrigues, Valdir Cristóvão Barth Jr., Bruno Dall’Agnol, Samara Paula Mattiello e Maria Claudia Rosa Garcia pela troca de conhecimentos e experiências e pela amizade.

Aos alunos de iniciação científica Huama Santos, Sofia Magalhães, Kerstin Camile Creutzberg, Alexandra Santos e Peterson Vargas, que auxiliaram na realização desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal da UFRGS, principalmente María Fernanda Alzugaray, Lucía Sánchez Di Maggio, Lucas Tirloni e Luís Fernando Parizi, pela ajuda na realização desse projeto.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Adriana Seixas pelo auxílio técnico e aprendizado proporcionado.

À Dr<sup>a</sup>. Gaby Renard, Betânia Souza de Freitas e Joanna Inês Ayres Reis pelo auxílio técnico e pela paciência.

Às amigas que fiz no início da graduação e permanecem até hoje ao meu lado: Anelise Baptista, Thaína Saldanha e Cristina Irber, obrigada pelos bons momentos, por me escutarem, pelos concelhos e pela amizade.

Aos meus pais Rogério e Laura por todos esses anos de preocupação, de amor e carinho.

À minha família felina e canina, por todos os momentos de alegria.

E a todos aqueles que de alguma forma ajudaram na realização desse trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)



## RESUMO

O *Rhipicephalus microplus* é um carrapato que infesta preferencialmente bovinos, causando um grande prejuízo à pecuária. O principal método de controle é o uso de acaricidas, os quais selecionam populações resistentes, além de aumentar o custo e o risco de contaminação da carne, do leite e do ambiente. Desta forma, antígenos vacinais têm sido identificados e caracterizados como alternativa aos acaricidas. Moléculas salivares de parasitos hematófagos podem inibir respostas associadas à homeostase e modular o sistema imune do hospedeiro e, portanto, são opções na busca por vacinas anti-carrapato. Neste contexto, este trabalho caracterizou uma proteína rica em glicinas e a paramiosina do *R. microplus*. Proteínas ricas em glicinas são secretadas na saliva e são essenciais na fixação e na alimentação do parasito. Já a paramiosina é capaz de evadir o sistema imune do hospedeiro e mostrou-se um importante alérgeno em ácaros e antígeno vacinal contra helmintos. As sequências de cDNA e aminoácidos da proteína rica em glicinas de *R. microplus* (RmPRG) foram identificadas e analisadas, revelando duas porções distintas da proteína (com glicinas isoladas ao longo da região N-terminal e padrões repetidos contendo glicinas ao longo da região C-terminal). A clonagem, expressão e purificação da RmGRP foram realizadas e a proteína recombinante foi testada quanto ao reconhecimento por soros de bovinos naturalmente e experimentalmente infestados, indicando a sua antigenicidade, mas também uma alta heterogeneidade no reconhecimento da proteína entre indivíduos e entre infestações no mesmo indivíduo. Além disso, a RmGRP recombinante foi reconhecida pelos soros de coelhos imunizados com saliva e glândula salivar de fêmeas parcialmente e totalmente ingurgitadas e ovos, mas não por soros de coelhos imunizados com intestino. A expressão do gene codificante para a RmGRP (*rmgrp*) em diferentes tecidos de fêmeas e fases do desenvolvimento do carrapato foi avaliada por qRT-PCR. A transcrição do gene foi encontrada em ovos, larvas, machos adultos, além de glândulas salivares, corpos gordurosos e ovários de fêmeas parcialmente e totalmente ingurgitadas, apresentando os maiores níveis de expressão nas larvas de 1 dia e nas glândulas salivares de fêmeas totalmente ingurgitadas. *rmgrp* não foi expresso nos ovos de 3 e 6 dias e no intestino de fêmeas parcialmente e totalmente ingurgitadas, corroborando o resultado anterior. Ainda foram avaliados os efeitos do silenciamento do RNAm correspondente à RmGRP e à RmPRM, o que resultou na redução da taxa de postura de ovos no grupo em que o gene da RmPRM foi silenciado e da eclosão de larvas em fêmeas tratadas nos dois grupos. Portanto, sugere-se que as duas proteínas são importantes durante o desenvolvimento larval, mas só a RmPRM seja necessária na formação e/ou postura dos ovos. Também foi realizada a

clonagem da região codificante e expressão dos fragmentos N-terminal, interno e C-terminal da paramiosina de *R. microplus* (RmPRM) em *E. coli* e da RmPRM completa em *P. pastoris*, sendo confirmadas por SDS-PAGE e western-blot. A partir dos dados obtidos, ambas RmGRP e RmPRM apresentam características que fazem delas possíveis candidatas a comporem uma vacina coquetel contra o *R. microplus*.

**Palavras-chave**

*Rhipicephalus microplus*; paramiosina; proteína rica em glicinas; proteínas salivares; relação carrapato-hospedeiro.

## ABSTRACT

*Rhipicephalus microplus* is a tick that infests preferably bovines and cause a great damage in the livestock. The main control method against ticks is the use of acaricides, which lead to the emergence of resistant populations, in addition to increasing costs and risk of contamination of meat, milk and environment. Thus, vaccine antigens have been identified and characterized as an alternative to acaricides. Salivary molecules of hematophagous parasites can inhibit responses associated to homeostasis and modulate the host immune system and, therefore, are options in the search for anti-tick vaccines. This work characterized a glycine rich-protein and the paramyosin of *R. microplus*. Glycine rich-proteins are secreted in tick saliva and are essential in the attachment and blood feeding. Paramyosin is able to evade the host immune system and proved to be an important allergen of mites and vaccine antigen against helminths. The cDNA and amino acid sequences of the *R. microplus* glycine rich-protein (RmGRP) were identified and analyzed, revealing two distinct portions of the protein (glycine residues presented dispersed in the N-terminal region and in repeated patterns along the C-terminal region). Cloning, expression and purification of RmGRP were performed and the recombinant protein was tested for recognition by sera from naturally and experimentally infested bovines, indicating their antigenicity, but also displaying a high heterogeneity in protein recognition between individuals and among infestations in the same individual. In addition, recombinant RmGRP was recognized by sera from rabbits immunized with saliva and salivary gland from partially and fully engorged females and eggs, but not from sera from rabbits immunized with gut. Expression of the gene encoding RmGRP (*rmgrp*) in different female tissues and tick development stages was evaluated by qRT-PCR. Gene transcription was found in eggs, larvae, adult males, salivary glands, fat bodies and ovaries of partially and fully engorged females, with the highest expression levels in 1-day-old larvae and salivary glands of fully engorged females. *rmgrp* was not expressed in 3- and 6-day-old eggs and in guts of partially and fully engorged females, corroborating to the aforementioned result. Effects of RNAm silencing corresponding to RmGRP and RmPRM were evaluated, which resulted in egg laying reduction in the group in which the RmPRM gene was silenced and in the reduction of larval hatching rate in the two groups. Therefore, it is suggested that both proteins are important during larval development, but only RmPRM is required in egg formation and/or laying. Cloning of the coding DNA regions and expression of N-terminal, internal and C-terminal fragments of *R. microplus* paramyosin (RmPRM) in *Escherichia coli* and of the complete RmPRM in *Pichia pastoris* were confirmed by SDS-PAGE and western-blot. From

the data obtained, both RmGRP and RmPRM have characteristics that make them possible candidates to compose a cocktail vaccine against *R. microplus*.

**Keywords:** *Rhipicephalus microplus*; paramyosin; glycine rich-protein; salivary proteins; tick-host relationship.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos predita do cDNA codificador da paramiosina de *Rhipicephalus microplus*.....94
- Figure 2 - SDS-PAGE 12% e western-blot dos fragmentos N-terminal, interno e C-terminal da RmPRM parcialmente purificados por cromatografia de afinidade.....100
- Figura 3 - Western-blot da expressão da RmPRM em *P. pastoris*.....101
- Figura 4 - Silenciamento de *rmprm* no ovário de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* 24 h após o tratamento com dsRmPRM ou dsMSP1 (controle).....104

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos do silenciamento gênico a partir do tratamento de fêmeas parcialmente ingurgitadas com dsRmPRM.....	103
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - adenina

Ago-3 – argonauta-3

APS – persulfato de amônio

BCIP –5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphato*)

BMGY - meio complexo tamponado com glicerol

BMMY - meio complexo tamponado com metanol

C - citosina

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

Da - Dalton

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNase - desoxirribonuclease

dsMSP1 – RNA fita dupla codificador da proteína da superfície do merozoíto-1 de *P. falciparum*

dsRNA – RNA fita dupla (double-stranded RNA)

dsRmGRP – RNA fita dupla codificador da proteína rica em glicinas de *R. microplus*

dsRmPRM – RNA fita dupla codificador da paramiosina de *R. microplus*

DTT - ditioneitol

EST –*expressed sequence tags*

Fc – fração cristal

G - guanina

GST – glutationa-S-transferase

IGBPs – proteínas que se ligam a imunoglobulinas

IgG – imunoglobulina G

IgG1 – imunoglobulina G 1

IPTG - isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

LB – Luria-Bertani

MSP-1 – proteína da superfície do merozoíto-1 (Merozoite surface protein-1) de *Plasmodium falciparum*

*msp-1* – gene codificador da proteína da superfície do merozoíto-1 de *P. falciparum*

NBT – nitroazul de tetrazólio

PBS – tampão fosfato salina

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

PRG (GRP) - Proteína rica em glicinas (glycine rich-protein)

PRM – paramiosina

qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real

rcf – força centrífuga relativa

REST – Ferramenta para Análise de Expressão Relativa (*Relative Expression Software Tool*)

RISC – complexo de silenciamento induzido por RNA

RmPRG/ RmGRP – proteína rica em glicinas (glycine rich-protein) de *Rhipicephalus microplus*

*rmgrp* – gene codificador da proteína rica em glicinas de *R. microplus*

RmPRM – paramiosina de *R. microplus*

*rmprm* - gene codificador da paramiosina de *R. microplus*

RNA – ácido ribonucleico

RNAi – RNA interferência

RNAm – RNA mensageiro

RNAse - ribonuclease

rpm – rotação por minuto

rRmGRP – proteína rica em glicinas de *R. microplus* recombinante

rRmPRM – paramiosina de *R. microplus* recombinante

SDS – dodecil sulfato de sódio

siRNA – pequenos RNAs interferentes

T - timina

YNB - base de nitrogênio para leveduras

YPD – extrato de levedura-peptona-dextrose

YPDS - extrato de levedura-peptona-dextrose-sorbitol



## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1</b> .....	17
1.1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	18
1.1.2 Métodos de controle.....	19
1.1.3 Resistência naturalmente adquirida.....	19
1.1.4 A busca por antígenos protetores.....	21
1.1.5 Métodos para a identificação de novos antígenos protetores.....	25
1.1.5.1 RNA interferência.....	26
1.1.6 Antígenos salivares.....	28
1.1.6.1 Proteínas ricas em glicinas.....	30
1.1.6.2 Paramiosina.....	33
1.2 OBJETIVOS.....	38
1.2.1 Objetivo geral.....	38
1.2.2 Objetivos específicos.....	38
<b>Capítulo 2</b> .....	39
ARTIGO CIENTÍFICO.....	42
<b>Capítulo 3</b> .....	91
RESULTADOS PARCIAIS.....	91
3.1 Introdução.....	92
3.2 Materiais e métodos.....	93
3.2.1 Clonagem das regiões N-terminal, interna e C-terminal da RmPRM em vetor procarionótico.....	93
3.2.2 Expressão em <i>E. coli</i> e purificação das proteínas recombinantes.....	95
3.2.3 Clonagem e expressão da RmPRM em <i>P. pastoris</i> .....	95
3.2.4 SDS-PAGE e western-blot.....	97
3.2.5 RNA interferência.....	97
3.2.6 Análise estatística.....	99
3.2.7 Aspectos éticos.....	99
3.3 Resultados.....	99
3.3.1 Clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	99
3.3.2 Expressão da RmPRM em <i>P. pastoris</i> .....	101
3.3.3 Silenciamento da RmPRM .....	102

<b>Capítulo 4</b> .....	105
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
REFERÊNCIAS.....	111
APÊNDICES.....	132
APÊNDICE A - Soluções.....	132
ANEXOS.....	139
ANEXO A - Carta de Aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais.....	139

# **Capítulo 1**

**Introdução**

**Objetivos**

## 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.1.1 *Rhipicephalus microplus*

O *Rhipicephalus microplus* (Cenestrini, 1888) é um carrapato classificado no filo Arthropoda, classe Aracnida, subclasse Acari, ordem Ixodida, família Ixodidae e subfamília Rhipicephalinae (1). Esta espécie previamente pertenceu ao gênero *Boophilus*, porém, Murrell et al. (2) analisaram a filogenia de Rhipicephalinae e apresentaram *Rhipicephalus* como um gênero parafilético, no qual o gênero monofilético *Boophilus* estava inserido. Desta forma, as espécies incluídas no gênero *Boophilus* foram reclassificadas para *Rhipicephalus* e, além disso, *Boophilus* foi considerado um subgênero (3).

O *R. microplus* é um ectoparasito de um único hospedeiro (monoxeno) que infesta preferencialmente bovinos (4) e apresenta seu ciclo de vida dividido em duas fases: parasitária e de vida-livre. Na maior parte do ciclo de vida, o carrapato fica abrigado em micro habitats junto ao solo (em torno de 32 dias), enquanto que, somente em uma menor parte do ciclo (em torno de 21 dias), o carrapato se fixa no hospedeiro para se alimentar de sangue (5).

A fase parasitária inicia com a infestação pela larva, que se fixa no hospedeiro e se alimenta inicialmente de plasma. Após o 8º dia de fixação, as larvas sofrem ecdise e originam as ninfas, que passam a se alimentar de sangue; essas sofrem uma nova metamorfose, ocorrendo a diferenciação morfológica entre machos e fêmeas. As fêmeas jovens são denominadas neóginas e quando se tornam parcialmente ingurgitadas são denominadas partenóginas (18º dia), enquanto que as fêmeas totalmente ingurgitadas são chamadas teleóginas (21º dia). A fecundação ocorre a partir do 17º dia, ocorrendo, posteriormente, um rápido ingurgitamento até chegar à fase de teleóquina, no qual as fêmeas se desprendem do hospedeiro e caem no solo, onde fazem a postura dos ovos, o que finaliza a fase parasitária e dá início a fase de vida livre (6-9).

Os carrapatos podem transmitir vírus, bactérias, helmintos e protozoários para os hospedeiros vertebrados (10), sendo o segundo transmissor de patógenos que causam doenças em humanos, animais domésticos e selvagens, atrás somente dos mosquitos. A infestação pelo *R. microplus* pode causar anemia intensa no gado tanto pela própria hematofagia, quanto pela tristeza parasitária bovina, causada por patógenos como *Anaplasma* spp. e *Babesia* spp. e transmitidos pelo carrapato (11,12).

O *R. microplus*, originário do sudoeste da Ásia, foi introduzido nos trópicos chegando a Austrália, Sul e Leste da África e América do Sul e Central (4). Atualmente é um grande

problema econômico que gera alto impacto na criação de gado e na produção de leite e, conseqüentemente, afeta países em desenvolvimento na África, Ásia e América Latina que dependem da pecuária (13). As perdas econômicas causadas pelo *R. microplus* no Brasil foram estimadas por Grisi et al. (14) em 3,24 bilhões de dólares anualmente.

### **1.1.2 Métodos de controle de carrapatos**

Os métodos convencionais de controle do carrapato são baseados no uso de acaricidas, porém os seus resíduos podem causar sérios impactos no meio ambiente e contaminar o leite e a carne (15,16). Além disso, a utilização dos acaricidas apresenta um alto custo e, com o uso intensivo, selecionam populações resistentes a uma ampla gama de classes de acaricidas como amidinas, piretróides, ivermectinas, organofosforados, entre outros químicos (17-19), o que indica a necessidade de novos métodos de controle. O desenvolvimento de uma vacina tem sido considerado um dos métodos mais promissores para eliminar o carrapato, uma vez que os custos para a produção são baixos, a taxa de mutação dos genes codificantes para os antígenos deve ser menor do que a taxa de seleção de carrapatos resistentes aos pesticidas/acaricidas, além de não poluir o meio ambiente, sem gerar produtos com resíduos químicos para o consumo (15, 20, 21). Entretanto, a identificação e caracterização de uma ampla gama de antígenos protetores ao *R. microplus* ainda é necessária (22, 23).

### **1.1.3 Resistência naturalmente adquirida**

A resistência naturalmente adquirida ao carrapato é uma habilidade do hospedeiro de montar uma resposta imune contra antígenos do carrapato que entram em contato com o mesmo durante a alimentação, como os componentes da saliva, ao longo de sucessivas infestações (24). Os bovinos exibem fenótipos divergentes de resistência e suscetibilidade à infestação por *R. microplus*. Estas divergências apresentam base hereditária e foram constatadas entre as diferentes raças de bovinos (25). Bovinos *Bos indicus* apresentam maior resistência ao *R. microplus*, fato que se deve provavelmente a muitos anos de co-evolução com o parasito, uma vez que os dois são originários da Ásia, enquanto que o *Bos taurus* (com origem na Europa), mais recentemente exposto ao carrapato, apresenta maior suscetibilidade (26). Por outro lado, ao longo da sucessão das infestações, os bovinos tendem a apresentar

níveis gradativamente menores de parasitos que completam o ciclo parasitário (7). Esta resistência ao carrapato pode ser evidenciada pela redução de carrapatos fixados, pela diminuição de fêmeas ingurgitadas e, por consequência, pela diminuição na produção dos ovos, assim como na sua viabilidade, além da inibição da muda e o aumento da mortalidade dos carrapatos (27-29), podendo ser afetada por muitos fatores incluindo idade, sexo, lactação, estresse e estação do ano (24).

Kemp et al. (30) mostraram que a redução de larvas nas primeiras 24 h após uma infestação experimental por carrapatos foi maior nos bovinos resistentes do que nos suscetíveis. Além disso, as larvas eram mais leves e ficaram menos tempo fixadas no mesmo local, movimentando-se por mais tempo sobre a pele do hospedeiro. Estudos também mostraram que a diferença de resistência entre raças bovinas poderia estar relacionada com a resposta de hipersensibilidade intensa detectada em bovinos suscetíveis (31-32). Schleger et al. (33) detectaram maiores níveis de histaminas liberadas no local de alimentação do carrapato pela degranulação de mastócitos e eosinófilos em bovinos altamente resistentes (33, 34). Os autores sugerem que as histaminas liberadas na epiderme poderiam estimular o comportamento de auto-higiene nos bovinos, diminuindo o número de larvas. Mais recentemente, a resistência às infestações de carrapatos foi associada à regulação diferencial da expressão de vários genes no tecido cutâneo de bovinos infestados (35, 36). Piper et al. (35) indicaram uma maior expressão de genes relacionados à atividade celular e à resposta imune contra a infestação por carrapatos, além de maior atividade inflamatória na pele de animais suscetíveis no local da fixação da larva.

Também tem sido investigada a variabilidade no nível de anticorpos elicitados entre raças de bovinos após infestações por carrapatos. Kashino et al. (37) mostraram uma redução nos níveis de anticorpos anti-saliva do isotipo IgG1 em bovinos suscetíveis após infestações pesadas com *R. microplus*, o que não ocorreu em bovinos resistentes. Porém, após infestações leves, essa diferença não foi encontrada entre bovinos resistentes e suscetíveis. Já Cruz et al. (38), comparando infestações leves e pesadas, indicaram que, durante as infestações pesadas, bovinos *B. taurus* (suscetíveis) apresentaram maiores níveis de IgG contra extrato de glândula salivar, de intestino e de larva de *R. microplus*. Além disso, foi verificada uma variação nos antígenos majoritariamente reconhecidos entre indivíduos da mesma raça bovina. Piper et al. (25) também mostrou uma variação no reconhecimento individual de antígenos e, diferentemente de Kashino et al. (37), observou maiores níveis de anticorpos IgG1 específicos contra diferentes extratos do carrapato em bovinos suscetíveis do que em resistentes. Portanto,

sugere-se que os níveis de infestação devem influenciar a resposta de IgG contra o carrapato, a qual tende a variar entre indivíduos.

A resistência naturalmente adquirida pode ser estabelecida após sucessivas infestações por carrapatos, porém essa resistência é somente parcial, pois geralmente alguns indivíduos da população conseguem se alimentar suficientemente para completar o ciclo parasitário. Assim, com a busca por antígenos que elicitam resistência, diferentes proteínas capazes de induzir essa mesma resposta têm sido identificadas após imunização artificial. Depois de vacinado, os recorrentes contatos com o carrapato devem reforçar a imunidade do hospedeiro, como uma vacina de reforço e, portanto, não haveria a necessidade de gastos com doses adicionais do antígeno (39).

#### **1.1.4 A busca por antígenos protetores**

Os antígenos de parasitos estudados têm sido classificados como expostos ou ocultos (40). Antígenos expostos são considerados aqueles que interagem com o sistema imune do hospedeiro (41), enquanto que antígenos ocultos seriam aqueles que não estimulam uma resposta imunológica durante uma infestação natural, já que geralmente estão protegidos em tecidos ou secreções não expostas ao sistema imune do hospedeiro (42, 43). Inicialmente, pode parecer mais promissor a utilização de antígenos expostos em ensaios de vacinação a fim de proteger o hospedeiro, já que estão associados a tecidos ou secreções que naturalmente entram em contato com o sistema imune do hospedeiro e podem estimular e/ou reforçar uma resposta imune. Porém, durante a co-evolução parasito-hospedeiro, o carrapato tem adquirido formas de modular respostas do sistema imune do hospedeiro como forma de sobrevivência (44) e, portanto, os antígenos normalmente expostos podem não ser suficientes para uma proteção completa. Nuttall et al. (45) descrevem que a imunização com antígenos expostos é eficiente na produção de uma resposta imune, mas que não permanece após repetidas exposições ao carrapato. Já a imunização com antígenos ocultos tem mostrado também elicitar resposta imunes protetoras, levando a menores níveis de infestação após a exposição ao carrapato (43).

Entre os antígenos ocultos estudados, a Bm86, uma glicoproteína isolada do intestino de *R. microplus*, foi utilizada como imunógeno na produção de duas vacinas contra o carrapato. A primeira vacina a ser comercializada, a TickGARD, foi produzida na Austrália e introduzida ao mercado em 1994 (46). Porém, essa vacina apresentou alta variação no grau de

eficácia entre espécies, mostrando-se mais eficiente contra espécies do gênero *Hyalomma*, mas não significativa para *Amblyomma variegatum* e *Rhipicephalus appendiculatus* (47). Posteriormente, a Gavac, produzida em Cuba, utilizando o Bm86 expresso em *Pichia pastoris*, e não em *Escherichia coli* como na TickGARD, passou também a ser comercializada (48). A GAVAC foi utilizada em países como Cuba, Colômbia, República Dominicana, Brasil e México, chegando a gerar uma redução de 82% nos tratamentos com acaricidas seis anos após a implantação da vacina em Cuba (49, 50). Entretanto, a imunização com a GAVAC mostrou ser mais eficiente contra linhagens de *Rhipicephalus annulatus* do que contra o próprio *R. microplus* (49, 51). Popara et al. (52) compararam o proteoma de *R. annulatus* e *R. microplus* após a alimentação em bovinos vacinados com a GAVAC e detectou menor representação da maquinaria de degradação de proteínas, comparado ao *R. microplus*, porém os níveis de RNAm e proteína de Bm86 foi similar nas duas espécies. Assim, sugeriram que a menor atividade proteolítica em *R. annulatus* facilitaria a interação antígeno-anticorpo durante a infestação e, conseqüentemente, melhoraria a eficácia da vacina. Esses resultados mostram que fatores fisiológicos também podem afetar a eficácia de uma vacina em diferentes espécies de carrapatos.

Com a proteção parcial ou ainda ineficiente contra algumas espécies e linhagens de carrapato, continuam as buscas por antígenos protetores. Assim, experimentos de vacinação utilizando diversos antígenos têm sido relatados. Os antígenos de *R. microplus* Bm91, uma carboxidipeptidase, e BMA7, uma glicoproteína de membrana semelhante à mucina, produziram respostas imunológicas em bovinos menos protetoras quando comparadas com a resposta ao Bm86 (53, 54). Já o Bm95, um antígeno homólogo ao Bm86, mostrou proteger o hospedeiro de uma linhagem de *R. microplus* da Argentina que apresentava baixa suscetibilidade à vacina contendo o Bm86, apresentando uma eficiência similar à obtida pela GAVAC (55). Duas proteínas associadas a hidrólise de vitelina no ovo de *R. microplus* (BYC e VTDCE) também foram usadas em ensaios de vacinação. A imunização de bovinos utilizando a BYC nativa apresentou uma proteção entre 14 e 36% (56), enquanto que utilizando a BYC recombinante a eficácia foi de 25,24% contra o *R. microplus* (57). Já a imunização com VTDCE apresentou uma proteção de 21% (58). Proteínas envolvidas na detoxificação de xenobióticos, como os acaricidas, e compostos endógenos também podem induzir respostas imunes protetoras. As GSTs de *R. microplus* (RmGST) e *Haemaphysalis longicornis* (GST-HI), em especial, são consideradas proteínas com alto potencial vacinal, uma vez que apresentam reatividade cruzada entre espécies de carrapatos (59, 60). Da Silva Vaz Jr. et al. (59) mostraram que o soro policlonal contra RmGST reagiu com as GSTs



recombinantes de *H. longicornis* e *R. appendiculatus*. A vacinação de bovinos com a rGST-HI, com posterior desafio com *R. microplus*, mostrou reduzir o número total de carrapatos em 53,08% e o peso das fêmeas ingurgitadas em 52,34%, produzindo uma eficácia total de 57 % (60). A vacina conferiu uma reação cruzada que induziu uma resposta imune protetora parcial em bovinos, sugerindo seu potencial em uma vacina coquetel. Entre outras proteínas testadas em ensaios de imunização contra a infestação por *R. microplus* estão metaloproteases, como a BrRm-MP4, que resultou em um menor número e peso de carrapatos totalmente ingurgitados e menor oviposição e fertilidade dos ovos (61), e um inibidor de tripsina larval (RmLTI), o qual forneceu uma proteção total calculada em 32% (62).

Com relação aos ensaios de vacinação contra outras espécies de carrapatos, a subolesina (4D8), uma proteína intracelular, tem sido intensamente estudada, tendo-se realizado tanto ensaios de vacinação como de silenciamento gênico em diferentes espécies de carrapatos e hospedeiros (63-66). A imunização de camundongos com a 4D8 mostrou reduzir a infestação por larvas de *Ixodes scapularis*, além de inibir a muda de larvas para ninfas, resultando em uma eficiência de vacinação de 71%. Coelhos vacinados com a 4D8 apresentaram menor infestação por ninfas de *I. scapularis*, *Dermacentor variabilis* e *Amblyomma americanum*, além de redução no peso de ninfas ingurgitadas de *D. variabilis* (67). Ovelhas imunizadas com a 4D8, e depois infestadas com *I. scapularis*, apresentaram uma menor infestação por carrapatos adultos, além de redução na oviposição, produzindo uma eficácia de vacinação de 71% (68).

Algumas proteínas do carrapato são capazes de ligar-se às imunoglobulinas do hospedeiro que foram ingeridas com o sangue. Essas proteínas ligam-se às imunoglobulinas no intestino e as transportam pela hemolinfa até as glândulas salivares, saindo pela saliva, agindo na modulação do sistema imune do hospedeiro (). Essas proteínas são chamadas de IGBPs (proteínas que ligam imunoglobulinas) (69). Um ensaio de vacinação em coelhos com uma IGBP de *Rhipicephalus haemaphysaloides* resultou na diminuição do peso de ingurgitamento e aumentou a mortalidade de carrapatos, comparado ao grupo controle (70). Outras proteínas com potencial para compor uma vacina anti-carrapato são as ferritinas. Essas proteínas podem ligar-se a íons de ferro excedentes da alimentação por sangue, ajudando a armazenar e metabolizar esses íons (71). A imunização de coelhos com a ferritina-2 de *I. ricinus* (IrFER2) foi capaz de reduzir o número e o peso de carrapatos, assim como a fertilidade, chegando a uma eficiência de 98%, enquanto que a vacinação de bovinos com a ferritina-2 de *R. microplus* (RmFER2) mostrou uma eficácia de 64% contra o próprio *R. microplus* (semelhante ao encontrado com a Bm86) e de 72% contra o *R. appendiculatus* (72).

Já Galay et al. (73) comparou o potencial das ferritinas 1 e 2 de *H. longicornis* (HIFER1 e HIFER2) em ensaio de vacinação usando coelhos. As duas proteínas recombinantes reduziram a taxa de oviposição e eclosão, enquanto que só a imunização com HIFER2 reduziu o peso de ingurgitamento, apresentando maior eficiência de vacinação do que a HIFER1.

Entre as proteínas associadas ao cimento isoladas de *R. appendiculatus*, estão as proteínas ricas em glicinas RIM 36 e a 64P. Esta estrutura é formada por proteínas secretadas na saliva e depositadas ao redor das peças bucais do carrapato. O cone de cimento tem como função a fixação do carrapato no hospedeiro e, portanto, auxilia na alimentação e manutenção do parasitismo (74). A RIM 36, molécula imuno-dominante de *R. appendiculatus*, foi fortemente reconhecida pelo anticorpo anti-RIM 36 em tecidos como glândula salivar e extratos de cones de cimento do carrapato, mas não foram realizados ensaios de vacinação usando a proteína sozinha como antígeno (75). A 64P mostrou ter propriedades tanto de um antígeno “exposto” como “oculto”, pois a imunização de cobaias com a proteína produziu anticorpos que reagiram com os antígenos expostos presentes na saliva do carrapato, mas também responderam adicionalmente de forma cruzada contra epítomos antigênicos ocultos no intestino do mesmo (76). Já a imunização de camundongos com a 64P proveniente de *R. appendiculatus* protegeu contra a TBEV (vírus da encefalite transmitido por carrapatos) transmitido por *Ixodes ricinus* infectado. O resultado foi comparável a uma única dose da vacina comercial para TBEV, enquanto que a vacina TickGARD não apresentou efeito protetor (77). A vacinação com a proteína 64P recombinante induziu reatividade cruzada com diferentes espécies de carrapatos, mostrando ser compatível para a formulação de uma vacina de amplo-espectro (78). Entre outras proteínas salivares, as serpinas (inibidores de serino-proteases) têm sido identificadas em diferentes espécies de carrapatos, como a HIS2 de *H. longicornis* e a RAS-1, 2, 3 e 4 de *R. appendiculatus*. A vacinação de coelhos com a HIS2 e a vacinação de bovinos com a RAS-1 reduzem a mortalidade de ninfas e carrapatos adultos (79, 80). Além disso, anticorpos anti-saliva de *A. americanum*, *I. scapularis* e *Rhipicephalus sanguineus* reagiram de forma cruzada com três serpinas da saliva de *R. microplus*, o que indica seu potencial como antígeno candidato para uma vacina universal contra carrapatos (81).

Antígenos musculares e associados ao balanço hídrico também têm sido descritos como capazes de induzir proteção. As aquaporinas de *I. ricinus* (IrAQP1) e *R. microplus* (RmAQP1) mostraram proteger o hospedeiro imunizado. A vacinação com a IrAQP1 e uma região conservada da proteína (CoAQP) apresentaram uma eficiência de proteção de 32% e 80%, respectivamente, o que reflete a baixa taxa da muda de larvas em coelhos vacinados

com a CoAQP (82). Já dois ensaios de vacinação de bovinos com a RmAQP1 reduziram o número de carrapatos adultos, apresentando eficiências de 68% e 75% (83). A tropomiosina recombinante de *H. longicornis* (rHL-Tm) foi inoculada em coelhos, resultando na diminuição do peso de ingurgitamento, na taxa de oviposição e no peso de ovos por fêmea, além da não eclosão de larvas (84). A imunização de coelhos com a Hc-23 recombinante de *Haemaphysalis concinna*, homóloga à troponina I de *H. longicornis*, reduziu o peso corporal de fêmeas ingurgitadas e a postura de ovos por carrapatos que se alimentaram no hospedeiro imunizado, comparado com o grupo controle (85).

Algumas associações entre antígenos têm sido testadas a fim de aumentar a proteção contra o carrapato. O desenvolvimento de vacinas combinando o Bm86 ao Bm91, assim como o Bm86 ao BMA7, mostraram respostas imunológicas mais eficientes quando comparadas com a vacina que utilizava somente o Bm86 (86, 54). A associação de rRAS-3, rRAS-4 e rRIM 36 foi utilizada para vacinar bovinos contra *R. appendiculatus*, o que resultou no aumento da mortalidade de fêmeas infectadas e não infectadas com *Theileria parva*, comparado ao grupo controle. A vacina não protegeu o bovino da transmissão do patógeno, porém atrasou em um ou dois dias a infecção por *T. parva* (87). Além disso, a imunização de bovinos utilizando simultaneamente BYC, VTDC e GST recombinantes contra o *R. microplus* resultou em maior ganho de massa dos bovinos vacinados, quando comparado com a vacinação com apenas um dos antígenos (88), reforçando que a produção de uma vacina coquetel pode ser a solução para obter uma proteção eficaz contra o carrapato.

Atualmente existem diversos antígenos descritos com alguma capacidade de produzir imunidade protetora contra carrapatos, porém existem muitas dificuldades de encontrar um ou um coquetel de antígenos que seja realmente eficiente na proteção permanente do hospedeiro, sem a necessidade da ação combinada com acaricidas (12).

### **1.1.5 Métodos para a identificação de novos antígenos protetores**

Novas tecnologias e ferramentas de bioinformática têm facilitado a seleção de candidatos potenciais a comporem uma vacina contra carrapatos. Um dos limitantes para encontrar antígenos com potencial protetor é a ausência de genomas completos sequenciados da maioria dos carrapatos, incluindo o *R. microplus*, porém a produção de bibliotecas de cDNA (89, 90), proteomas (91, 92), transcriptomas (93, 94), sialomas (95, 96), mialomas (97-98), entre outras estratégias, têm auxiliado nessa busca. Uma grande quantidade de dados tem

sido gerada, mas são necessárias ferramentas para identificar antígenos com potencial protetor. É preciso entender as funções desses antígenos, em que fase do desenvolvimento são expressos, se apresentam funções sobrepostas, ou seja, se são essenciais para o desenvolvimento do carrapato ou para a transmissão de patógenos (99, 100). Assim, o silenciamento gênico tem sido bastante utilizado em carrapatos como uma forma de selecionar antígenos potencialmente protetores. O RNAi é o método mais utilizado para o silenciamento gênico em carrapatos, uma vez que outras técnicas de manipulação genética são limitadas (16). Ensaios de vacinação podem ser muito caros, principalmente utilizando hospedeiros de grande porte, como bovinos (hospedeiro natural do *R. microplus*). Dessa forma, após uma triagem por RNAi, somente antígenos com real potencial seriam destinados a ensaios de vacinação.

#### 1.1.5.1 RNA interferência

O silenciamento gênico por RNAi tem sido realizado em carrapatos a fim de identificar a função de genes de interesse, caracterizar a interface carrapato-patógeno ou carrapato-hospedeiro e selecionar potenciais antígenos protetores (16). O método de RNAi consiste em inserir artificialmente RNAs dupla fita (dsRNA) ou pequenos RNAs interferentes (siRNA) complementares a determinado gene no organismo alvo (101) e termina com a degradação do RNAm alvo, que apresenta a mesma sequência do dsRNA/siRNA inicial (102, 103). No caso, o dsRNA é clivado por uma enzima da família da RNase III (Dicer) em pequenos siRNAs com 21-26 nt de comprimento, os quais são apresentados pela Dicer para o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Um de seus componentes, a Argonata 2, separa as duas fitas, sendo que uma é incorporada pelo RISC (chamada de fita-guia), enquanto a outra é degradada. O RISC agora ativado é capaz, pela ação da Argonata, de degradar qualquer RNAm que se ligar à sequência-guia pelo pareamento de bases (103-105). Os mecanismos envolvidos no método de RNAi ainda são pouco conhecidos em carrapatos. Muito do que se sabe foi descrito principalmente em *Drosophila melanogaster* (106), mas a maquinaria do RNAi em *Anopheles gambiae* (107) e *Caenorhabditis elegans* (108) também servem como base para modelo de silenciamento gênico em *R. microplus*. Entre os genes relacionados às vias do RNAi descritos em *R. microplus* estão a Dicer, Argonata, RdRP e Piwi/Ago-3/Aubergine (99). Entretanto, mais estudos são necessários para a identificação dos componentes e vias referentes ao RNAi em carrapatos.

A introdução do siRNA ou dsRNA complementar a determinado RNAm de um organismo pode ser realizada por diferentes métodos: i) injeção ou microinjeção; ii) alimentação; iii) imersão (*soaking*); iv) eletroporação ou v) supressão induzida por vírus de RNAi. A injeção de dsRNA é a técnica mais utilizada em experimentos com carrapatos para induzir o silenciamento gênico. O método é realizado introduzindo o dsRNA manualmente usando uma seringa diretamente no carrapato, geralmente em fêmeas adultas parcialmente ou totalmente ingurgitadas, a fim de avaliar os efeitos do silenciamento gênico na próxima geração (na postura de ovos e eclosão das larvas) (63, 109, 110). A incubação do dsRNA com carrapatos por imersão (111), assim como a eletroporação (112), tem sido uma alternativa para induzir RNAi em fases imaturas do carrapato. Já a alimentação com dsRNA/siRNA é realizada por capilares inseridos diretamente no hipostômio do carrapato. A técnica é importante na determinação da função de genes na interface carrapato-patógeno e carrapato-hospedeiro (113). Já com a produção de dsRNA viral é possível infectar células do carrapato com vírus contendo o gene de interesse e verificar o efeito na infecção e na transmissão de patógenos (114, 115).

Na busca por antígenos protetores, alguns experimentos de RNAi com carrapatos detectaram genes de grande importância na sobrevivência do parasito ou da geração posterior. O silenciamento do gene codificante para a subolesina mostrou redução na massa dos carrapatos, no número de ovos e na eclosão de larvas, além do aumento da mortalidade no grupo de fêmeas recém-saídas da fase de ninfa em que foi injetado o dsRNA correspondente. Esses efeitos foram aumentados quando os genes da subolesina e da Bm86 foram silenciados simultaneamente. Já os ovos colocados por fêmeas de *R. microplus* ingurgitadas que receberam o dsRNA da subolesina, apresentaram um fenótipo aberrante (116). O silenciamento de genes homólogos/ortólogos à subolesina tem sido realizado para outras espécies de carrapatos (63-65), sugerindo papéis desta proteína na modulação da ingestão de sangue e na reprodução (117). O tratamento de fêmeas adultas de *R. microplus* com dsRNA correspondente a Bm05br (homóloga à Hq05 de *Haemaphysalis qinghaiensis*) reduziu a taxa de eclosão dos ovos e a massa das larvas do grupo tratado, comparado ao controle, sugerindo sua função na reprodução do *R. microplus* (118). A partir do tratamento de carrapatos *R. microplus* com dsRNAs de genes de alta expressão durante a infecção com *Anaplasma marginale* foi identificada a supressão da transmissão do patógeno a bezerros quando os carrapatos foram injetados com dsRNA da subunidade III da citocromo c oxidase (119). Já carrapatos tratados com dsRNA correspondente a AAS19, um inibidor de serino-proteases (serpina) de *A. americanum*, apresentaram menor peso de ingurgitamento após o

desprendimento espontâneo do hospedeiro, comparado ao controle. Além disso, 75% dos carrapatos tratados apresentaram deformidades (120). O silenciamento do gene ferritina-1 em fêmeas de *R. sanguineus* expostas à infecção com *Ehrlichia canis* reduziu a massa das fêmeas após o desprendimento do hospedeiro, mas também alterou morfológicamente e histoquimicamente ovários e oócitos do grupo tratado (121). A injeção de dsRNA correspondente a RHcyst-1, uma cistatina do tipo 1, em *R. haemaphysaloides* gerou diminuição na taxa de fixação do carrapato 24 h após o tratamento e redução na taxa de eclosão, sugerindo seu envolvimento com a fase embrionária inicial do carrapato (122). O silenciamento do gene *class B scavenger receptor CD36* de *H. longicornis* (HISRB) afetou a alimentação de sangue e a produção de ovos (123), enquanto que o silenciamento do gene Ripilin-1 por RNAi resultou na diminuição da taxa de fixação de *R. haemaphysaloides* 24 h após ser submetido a alimentação em coelho, e na redução da massa de fêmeas ingurgitadas após o período de fixação/alimentação (124). Esses experimentos, além de outros realizados com diferentes genes ou ainda associando dois ou mais genes em diferentes espécies de carrapatos, devem auxiliar na identificação de potenciais antígenos protetores e, a partir de então, experimentos de alimentação com anticorpos contra os antígenos alvo em carrapatos podem ser realizados. A partir da análise dos efeitos obtidos, desafios de vacinação devem ser realizados para determinar a proteção real contra o carrapato (100).

### 1.1.6 Antígenos salivares

A saliva de artrópodes hematófagos, como o carrapato, apresenta moléculas capazes de inibir respostas associadas com a homeostase do sistema fisiológico do hospedeiro. A fixação, alimentação e reprodução do carrapato no hospedeiro só são possíveis devido às atividades dessas moléculas (125, 126). Além disso, alguns organismos patogênicos são ingeridos pela alimentação, se reproduzem nas glândulas salivares do carrapato e são inoculados via saliva nos hospedeiros, sugerindo que algumas proteínas salivares podem ter um papel importante para uma infecção bem-sucedida desses patógenos. Têm sido descritas moléculas anti-hemostáticas capazes de inibir a agregação plaquetária (127, 128), a cascata de coagulação do hospedeiro (129, 130) e a vasoconstrição (131), além de moléculas capazes de inibir ou modular a resposta imune do hospedeiro, como o sistema complemento (132, 133).

O sistema complemento está presente na imunidade inata e humoral de vertebrados, promovendo tanto a inflamação como a morte do patógeno, o qual pode ser ativado por três

vias: clássica, da lectina e alternativa. A via clássica é iniciada pela ligação de C1q à região Fc do anticorpo ligado ao antígeno, enquanto a via da lectina é desencadeada a partir da ligação de lectinas que se ligam à manose plasmática ou às ficolinas presentes na superfície de distintos patógenos. Já a via alternativa é ativada na superfície do patógeno pela quebra espontânea do C3 em C3a e C3b (ausência de anticorpo) (134, 135). A maioria das moléculas anticomplemento foi identificada no gênero *Ixodes*, como: Isac (*I. scapularis*); IRAC I e IRAC II (*I. ricinus*) (136, 137) e Salp20 (*I. scapularis*) (138). As proteínas de *Ixodes* são capazes de inibir a via alternativa a partir da inibição da formação da C3 convertase. A saliva e o extrato de glândula salivar de *Amblyomma cajennense* (139), além da proteína AamAV422 de *A. americanum* (140), mostraram inibir a via clássica do sistema complemento do hospedeiro. Já a saliva de fêmeas parcialmente e totalmente ingurgitadas de *R. microplus* mostrou inibir tanto a via clássica como alternativa, agindo na fase inicial de ambas as vias (141). A OmCI, um inibidor do complemento de *Ornithodoros moubata*, também foi capaz de inibir as vias clássica e alternativa pela ligação a C5 (142).

A hemostase é um processo fisiológico que interrompe a perda de sangue após uma injúria vascular através de muitos eventos que desencadeiam a vasoconstrição, aderência e agregação plaquetária e coagulação sanguínea (126). A agregação plaquetária pode ser ativada pelo colágeno exposto durante a lesão do vaso sanguíneo, pela interação com a trombina ou ainda pela adenosina difosfato (ADP) e tromboxano A<sub>2</sub>. As plaquetas se aderem ao tecido subendotelial e os agonistas ligam-se aos receptores na superfície celular das plaquetas, o que desencadeia a cascata de agregação plaquetária. Plaquetas ativadas liberam ácido aracônico, o qual é convertido em tromboxano A<sub>2</sub> e serotonina, responsável junto à tromboxano A<sub>2</sub> pela vasoconstrição no local da inflamação (143). Carrapatos podem secretar vasodilatadores na saliva como forma de antagonizar a vasoconstrição produzida pelo hospedeiro, como por exemplo, prostaglandinas (144) e prostaciclina (145), além das serpinas, como a IRS-2 de *I. scapularis* (146).

Algumas proteínas salivares são capazes de inibir a cascata da coagulação sanguínea do hospedeiro, as quais estão associadas à inibição da trombina, do fator X ativado (FXa), do complexo extrínseco da Tenase e do sistema de contato (126). A cascata é formada por diversos fatores de coagulação, que inicia a partir da injúria no vaso sanguíneo e termina na ativação da trombina, a qual cliva o fibrogênio em fibrina, formando o coágulo sanguíneo (143, 147).

A maioria dos fatores de coagulação são classificados como serino-proteases e, visto que as serpinas são inibidores dessa classe de enzimas, elas poderiam inibir,

consequentemente, não só a agregação plaquetária induzida pela trombina, mas também a cascata de coagulação sanguínea (148-150). Outros inibidores de proteases como a boophilina (151), rhipilina (124) e inibidores de tripsina de *R. microplus* (BmTI-A) (152) e *R. sanguineus* (RsTI) (153) também apresentaram atividades anti-hemostáticas. A agregação plaquetária induzida por ADP pode ser inibida pela atividade da apirase, enzima anti-hemostática e anti-inflamatória presente na saliva do carrapato. Já uma lipocalina de *O. moubata* (moubatina) inibiu a agregação plaquetária induzida por colágeno (154). A calreticula, uma proteína capaz de ligar-se a íons de cálcio, também pode interferir na homeostase do hospedeiro, uma vez que íons de cálcio são requeridos como cofatores de enzimas da coagulação (155).

A presença de moléculas associadas à modulação da hemostase e da resposta imune de hospedeiros tem se mostrado essencial para a sobrevivência e manutenção do ciclo parasitário do carrapato. Entre elas, algumas são consideradas potenciais antígenos vacinais contra o carrapato como, por exemplo, IGBPs (69), calreticulina (156), boophilina (157), serpinas (158, 81), cistatinas (159), além das proteínas ricas em glicina (75, 160) e da paramiosina (161, 162).

#### **1.1.6.1 Proteínas ricas em glicinas**

As proteínas ricas em glicinas (PRGs) são uma superfamília de proteínas caracterizada por repetidos aminoácidos glicina ao longo de sua extensão. Essas proteínas podem assumir diferentes papéis e características em função da sua heterogeneidade, já que são encontradas tanto em procarionotos como em eucarionotos. Nas plantas, essas proteínas estão associadas a estrutura da parede celular, alongamento celular, transdução de sinais, e apresentam atividade antimicrobiana e de ligação a RNA, entre outras (163). Já em insetos, as PRGs aparecem principalmente envolvidas na construção da cutícula (164), mas também podem ser encontradas no córion do bicho-da-seda (165), na seda de aranhas (166) e em conchas de moluscos (167).

Nos carrapatos, muitas proteínas ricas em glicinas têm sido encontradas em uma estrutura conhecida como cone de cimento. Esta estrutura é formada por proteínas secretadas na saliva e depositadas ao redor das peças bucais do carrapato. O cone de cimento tem como função a fixação do carrapato no hospedeiro e, portanto, auxilia na alimentação e manutenção do parasitismo (74). A presença de regiões contendo repetidas glicinas é característica de proteínas da matriz extracelular de vertebrados, como o colágeno (168, 169). Sugere-se que



moléculas do cimento do carrapato que apresentam essa característica mimetizam componentes da epiderme do vertebrado, o que auxiliaria a se evadir de uma possível resposta imune do hospedeiro contra proteínas que constituem essa estrutura (75, 160). Dessa forma, o carrapato consegue depositar as proteínas salivares que irão formar o cone de cimento sobre o tecido do hospedeiro e se alimentar normalmente.

Maruyama et al. (170) analisaram *expressed sequence tags (ESTs)* similares a PRGs de bibliotecas de cDNA de glândulas salivares de fêmeas adultas de carrapatos de duas espécies de ixodídeos, *R. microplus* (monoxeno) e *R. sanguineus* (heteroxeno), e uma de argasídeos, *A. cajennense* (heteroxeno). Os transcritos de ESTs similares a PRGs em *R. microplus* foram mais numerosos e mais diversos do que nas outras duas espécies. Esse achado pode ser atribuído ao fato do *R. microplus* ser monoxeno e, ao contrário do *R. sanguineus* e *A. cajennense*, precisar em torno de 21 dias de parasitismo em um único hospedeiro, permanecendo mais tempo fixado e alimentando-se. Desta forma, a secreção de diferentes tipos de PRGs pode ser uma estratégia desse carrapato para evadir-se da resposta imune do hospedeiro, alternando a expressão dessas proteínas durante a alimentação. As PRGs detectadas no *R. microplus* foram associadas a proteínas semelhantes ao cimento, a proteínas semelhantes à seda da aranha verdadeira e a proteínas de função não conhecida do *R. haemaphysalis* (170).

Zhou et al. (171) mostraram uma maior expressão de uma PRG na glândula salivar de *R. haemaphysalis* (RH50) após a alimentação de sangue e, além disso, a transcrição do RNAm da RH50 não foi detectada na glândula salivar de fêmeas não alimentadas e no intestino, corpo gorduroso e ovário de carrapatos alimentados. A expressão da RH50 na glândula salivar durante a alimentação pode ter um papel na modulação do sistema imune do hospedeiro, além da transmissão de patógenos. Coelhos imunizados com a RH50 e depois infestados com o *R. haemaphysalis* produziram uma resposta imune contra o carrapato gerando uma baixa taxa de fixação no hospedeiro e alta mortalidade de ninfas. Outra proteína associada à formação do cimento em carrapatos, com homologia a proteínas semelhantes à matriz extracelular e estruturalmente similar ao colágeno, é a p29, a qual foi utilizada para a imunização de coelhos contra *H. longicornis*, mostrando reduzir a massa de fêmeas ingurgitadas e aumentar a mortalidade de larvas e ninfas (172). Jiang et al. (173) detectaram a expressão do gene da Hq15 (uma proteína rica em alanina, prolina, glicina, treonina e serina de *H. qinghaiensis*) em ovos, larvas, ninfas, glândulas salivares, carrapatos adultos e em carcaças, mas não em intestinos. Ovinos vacinados com a Hq15 recombinante, e depois infestados com o carrapato, apresentaram fêmeas com menor peso de ingurgitamento, além de

menor peso de ovos colocados por peso de ingurgitamento dos carrapatos, comparado ao grupo controle inoculado com PBS. Schahein et al. (174) identificaram cDNAs de RaSaI 1 a 4 de glândula salivar de *R. annulatus* expressos durante o ingurgitamento, sendo que RaSaI 1, 2 e 3 apresentaram homologia com PRGs de *A. variegatum*. Os quatro genes foram expressos somente nos dias 12 e 18 após a oviposição, exceto a RaSaI 2 que também foi pouco expressa no sexto dia da embriogênese. Os maiores níveis de expressão foram detectados no dia 18, mostrando um aumento progressivo na expressão gênica durante o desenvolvimento dos ovos.

A proteína 64P, já citada anteriormente, foi isolada da glândula salivar do *R. appendiculatus* e é classificada como uma provável proteína do cone de cimento. Esta proteína apresenta regiões ricas em glicinas e, além disso, apresenta regiões semelhantes ao colágeno. Ensaio de imunização envolvendo formas truncadas desta proteína (64TRPs) mostraram que 64TRP1 e 64TRP4, correspondentes à região C-terminal com repetições contendo glicinas, mostraram-se altamente imunogênicas, porém foi a 64TRP3 que apresentou proteção aos hospedeiros imunizados, proporcionando uma taxa de mortalidade de 70% em fêmeas de *R. appendiculatus* adultos (76). Assim, o 64P segue sendo considerado um dos antígenos mais promissores para a proteção contra carrapatos.

Nos últimos anos, PRGs têm sido identificadas a partir de transcriptomas e proteomas de distintas espécies de carrapatos. Doze proteínas da superfamília rica em glicinas foram detectadas por Tirloni et al. (81) na saliva de fêmeas de *R. microplus* parcialmente ingurgitadas, mas não em fêmeas totalmente ingurgitadas, sugerindo o envolvimento dessas proteínas no período de fixação do carrapato pela formação do cone de cimento. Entretanto, Kim et al. (175) e Bullard et al. (176) detectaram distintas PRGs na saliva de *I. scapularis* e nas glândulas salivares de *A. americanum*, respectivamente, em todos os períodos de alimentação testados, incluindo a fase de rápido ingurgitamento. Nene et al. (177) detectaram PRGs altamente expressas em glândulas salivares de fêmeas de *R. appendiculatus* infectadas com *T. parva*, indicando uma possível relação com a transmissão de patógenos. Outras PRGs também foram encontradas em transcriptomas e proteomas de saliva/glândula salivar de: *Ornithodoros coriaceus* (178), *Antricola delacruzi* (179), *Amblyomma maculatum* (180), *Amblyomma parvum*, *A. cajennense*, *Amblyomma triste* (95), *A. americanum* (92), *A. variegatum* (181) e *R. sanguineus* (182). Além da saliva e glândula salivar, as PRGs também já foram detectadas em larvas de *R. microplus* (183, 184), carrapatos machos adultos de *R. appendiculatus* (93), *Rhipicephalus pulchellus* (84) e *O. moubata* (186) e intestino de *Haemaphysalis flava* (187), *D. variabilis* (97) e *I. ricinus* (98).

As PRGs são essenciais na fixação do carrapato no hospedeiro, pela formação do cone de cimento, e ainda têm sido detectadas em todas as fases do desenvolvimento do carrapato e em diferentes tecidos. São numerosas e diferentemente expressas ao longo do parasitismo. Além disso, apresentam regiões ricas em glicinas semelhantes ao colágeno de vertebrados, sugerindo sua importância na modulação do sistema imune do hospedeiro. Desta forma, as PRGs apresentam muitas características de potenciais candidatos a antígeno em uma vacina contra carrapatos.

#### 1.1.6.2 Paramiosina

A paramiosina (PRM) foi inicialmente descrita como uma proteína muscular de invertebrados, sendo encontrada primeiramente em filamentos grandes de músculos não estriados em moluscos (188). Entre suas funções inclui-se determinar o comprimento e estabilidade dos filamentos musculares (189), além de estar associada ao mecanismo “catch” em moluscos (190), no qual os músculos chamados “catch” podem permanecer contraídos por longos períodos com baixo gasto de energia (191). Estruturalmente a PRM apresenta uma forma geral de bastão e é formada, na maior parte da sua extensão, por  $\alpha$ -hélice. Porém, a PRM apresenta regiões adicionais com estruturas secundárias distintas, que compreendem as regiões N e C-terminal da proteína. A sua massa molecular encontra-se em torno de 100 kDa nos organismos em que foi descrita (192).

Além do papel estrutural conhecido para a PRM, também tem sido descrito o seu envolvimento na modulação do sistema imunológico de hospedeiros durante a infestação, no caso de organismos parasitos (193). Foi descrita a capacidade da PRM de inibir a via clássica do sistema complemento, através do bloqueio da função de C1, por meio da sua ligação a regiões semelhantes ao colágeno (194-196), o que corrobora com a capacidade já descrita da PRM de parasitos como *Dictyocaulus viviparus*, *Clonorchis sinensis* e mesmo a PRM de *R. microplus* (RmPRM) de ligar colágeno tipo I (197, 198, 161). Além disso, a PRM também é capaz de ligar aos componentes C8 e C9 do sistema complemento em *Schistosoma mansoni* (199, 200) e *Trichinella spiralis* (201), o que impede a formação do complexo de ataque a membrana (C5b-9). Portanto, a PRM pode agir como moduladora da resposta imune do hospedeiro pela inibição do sistema complemento. Foi demonstrado também que a PRM de *S. mansoni* (202), *Taenia crassiceps* (203) e *R. microplus* (161) são capazes de ligar-se a porção

Fc de imunoglobulinas, mostrando mais uma vez o seu potencial envolvimento na supressão do sistema imune dos hospedeiros.

Tem sido demonstrada a existência de isoformas não musculares da PRM, as quais podem ser encontradas no tegumento e/ou na superfície de vermes como o *S. mansoni* (204), *Schistosoma japonicum* (205), *Taenia solium* (206), além de na superfície da lamela do intestino e no tegumento da *Fasciola hepatica* (207). Em *Paragonimus westermani*, a proteína foi encontrada em todas as fases de desenvolvimento e foi localizada no tegumento, além dos músculos subtegumentares e ao redor do intestino e ovário (208). A localização da PRM na superfície de helmintos sugere uma função adicional da proteína, que pode estar relacionada à interface parasito-hospedeiro. Em *C. sinensis*, o RNAm codificante para a paramiosina de *C. sinensis* (CsPmy) foi detectado em vermes adultos, metacercária e cercária por *immunoblot* e imunolocalização (209). Em *R. microplus*, a PRM foi encontrada em regiões não-musculares como intestino, glândula salivar e corpo gorduroso de fêmeas parcialmente e totalmente ingurgitadas (161). Já a expressão do gene codificante para a PRM de *R. microplus* (*rmprm*) foi detectada, por qRT-PCR, em tecidos como glândula salivar, corpo gorduroso, intestino e ovário de fêmeas adultas, além de em outras fases do desenvolvimento, incluindo ovos, larvas e machos adultos. O gene *rmprm* apresentou uma maior expressão no corpo gorduroso, órgão sem musculatura proeminente, sugerindo que a RmPRM apresenta um papel adicional não relacionado a musculatura do carrapato (162). É importante ressaltar que análises anteriores não detectaram a RmPRM na saliva de fêmeas adultas, sugerindo que a mesma não é secretada para o hospedeiro durante a alimentação do carrapato e indicando sua classificação como um antígeno “oculto” (161). Porém, como foi demonstrado posteriormente que a PRM é reconhecida por soros de bovinos infestados com carrapatos, sugere-se que essa proteína seja considerada um antígeno “exposto” (162). Mais recentemente, a PRM foi encontrada no proteoma de saliva de fêmeas de *O. moubata*, mas não na saliva de machos da mesma espécie (186) e, também, na saliva de fêmeas de *A. americanum* alimentadas por 24-48 h (92).

A PRM de helmintos tem sido bastante estudada e diversos ensaios de vacinação usando a proteína nativa ou recombinante foram realizados. A PRM mostrou produzir imunidade protetora contra *S. mansoni* e *S. japonicum* em camundongos vacinados com a proteína nativa e recombinante (210-213) e é considerada uma das principais candidatas a antígeno vacinal contra a esquistossomose (214). Além disso, a PRM nativa e recombinante induz proteção parcial contra *Brugia malayi* em roedores vacinados, levando a redução da contagem de microfilárias no sangue e comprimento dos vermes adultos (215). Em *T. solium*, camundongos vacinados com um fragmento da PRM recombinante apresentaram menores

cargas parasitárias (216). Dois ensaios de vacinação independentes em bovinos foram realizados por Strube et al. (217) com a PMY recombinante de *D. viviparus*, os quais resultaram na redução de larvas e da carga de vermes e, além disso, os vermes adultos mostraram-se significativamente menores nos bovinos vacinados nos dois ensaios. Wang et al. (209) imunizaram ratos com a proteína CsPmy recombinante ou com uma vacina de DNA codificante para a paramiosina e os infectaram com metacercárias de *C. sinensis*. Ambas as vacinas reduziram a contagem de ovos e a carga de vermes comparado ao grupo controle, porém o efeito da vacinação foi melhor no grupo vacinado com a proteína recombinante.

Experimentos de silenciamento da expressão do RNAm da PRM em *T. spiralis* (*Ts-pmy*) mostraram uma redução de 40,8% na muda em larvas tratadas com o siRNA *Ts-pmy*, além de danos superficiais e menor mobilidade. Já a infestação de camundongos com larvas eletroporadas com o siRNA *Ts-pmy* resultou na diminuição de 37,6% de vermes adultos. Além disso, fêmeas adultas coletadas dos camundongos infectados apresentaram uma redução de 24,8% na liberação de novas larvas comparado com os vermes controle (218), o que indica a importância da PRM no desenvolvimento do parasito e seu potencial uso como antígeno vacinal. Como a PRM de *T. spiralis* é capaz de se ligar ao componente C9 do sistema complemento, anticorpos contra o domínio de ligação da Ts-PMY ao C9 (mAb 9G3) foram transferidos para camundongos, os quais foram posteriormente desafiados com larvas de *T. spiralis*. O bloqueio da ligação de Ts-PMY ao C9 pelo anticorpo mAb 9G3 resultou na morte de 32,9% das larvas *in vitro*, comparado com 4,3% no grupo controle, e também reduziu a infectividade de larvas nos camundongos que receberam o anticorpo (219).

A PRM também é considerada um dos principais alérgenos de ácaros, sendo isolada de organismos como *Sarcoptes scabiei* (220), causador da escabiose humana, *Blomia tropicalis* (221), *Dematophagoides pteronyssinus* (222) e *Dematophagoides farinae* (223), envolvidos em alergias respiratórias como asma e rinite. Gu et al., (224) imunizaram camundongos com uma vacina de DNA correspondente à paramiosina de *S. scabiei*, o que induziu uma resposta mista Th1/Th2. Os autores sugerem que os dados apresentados são uma base para futuros estudos para o desenvolvimento de vacinas eficazes contra o *S. scabiei*. Em um ensaio de alimentação de anticorpos, ácaros *Dermanyssus gallinae* foram alimentados com anticorpos anti-tropomiosina (Der g 10) e anti-paramiosina (Der g 11) coletados de galinhas imunizadas com as proteínas recombinantes. A mortalidade dos ácaros 96 h após a alimentação com anti-Der g 10 ou anti-Der g 11 foi estatisticamente maior do que no grupo controle (19% nos ácaros alimentados com anti-Der g 10 e 23% nos alimentados com anti-Der g 11), sugerindo que esses antígenos devem ser considerados como potenciais candidatos a vacina contra *D.*

*gallinae*, principalmente a paramiosina (Der g 11) (225). A alta taxa de alergias (226, 227) e os problemas associados aos acaricidas usados muitas vezes no tratamento contra *S. scabiei* e outros ácaros (224, 225), como resistência às drogas e toxicidade (228), têm sugerido a necessidade de uma vacina contra estes organismos.

Tem sido descrita a capacidade da PRM de parasitos de elicitar respostas humorais em seus hospedeiros. A PRM de ácaros é reconhecida naturalmente por anticorpos de hospedeiros infectados, como a PRM de *D. farinae* (Der f 11), que foi reconhecida pelo soro humano (229), a PRM de *S. scabiei*, reconhecida por soros de cães e suínos infectados (200) e a PRM de *D. pteronyssinus* (Der p 11), que foi reconhecida por pacientes alérgicos a ácaros (230). Em helmintos, a PRM de *Onchocerca volvulus*, *S. japonicum* e *Echinococcus granulosus* foi reconhecida por soros de pacientes infectados (231, 232, 233). A PRM do *R. microplus* também mostrou ser naturalmente reconhecida por bovinos após sucessivas infestações com o carrapato (162). Além disso, antígenos não caracterizados com massa molecular compatível com a RmPRM já tinham sido detectados por anticorpos de soros de bovinos infestados (234, 235, 38).

Especula-se que a utilização de fragmentos específicos da PRM possa ser mais eficaz em experimentos de vacinação e diagnóstico do que a proteína inteira, por isso, fragmentos da PRM têm sido estudados separadamente a fim de verificar a especificidade da resposta imune humoral contra a mesma em diferentes parasitos. Análises dos anticorpos do soro de pacientes infectados com *S. japonicum* (236), *Taenia saginata* (237) e *T. solium* (216) revelaram o reconhecimento da região carboxi-terminal da PRM, enquanto que, no caso de pacientes infectados com *Dirofilaria immitis*, os anticorpos reconheceram preferencialmente a porção N-terminal da proteína (231). Uma proteína de 92 kDa de *H. longicornis*, detectada por anticorpos anti-intestino de *H. longicornis* produzidos em coelho, foi submetida à espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (LC-MS/MS), gerando peptídeos semelhantes à paramiosina de *R. microplus*. Os peptídeos foram comparados com epítomos de *T. solium* e *T. spiralis*, resultando na identificação de um peptídeo possivelmente protetor localizado próximo a região N-terminal em um segmento não-helicoidal dentro de outro com estrutura  $\alpha$ -hélice (238). Kang et al. (239) mapearam sítios de ligação à IgG sobre a proteína a fim de detectar epítomos reconhecidos por IgG específicos para CsPmy no soro de pacientes com clonorquíase humana. O reconhecimento de cinco fragmentos recombinantes diferentes de CsPmy (CsPmyA, B, C, D e E) por IgG de soros de pacientes foi testado por *immunoblot*. Epítomos responsáveis pelo reconhecimento de IgG específico para CsPmy foram detectados na porção CsPmyC, localizada no meio da proteína. A CsPmyC foi ainda dividida em

CsPmyC-1, -2 e -3 e os fragmentos recombinantes foram analisados quanto ao reconhecimento por soros de pacientes infectados. A CsPmyC-2 apresentou epítomos para IgG específicos para CsPmy e é um candidato para ser usado como antígeno no diagnóstico de clonorquíase. A PRM de ácaros como *B. tropicalis* (Blo t 11) e *D. farinae* (Der f 11) possuem peptídeos imunodominantes que apresentam epítomos para IgG e IgE com maior reatividade do que a proteína inteira. Os autores sugerem que esses peptídeos sejam uma alternativa no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e terapias contra ácaros (229, 240, 241).

A produção de anticorpos anti-PRM por hospedeiros infestados (208) e o seu envolvimento com a produção de imunidade protetora a partir de experimentos de vacinação, fazem dessa proteína uma potencial candidata a antígeno vacinal contra diferentes parasitoses como a esquistossomose (210, 213), filariose (242, 215) e cisticercose (216), as quais apresentam muitas semelhanças com a RmPRM, o que sugere a utilização desta proteína ou de seus fragmentos como imunógeno em ensaios de vacinação contra o carrapato bovino.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Caracterização das regiões N-terminal, interna e C-terminal da paramiosina e de uma proteína rica em glicinas salivar do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Analisar o grau de reconhecimento da proteína rica em glicinas por soros de bovinos das espécies *B. taurus* e *B. indicus* infestados;
- Detectar e quantificar o nível de expressão do gene codificante para a proteína rica em glicinas de *R. microplus* em órgãos e tecidos;
- Caracterizar o efeito do silenciamento dos genes codificantes para a paramiosina e para uma proteína rica em glicinas no *R. microplus*.



## **Capítulo 2**

### **Artigo científico**

Submetido ao periódico Parasitology

Guia para autores: [http://assets.cambridge.org/PAR/PAR\\_ifc.pdf](http://assets.cambridge.org/PAR/PAR_ifc.pdf)

De: [onbehalfof+andrew.hemphill+vetsuisse.unibe.ch@manuscriptcentral.com](mailto:onbehalfof+andrew.hemphill+vetsuisse.unibe.ch@manuscriptcentral.com)

[mailto:[onbehalfof+andrew.hemphill+vetsuisse.unibe.ch@manuscriptcentral.com](mailto:onbehalfof+andrew.hemphill+vetsuisse.unibe.ch@manuscriptcentral.com)]

Enviada em: terça-feira, 3 de outubro de 2017 09:33

Para: Carlos Alexandre S Ferreira <[cferreira@pucrs.br](mailto:cferreira@pucrs.br)>

Assunto: PARASITOLOGY: Manuscript Accepted manuscript ID PAR-2016-0477.R3

03-Oct-2017

Dear Dr. Ferreira

Manuscript ID: PAR-2016-0477.R3

Title: Characterization of a glycine-rich protein from *Rhipicephalus microplus*: Tissue expression, gene silencing and immune recognition

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in *Parasitology* and will now be sent to Press.

It is now essential that:

1) If applicable, you mail publishers' permissions to use previously published material from other sources to the following address:

Journals Production  
Cambridge University Press  
Shaftesbury Road  
Cambridge  
CB2 8BS  
UK

2) You complete and return the copyright transfer form:

[http://journals.cambridge.org/images/fileUpload/documents/PAR\\_ctf.pdf](http://journals.cambridge.org/images/fileUpload/documents/PAR_ctf.pdf)

Alternatively, *Parasitology* offers authors the option to publish their article through an Open Access model (Cambridge Open Option, see

<http://journals.cambridge.org/action/displaySpecialPage?pagelid=4576> for details), on payment of a one-off fee. If you wish to do this, please send an e-mail stating this choice to

[parasitology@cambridge.org](mailto:parasitology@cambridge.org) and complete and return the alternative copyright transfer and order form which can be accessed by clicking the link below:

[http://journals.cambridge.org/images/fileUpload/documents/PAR\\_ctf\\_oa.pdf](http://journals.cambridge.org/images/fileUpload/documents/PAR_ctf_oa.pdf)

If you choose to publish Open Access, you will be contacted shortly by CCC- Rightslink who are acting on our behalf to collect the Article Processing Charges (APCs). Please follow their instructions in order to avoid any delay in the publication of your article.

COMPLETED FORMS MUST BE EMAILED TO THE ADMIN ASSISTANT, ALISON SAGE  
([parasitology@cambridge.org](mailto:parasitology@cambridge.org)).

Your manuscript cannot be processed until all the above have been received.

Finally, we are keen to promote articles wherever possible. If your institution is planning to issue a press release relating to your article there are a number of ways the journal's marketing team can assist you. Please email the details of any planned press releases to the journal's Marketing Executive, Charlotte Porter ([cporter@cambridge.org](mailto:cporter@cambridge.org)).

Yours sincerely,  
Prof. Andrew Hemphill

Editor  
Parasitology

**Characterization of a glycine-rich protein from *Rhipicephalus microplus*: Tissue expression, gene silencing and immune recognition**

Leal, B. F. <sup>1</sup>; Alzugaray, M. F. <sup>2,3</sup>; Seixas, A. <sup>4</sup>; da Silva Vaz Jr., I. <sup>2</sup>; Ferreira, C. A. S. <sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS – Brazil; <sup>2</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada à Saúde Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS – Brazil; <sup>3</sup> Departamento de Microbiología, Universidad de la Republica, Alberto Lasplaces 1550 a 1620, 11600, Montevideo, Uruguay; <sup>4</sup> Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245, 90050-170, Porto Alegre, RS – Brazil.

\*Corresponding author

Address: Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS – Brazil; Phone number: (5551)33203545

E-mail: cferreira@pucrs.br

Running Title: Cattle tick glycine-rich protein characterization

## SUMMARY

Salivary molecules, as glycine-rich proteins (GRPs), are essential to tick attachment and feeding on the host and are suggested to be involved in the host's immune system evasion, therefore representing natural candidates in the search for protective vaccine antigens. This work shows the molecular characterization of a GRP from *Rhipicephalus microplus* (RmGRP). The cDNA and putative amino acid sequences were analyzed, as well as the transcription level in tick tissues/developmental stages by qRT-PCR, showing the highest levels of gene expression in 1-day-old larvae and salivary glands of fully engorged females. RmGRP gene silencing resulted in a lower hatching rate of larvae from treated females. In addition, recombinant RmGRP (rRmGRP) was recognized by sera from rabbits immunized with saliva, salivary glands, and eggs, but not with guts. rRmGRP was also recognized by sera from naturally and experimentally infested bovines, displaying considerable differences among the individuals tested. The data collected indicate that RmGRP probably presents roles other than in the tick-host relationship, especially in larvae development. In addition, the high expression in the rapid engorging adult female period, antigenicity and presence of shared characteristics with other tick protective GRPs turns RmGRP a potential candidate to compose an anti-tick vaccine cocktail.

**KEY WORDS:** Glycine-rich protein; Salivary antigen; *Rhipicephalus microplus*; Tick-bovine relationship; RNA interference.

## KEY FINDINGS

- RmGRP presents glycine content, repeats and structure found in glycine-rich proteins.
- Fully engorged female salivary glands and 1-day-old larvae present higher mRNA levels.
- RmGRP gene silencing resulted in low larvae hatching.
- Recombinant RmGRP is recognized by naturally and experimentally infested bovines.

## INTRODUCTION

*Rhipicephalus microplus* is a monoxenous tick that infests preferentially bovines, and causes great economic damage to livestock (Willadsen, 2006). Acaricides are the main control method against ticks, but its intensive use can contaminate milk, meat and environment (Willadsen, 2004; de la Fuente *et al.* 2007). Moreover, its high cost and occurrence of resistant populations encourages the development of anti-tick vaccines (Lovis *et al.* 2013; Mendes *et al.* 2013). Commercial vaccines present variation in efficiency according to tick species (de Vos *et al.* 2001), strain (Fragoso *et al.* 1998) and geographic localization (de la Fuente *et al.* 1999), thus the search for new protective antigens remains (de la Fuente, 2016).

Various salivary proteins have been isolated and characterized, since saliva of hematophagous arthropods contains molecules capable of inhibiting responses associated with the homeostasis of the host's physiological system. Salivary molecules of these organisms can act as modulators of the host immune system and hence help in maintaining hematophagy (Reck *et al.* 2009; Kotál *et al.* 2015). Thus, vaccines derived from salivary antigens could block the attachment and feeding, by elicitation of a host' immune response and neutralization of secreted molecules. In addition, host resistance can be naturally acquired when, after successive tick infestations, the host assembles an immune response against antigens exposed to its immune system, presumably against molecules secreted in the tick saliva (Trager, 1939;

de Castro and Newson, 1993). The level of ticks that complete the life cycle thus tend to decrease gradually along infestations (Fielden *et al.* 1992), but does not prevent that some individuals in the tick population complete the parasite cycle (Roberts, 1968; Ribeiro, 1987). Different proteins may be able to elicit the same response following artificial immunization and, after vaccinated, recurrent contacts with the tick should enhance the immunity of the host (as a booster vaccine) without expenditures with additional doses of antigen (Shapiro *et al.* 1989; Nuttall *et al.* 2006).

Among the salivary molecules being studied, glycine-rich proteins (GRPs) are considered potential antigens against ticks. Vaccination trials using GRPs as antigen were already described against *R. haemaphysaloides* (Zhou *et al.* 2006) and *Haemaphysalis longicornis* (Mulenga *et al.* 1999), while the protein 64P, a GRP of *R. appendiculatus*, was patented and, since it presents cross-reactivity with different tick species, suggested as a possible broad-spectrum vaccine (Trimnell *et al.* 2002, 2005). GRPs have been identified in proteomes and transcriptomes of a variety of tick species, but little is known about their roles (Ribeiro *et al.* 2006; Garcia *et al.* 2014; Tirloni *et al.* 2014). In this context, the aim of this study was to describe a GRP from *R. microplus* (named RmGRP), characterize the levels of gene expression in various tick tissues/developmental stages, evaluate the effect of the corresponding gene (*rmgrp*) silencing by dsRNA treatment in partially engorged females, as well as analyze the recombinant RmGRP (rRmGRP) recognition by antisera raised against tick tissues and sera from naturally and experimentally infested bovines.

## MATERIAL AND METHODS

### *Ticks*

Ticks were collected from experimentally infested bovines *Bos taurus* (Hereford) housed in individual pens on slatted floors in Faculdade de Veterinária of the Universidade

Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS - Brazil). Partially engorged females and males (Porto Alegre strain) were collected directly on infested bovines and fully engorged females were collected on the floor after detachment/dropping from the cattle. Ticks were kept at 28 °C under 85% relative humidity. All procedures involving animals were in accordance with the Ethics Committee on Animal Use (CEUA/UFRGS) under the protocol number 27559.

#### *rmgrp cDNA isolation*

A cDNA library synthesized from different developmental stages of *R. microplus* life cycle (larvae, nymphs, non-engorged females, adult males and partially engorged females) (Renard *et al.* 2000) was screened on nitrocellulose membranes (Schleicher and Schüll, USA) with cDNA synthesized from partially engorged adult females poly-A RNA labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP by random priming (Sambrook *et al.* 1989). Hybridization was carried out overnight at 65 °C in hybridization buffer (6X SSC) containing 5% (w/v) cow non-fat dry milk, 200 mg/ml denatured salmon sperm DNA and cDNA probe. Filters were then washed for 30 min each in 6X SSC at room temperature, followed by 2X SSC, 1X SSC, 0.5X SSC and 0.1X SSC at 65 °C. One thousand and six hundred pfu were screened and positive clones were isolated and excised into plasmid. One positive clone showing high similarity to glycine-rich protein sequences from ticks after DNA sequencing and DNA database comparison (BLASTX, NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was selected and the respective putative protein named RmGRP.

#### *RmGRP sequence analysis*

Similar amino acid sequences to RmGRP were obtained in protein databases using BLASTP (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and multiple alignment was made



with CLUSTALW (<http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>; Thompson *et al.* 1994). Molecular weight and isoelectric point (pI) were determined using Compute MW/pI ([http://web.expasy.org/cgi-bin/compute\\_pi/pi\\_tool](http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool); Gasteiger *et al.* 2005) and amino acid composition was analyzed by ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>; Gasteiger *et al.* 2005). Secondary structure and signal peptide prediction were performed by GOR4 IV ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_gor4.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl); Garnier *et al.* 1996) and SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; Petersen *et al.* 2011). N-glycosylation, O-glycosylation and Ser, Thr and Tyr phosphorylation sites were predicted using NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>; Steentoft *et al.* 2013) and NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>; Blom *et al.* 1999), respectively.

#### *cDNA synthesis and qRT-PCR*

RNA extraction was performed using TRIzol (Invitrogen), as recommended by the manufacturer, from the following tissue samples: guts, salivary glands, ovaries and fat bodies of partially and fully engorged adult females; whole adult males; 1-, 5-, 10- and 15-day-old larvae; 3-, 6-, 12-, 18- and 21-day-old eggs. All dissections and tissue macerations were performed as previously described (Leal *et al.* 2013). RNA quantification and quality evaluation were determined by spectrophotometry at A280 nm and by the ratio A260/A280 nm. Reverse transcription was performed using 500 ng of RNA in each reaction and Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen), following the manufacturer's recommendations. cDNA synthesized from partially and fully engorged females' tissues, eggs, larvae and adult males RNA were submitted to qPCR. The primers targeting the glycine-rich protein's cDNA sequence (5'-CTTGCCCCCTGAGTCCTACA-3' and 5'-TTCCACAGTGCAGGCTTCAA-3') used in qRT-PCR were designed with the

PrimerExpress 3.0 software (Applied Biosystems, Foster City, USA). Gene expression corresponding to *rmgrp* was normalized by the expression of the 40S ribosomal protein gene, which was amplified using the primers 5'-GGACGACCGATGGCTACCT-3' and 5'-TGAGTTGATTGGCGCACTTCT-3' (Pohl *et al.* 2008). The qPCR reactions were performed in duplicates with Applied Biosystems Step One Plus thermocycler using Platinum®SYBR®Green qPCR SuperMix kit (Invitrogen), 10 pmol primers and 100 ng cDNA. Relative Expression Software Tool (REST) was used for data analyses (Pfaffl *et al.* 2002). The qPCR experiment was done in accordance with the MIQE Guidelines (Bustin *et al.* 2010).

#### *dsRNA synthesis and RNA interference*

The RNA interference experiment was adapted from Pohl *et al.* (2011). Forward and reverse primers (5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATGAAATTGTTGCTGGTCGC-3' and 5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTGAAATGCGTTTGGGAAGAT-3', respectively), containing a T7 promotor sequence (underlined), were designed and synthesized (IDT website/IDT) to amplify a 704 pb sequence of *rmgrp*. Elongase Enzyme Mix (Invitrogen), 0.6 pmol primers and 100 ng cDNA were used in the PCR reactions. cDNA was purified with GeneClean II kit (MP Biomedicals) and used as template to double-stranded RNA (dsRNA) synthesis with Ribomax Express T7 kit (Promega), according to the manufacturer's instructions. The dsRNA quantification was spectrophotometrically determined using A260 nm and diluted in Milli-Q water to 8 µg/ µl. The dsRNA corresponding to *Plasmodium falciparum* MSP1 gene was also equally synthesized to be used as negative control. Forward (5'-TAATACGACTCACTATAGGCTGATGCAAGCGATTCAGAT-3') and reverse (5'-TAATACGACTCACTATAGGGTGTATTTCCAGAATTGGCC-3') primers used to amplify

*msp1* were supplied by Dr. Gerhard Wunderlich (Departamento de Parasitologia – Universidade de São Paulo, SP-Brazil).

Partially engorged females were collected from an infested bovine and 28 ticks between 20 and 45 mg were then selected. All individuals were placed with the dorsal region down on a flat surface using a double-sided tape. Artificial feeding was performed according to Fabres *et al.* (2010). Briefly, a glass capillary with cattle whole blood and citrate (anticoagulant) was inserted into the mouthparts of each tick, which were fed for 1 h under 28 °C with 85% relative humidity. The partially engorged females were distributed in two groups of 14 ticks and carefully injected with 1 µl (8 µg) of dsRNA corresponding to *rmgrp* or *msp1* (non-related gene as negative control) using a Hamilton syringe. Following dsRNA injection, ticks were artificially fed until the next day. After 24 h of dsRNA administration, four ticks of each group were dissected and ovaries were removed and stored in TRIzol at -70 °C. The remaining 10 females were reweighed, fixed using a double-sided tape with the dorsal region down in Petri dishes, and kept for seven days in a culture chamber at 28 °C with 85% relative humidity to oviposition. Eggs were weighed and placed in microtubes with the lid open, closed with cotton and incubated in the same conditions mentioned above until hatching. Larvae were weighed after separation from eggshells and unhatched eggs.

Ovaries from partially engorged females, isolated 24 h after dsRNA injection, were processed individually. RNAs were extracted using TRIzol (Invitrogen) and treated with DNase I (Invitrogen) before cDNA synthesis, which was performed as already described in the item *cDNA synthesis and qRT-PCR*. Gene expression knockdown was confirmed by qRT-PCR using Rotor-Gene Q thermocycler (Qiagen). Reactions were performed in duplicate using Go-Taq qPCR Master Mix (Promega), 300 ng cDNA and 10 pmol primers. Data were analyzed by REST as described in the item *cDNA synthesis and qRT-PCR*.

*Cloning, expression and purification of the recombinant RmGRP*

The DNA sequence encoding RmGRP was amplified by PCR using the isolated cDNA library plasmid DNA as template, and forward (5'-

TTTTTGCATATGAAATTGTTGCTGGTCGCAG-3') and reverse (5'-

TTTTTGCTCGAGTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTATTGTTCTACGGTTGCCG-3')

primers containing restriction sites for *NdeI* and *XhoI* (underlined). Reverse primer was designed with a 6x Histidine tag encoding sequence (bold). The PCR product was cloned into PCR-Blunt vector using Zero Blunt PCR Cloning kit (Invitrogen) and the recombinant plasmid was cleaved with the restriction enzymes. The resulting fragment was inserted into the vector pET 23a (Novagen) using T4 DNA ligase (Fermentas) and the construction was electroporated into *Escherichia coli* BL21 Star strain cells.

One colony of BL21/pET 23a-RmGRP was grown in 5 mL of Luria-Bertani (LB) medium with 50 µg/mL ampicillin overnight at 37°C with shaking at 170 rpm. The culture was added in 1000 mL of LB medium with 50 µg/mL ampicillin and 1mM IPTG. Protein expression was performed during 5 h at 37 °C in a shaker at 170 rpm. Cells were centrifuged at 5000 × *g* for 5 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 100 mL of PBS and disrupted in a French press. The culture was centrifuged at 18000 × *g* for 20 min at 4 °C. rRmGRP was detected only in insoluble fraction, thus the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 50 mL of buffer containing 8 M urea, 10 mM Tris-HCl, 1 mM dithiothreitol, pH 8.0. The resuspended pellet was incubated for 1 h at room temperature with stirring and filtered using a 0.45 µm membrane filter (adapted from Jiz *et al.* 2008).

rRmGRP was purified by affinity chromatography using a HisTrap column (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Urea 8 M was added to the binding and elution buffers. Protein purity was monitored by 15% SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich). Recombinant protein identity was verified by

western-blot using anti-polyhistidine alkaline phosphatase-conjugated IgG (Sigma-Aldrich). Recombinant protein concentration was estimated by spectrophotometry at A280 nm.

#### *Sera of immunized rabbits*

Partially and fully engorged females of *R. microplus* were collected from cattle and washed with PBS. Salivary glands from partially engorged females and guts from fully engorged females were dissected using a scalpel blade, separated of other tissues and washed with PBS. Eggs were collected in the 15<sup>th</sup> day after oviposition and homogenized with a tissue grinder as described by da Silva Vaz Jr. *et al.* (1998). Protein extracts were prepared according to da Silva Vaz Jr. *et al.* (1994). Saliva from partially and fully engorged females were obtained according to Ferreira *et al.* (2002), using 5 µl of 2% pilocarpine solution to induce salivation.

Rabbits were immunized with saliva, salivary glands, eggs and guts extracts according to Canal *et al.* (1995). Briefly, protein extracts emulsified with Freund's complete adjuvant and additional boosters with antigen emulsified in Freund's incomplete adjuvant were inoculated in rabbits. Sera were collected fifteen days after the last booster.

#### *Sera of infested bovines*

Sera from six naturally infested and a non-infested *B. indicus* (Nelore) were provided by the Departamento de Veterinária Preventiva, at the Universidade Federal de Pelotas (Brazil). Sera of three bovines *B. taurus* (Hereford) from an area free of *R. microplus* submitted to twelve successive experimental infestations (six heavy infestations with 18,000 larvae followed by six light infestations with 800 larvae) were also used. Experimental infestations protocol was previously described by Cruz *et al.* (2008).

### *Western-blot*

Affinity-purified rRmGRP was resuspended in sample buffer containing 62.5 mM Tris-HCl, pH 8, 0.001% bromophenol blue, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% SDS and 8 M urea, separated by 15% SDS-PAGE (1.7 mg/cm<sup>2</sup>) and transferred to nitrocellulose membrane at 70 V for 1 h, according to Dunn (1986). Nitrocellulose strips of 4 mm were blocked for 2 h at room temperature with blocking buffer (cow non-fat dry milk 5% in PBS with 0.05% Tween 20). Sera were diluted in blocking buffer and adsorbed for 1 h at room temperature with *E. coli* BL21 strain lysate expressing pET 23a vector. The *E. coli* BL21 strain-pET 23a lysate was prepared according to Rott *et al.* (2000). Nitrocellulose strips were incubated with the sera overnight at 4 °C. After five washes for 10 min with blocking buffer, strips were incubated for 1 h with anti-IgG bovine or rabbit conjugated to peroxidase or alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich) diluted 1:4,000 in blocking buffer. After five washes with PBS 0.05% tween 20, ECL Western Blotting Substrate kit (Abcam) was used in strips incubated with anti-IgG bovine or rabbit conjugated to peroxidase, while NBT and BCIP were used as substrate in strips incubated with anti-IgG rabbit conjugated to alkaline phosphatase. The bands intensities were analyzed using a Carestream Gel Logic 2200 PRO Imaging System and the associated Image Analysis Software.

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA) by one-way ANOVA and Tukey's post-test or Student's unpaired *t*-test. Values with significance of  $P < 0.05$  were considered statistically different. Analyses were performed using two-tailed test.

## RESULTS

### *RmGRP sequence analysis*

The cDNA sequence encoding RmGRP was analyzed showing the presence of an open reading frame of 456 bp (151 amino acids), including a putative signal peptide composed by 16 amino acids (see Fig. 1). The protein was predicted to have a molecular weight of 15.9 kDa and pI 9.1, consisting mainly of random coil (70%), and presenting 25 potential sites for phosphorylation and 21 sites for o-glycosylation. The amino acid composition shows high presence of glycine (17%), serine (11%) and asparagine (8%), but do not present cysteines. The distribution of prolines and glycines shows distinct profiles in the two moieties of the protein. The N-terminal half (amino acid 1 to 79) does not present proline and the glycine residues are distributed not forming any distinct pattern, whereas the C-terminal half (amino acid 80 to 151) shows a high proportion of prolines (12.5%) and most glycines are present in repeats, preceded or not by proline, as: FGGN, GFGN (two copies) and GFGGN (three copies) (Fig. 1). Alignment of RmGRP with glycine-rich proteins showed high similarity with proteins of *R. appendiculatus*, *R. puchellus*, *Amblyomma maculatum*, *A. cajennense*, *A. americanum* and *Ixodes scapularis*, which present identity of 91%, 91%, 89%, 89%, 87%, and 72%, respectively. The aligned amino acid sequences indicated five conserved repeats, whereas the FGGN sequence (residues 105-8) was not present in the other glycine-rich proteins and two repeats PGFGGN (residues 128-133 and 135-140) were incomplete in *I. scapularis*, forming a single repeat “PGFGN”. (Fig. 2).

### *Transcription profiling of rmgrp*

The transcription of *rmgrp* was detected by qRT-PCR in all tick developmental stages: eggs, larvae, adult females and males. However, *rmgrp* transcription was not detected in 3- and 6-day-old eggs and in the guts of partially and fully engorged females. The highest

relative transcription levels were identified in 1-day-old larvae and salivary glands of fully engorged females ( $P < 0.01$ ). *rmgrp* transcription levels showed to be higher in salivary glands ( $P = 0.0004$ ), fat bodies and ovaries of fully engorged comparing to partially engorged females (Fig. 3), although the differences concerning the last two organs did not reach statistical significance.

#### *RmGRP gene silencing*

RNAi experiment was performed separating ticks in two groups: injected with dsRmGRP or dsMSP1 (control). After 24 h of the treatment, ticks of each group were dissected and RNA of ovaries were used to evaluate the *rmgrp* silencing level by qRT-PCR. The remaining ticks of each group were placed to oviposition. Weight gain of females 24 h after treatment, tick mortality, eggs and larvae weight and hatching rate (larvae weight mean) were measured. Gene silencing was observed in three of four ticks treated with dsRmGRP, which showed a reduction of 12%, 70% and 96% in *rmgrp* expression (Fig. 4). The weight gain of partially engorged females 24 h after dsRNA injection and eggs weight were not statistically different between groups (injected with dsRmGRP or dsMSP1), but the weight of hatched larvae was lower in the group treated with dsRmGRP in comparison with the control ( $P = 0.0007$ ). Hatching rate was 55.8 % in the control group (treated with dsMSP1) and 8.6 % in the group injected with dsRmGRP, representing a larvae weight reduction of 91% (Table 1). Tick mortality was not observed after dsRNA treatment (data not shown).

#### *Cloning, expression and purification of RmGRP*

Integrity of the RmGRP coding nucleotide sequence insertion in the pET23a vector was confirmed by DNA sequencing and respective protein expression was confirmed by 15% SDS-PAGE and western-blot (Fig. 5A and B). The relative migration of rRmGRP indicated a



molecular mass of about 20 kDa, while the predicted size was 16.7 kDa (15.9 kDa of RmGRP plus 0.8 kDa of 6x His tag). The western-blot analysis also shows that the anti-His tag antibody recognized equally the recombinant protein in purified and non-purified forms.

#### *rRmGRP antigenicity evaluation*

Western-blot analyses were performed in order to evaluate the antigenicity of RmGRP under natural and experimental infestations, as well as after rabbit immunization with protein extracts of instars, adult tissues or saliva. Fig. 6 shows the recognition of rRmGRP by immune rabbit sera raised against 15-day-old eggs, salivary glands of partially engorged females and saliva of partially and fully engorged females, while sera against fully engorged female guts did not. This result corroborates the data presented by the qRT-PCR *rmgrp* expression analyses, indicating the presence of RmGRP in these tissues, with the exception of adult gut. rRmGRP antibody recognition was also tested using sera from three *B. taurus* bovines submitted to twelve experimental successive infestations (six heavy infestations followed by six light infestations). All sera from bovines 2 and 3 recognized rRmGRP, while bovine 1 presented sera from infestations 6 (corresponding to the last heavy infestation) and 7 (corresponding to the first light infestation) that did not recognize rRmGRP under the conditions tested. The intensity of recognition also varied greatly among the sera of bovine 2, showing up to a 10-fold difference, with the highest intensity following infestation 1 and a gradual decline until infestation 3, with a major decline in the 4<sup>th</sup> serum infestation, which level of recognition was maintained in the remaining sera (Fig. 7B). The rRmGRP recognition by sera from bovines 1 and 3 did not exhibit a similar intensity difference of magnitude, although in bovine 3 sera a two-fold difference is present (Fig. 7C) and in bovine 1 is possible to perceive a slight gradual increase of band intensities from infestation 2 to 5 sera, without rRmGRP recognition after infestation 6 (Fig. 7A). Thus, the experimentally infested bovines

presented heterogeneous rRmGRP recognition profiles by sera collected after both light and heavy infestations. rRmGRP was also recognized by sera from six naturally infested bovines *B. indicus*, presenting also variation in the recognition levels between individuals (Fig. 8).

## DISCUSSION

Glycine-rich proteins are a superfamily of proteins characterized by the presence of glycines in repeated motifs or isolated along the primary amino acid sequence and were described to present diverse roles. In plants, GRPs were described to act in cell wall structure, cell elongation, signal transduction, defense, RNA binding, as well as present antimicrobial activity (Mangeon *et al.* 2010). In insects, GRPs are involved in cuticle construction (Andersen *et al.* 1995; Zhong *et al.* 2006) and their expression were shown to be increased in response to stress induced by insecticides, making the cuticle more resistant in face of the new conditions (Zhang *et al.* 2008). Glycine repeats were also detected in proteins from mollusk shells (Sudo *et al.* 1997), silkworms chorion proteins (Tsilout *et al.* 1983) and in silk proteins of spiders (Yamaguchi *et al.* 2009; Yazawa *et al.* 2011). GRPs may also present distinct patterns of glycine distribution, presence of conserved motifs and signal peptide (Sachetto-Martins *et al.* 2000). In ticks, little is known about their functions. The salivary GRPs roles are usually suggested to be linked to the cement cone, which fixes tick mouthparts on the host, helping in its structure formation (Bishop *et al.* 2002; Bullard *et al.* 2016b). RmGRP contains a putative signal peptide and showed to be expressed in female salivary glands, as well as was recognized by sera from rabbits immunized with saliva and salivary glands of *R. microplus* females, indicating that this protein is probably secreted to the extracellular environment. In addition, RmGRP presents six glycine repeats of FGGN, GFGN or GFGGN, preceded or not by P (proline) in its C-terminal portion, which are conserved in GRPs from *R. appendiculatus*, *R. pulchellus*, *A. maculatum*, *A. cajennense*, *A. americanum*

and *I. scapularis*. Plant GRPs present very similar repeats, including GGX, GGXXXGG, GXGX and GGX/GXGX (Mangeon *et al.* 2010). Moreover, the amino acid sequence of a spicule matrix protein of *Hemicentrotus pulcherrimus* micromeres presents repeated regions as QPGFGNQPG[M/V]GG[R/Q/N] (Katoh-Fukui *et al.* 1992), therefore including the PGFGN repeat found in RmGRP. Other spicule matrix proteins present the same organization of RmGRP, including a signal peptide and the presence of G[F/M/V]GG repeats preceded by proline in the half end (Livingston *et al.* 1991), indicating that these glycine repeats can be present in proteins from evolutionary distant organisms. Among the roles suggested for matrix spicule proteins include tissue biomineralization during the sea urchin development (Killian *et al.* 2010). In ticks, a large variation is found in the glycine repeats of GRPs, including a “GLX” triplet repeat domain in the N-terminus and “GSP” in a central repeat block in *R. appendiculatus* GRPs (Bishop *et al.* 2002), “GYG” in *R. annulatus* (Shahein *et al.* 2013) and “GLX” in a *R. haemaphysaloides* counterpart (Zhou *et al.* 2006).

Cement proteins are essential to tick fixation and feed on the host, thereby are potential candidates to compose a vaccine against ticks (Mulenga *et al.* 1999; Zhou *et al.* 2006). A truncated form of 64P protein (64trp3), isolated from *R. appendiculatus*, is an example of GRP that provided protection to the immunized host, increasing the mortality rate of adult ticks (Trimnell *et al.* 2002, 2005). Havlíková *et al.* (2009) found variants in the 64P protein that can be explained by instability of repeated glycine motifs in the C-terminal region, which proved to be highly immunogenic but not protective. It is suggested that the conformation of this protein in saliva remains the C-terminal portion exposed to the host during the tick feeding and, as the glycine repeats are characteristics of vertebrate extracellular matrix proteins, their exposure could result in the evasion of the host's immune system (Trimnell *et al.* 2002). RmGRP presents glycine repeats in its half end, as well as spicule matrix proteins of sea urchin (Katoh-Fukui *et al.* 1991), silk proteins (Beckwitt *et al.*

1998) of spiders and some tick GRPs (Trimnell *et al.* 2002; Ribeiro *et al.* 2006; Francischetti *et al.* 2008). Therefore, analogously to 64P, the C-terminal half of RmGRP is possibly immune-dominant and more exposed to the host. This feature may be especially important in the *R. microplus*-host relationship since an expressed sequence tags (ESTs) analysis detected a larger quantity of GRPs in *R. microplus*, when compared to *R. sanguineus* and *A. cajennense* (Maruyama *et al.* 2010). As *R. microplus* is monoxenous, it spends more days fixed and feeding on a same host than a heteroxenous species (Kemp *et al.* 1982). Thereby, the presence of different types of GRPs may be strategic to evade the host's immune system, alternating the expression of these proteins during feeding. In this scenario, it is suggested that the host should mount an immune response against an initial exposed tick GRP, but then the synthesis of the first protein is diminished or turned off while the transcription of a new GRP is activated (Maruyama *et al.* 2010; Kim *et al.* 2016). In addition, it was suggested that Brevirostrata ticks tend to express more glycine-rich protein genes than Longirostrata species (Maruyama *et al.* 2010; de Castro *et al.* 2016).

rRmGRP was recognized by sera raised against adult saliva, further indicating its secretion into the host, in accordance with the presence of the signal peptide and the described secretion of tick salivary GRPs (Garcia *et al.* 2014; Tirloni *et al.* 2014; Karim and Ribeiro, 2015). In this sense, the relative high transcription of *rmgrp* in salivary glands was expected, but the fact that *rmgrp* expression was significantly higher in salivary glands from fully engorged than partially engorged females deserves further attention. Adult female engorgement in *R. microplus* precedes its drop from the bovine, and, additionally, salivary glands degradation starts while the tick is still fixed to the host (Bennington, 1977; Nunes *et al.* 2006). Therefore, the high expression of *rmgrp* in salivary glands of fully engorged females suggests additional roles for RmGRP possibly not strictly linked to the tick-host interaction. Indeed, the qRT-PCR data shows the presence of *rmgrp* expression in eggs and

other adult tissues besides the salivary glands, as well as corroborates the lack of recognition of rRmGRP by anti-gut serum and its recognition by sera anti-salivary glands and anti-eggs. In this sense, Bullard *et al.* (2016a) analyzed mRNA expression levels of nine GRPs of *A. americanum* in unfed and fed ticks 24 h to 168 h after attachment and verified distinct expression profiles during the blood meal, and mRNA of some proteins were detected in the end of the feeding period. Similarly, Kim *et al.* (2016) identified GRPs in salivary glands of *Ixodes scapularis* partially fed for 24, 48, 72, 96 and 120 h as well as in fully fed ticks detached and not detached from the host. They found the largest variety of GRPs in fully fed ticks detached from the host and a greater relative abundance of GRPs in fully fed ticks collected on the host. Therefore, different tick species seem to overexpress some GRPs upon blood repletion, as could be seen for *rmgrp*. High expression levels were also presented by *rmgrp* in larvae, what may be consistent with a function of RmGRP in the cement cone formation (Harnnoi *et al.* 2006; Bullard *et al.* 2016b). Conversely, it must be emphasized that cement formation tends to be structured until 24h of fixation (Binnington, 1977), therefore high levels of mRNA transcription to cement proteins are not likely to be present in partially and fully engorged adult females. The particular high *rmgrp* mRNA levels detected in 1-day-old larvae can also be associated with the results found in the RNAi experiment. Although no effect could be seen in treated ticks in mortality or oviposition, a significantly low hatching rate was verified, indicating a likely role of RmGRP in larvae development. On the other hand, since Ixodidae ticks present several GRPs, which may have different or overlapping roles (Maruyama *et al.* 2010; Kim *et al.* 2016), the low hatching rate of dsRmGRP treated females could also be at least partly derived from a possible cross-reaction with other GRPs, which would share similar mRNA sequences. Indeed, GRPs were already detected in *R. microplus* frustrated larvae transcriptome (Lew-Tabor *et al.* 2010) and in unfed larvae proteome (Untalan *et al.* 2005), while Rodriguez-Valle *et al.* (2010) detected transcripts of

GGY domain proteins in frustrated, but not in unfed larvae, suggesting that these proteins are associated to the cement cone and the transcription in early stages indicates a role in tick-host attachment process.

The mRNA transcription of *rmgrp* in males corroborates with transcriptomes and proteomes analyzes that found GRPs in saliva and salivary glands of *R. appendiculatus* (de Castro *et al.* 2016), *R. pulchellus* (Tan *et al.* 2015) and *Ornithodoros moubata* (Díaz-Martín *et al.* 2013) males. Furthermore, in *R. appendiculatus* and *R. pulchellus*, these proteins presented higher expression levels in salivary glands from males than females (Tan *et al.* 2015; de Castro *et al.* 2016). This high expression was attributed to feeding and mating behavior of males, which attach and detach where the females are feeding and, therefore, need constantly to secrete salivary proteins, as GRPs, to fix to the host and/or to “help” the coupled female to modulate the immune and hemostatic systems (Wang *et al.* 1998).

Tick GRPs have been shown to be expressed with considerable variability in tissues/developmental stages. While *rmgrp* was not detected only in guts among the female adult tissues tested, Zhou *et al.* (2006) showed expression of a GRP from *R. hemaphysaloides* (RH50) only in salivary glands after blood feeding, but not in ovaries, guts and fat bodies of unfed and fed females. On the other hand, likewise *rmgrp*, Jiang *et al.* (2014) detected Hq15 (an alanine-, proline-, glycine-, threonine- and serine- rich protein of *H. qinghaiensis*) in larvae, nymphs, adult ticks, eggs, salivary glands and carcasses, but not in midguts. Furthermore, Shahein *et al.* (2013) analyzed the GRPs from *R. annulatus* RaSaI1, RaSaI2 and RaSaI3, showing that all genes were expressed in 12- and 18-day-old eggs, but only RaSaI2 showed a very low expression level in 6-day-old eggs. RaSaI and RmGRP seem to be expressed in a very similar embryogenesis period, although these GRPs do not present similar sequences. Lew-Tabor *et al.* (2010) reported the expression of a *R. microplus* GRP in adult males and female salivary glands, presenting a significant higher expression in nymphs, but

not in adult female guts and ovaries. Indeed, Perner *et al.* (2016) detected two transcripts encoding GRPs in midgut from females only during the slow feeding phase of *I. ricinus*. Due to the large description of tick transcriptomes and proteomes, GRPs have been identified in tissues and development stages from a variety of other tick species, including *A. americanum* (Radulović *et al.* 2014), *H. flava* (Xu *et al.* 2016) and *Dermacentor variabilis* (Anderson *et al.* 2008).

Potential candidate antigens/molecules for anti-tick vaccines can be classified as exposed (usually secreted in saliva and capable to interact with the host immune system during a natural infestation) or concealed (hidden from the host immune system in a natural infestation) (Willadsen and Kemp, 1988; Mulenga *et al.* 2000). In addition to its putative secretion in saliva, RmGRP was recognized by sera from infested bovines, which makes it an exposed antigen. The rRmGRP recognition by almost all tested sera from naturally infested *B. indicus* or experimentally infested *B. taurus* indicates its high antigenicity, what have been reported for other tick GRPs (Bishop *et al.* 2002; Trimmell *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2006). The experimentally infested *B. taurus* sera also showed a heterogeneous pattern of recognition between and within bovines, under light and heavy infestations. Such heterogeneity has already been reported when analyzing tick tissues/developmental stages protein extracts (Cruz *et al.* 2008) or recombinant *R. microplus* paramyosin (Leal *et al.* 2013). In contrast, all three bovines presented a clear recognition following the first infestation. Indeed, as bovines one and three showed strong recognitions among sera from light infestations and one heavy infested serum bovine did not recognize rRmGRP, it can be inferred that anti-RmGRP IgG levels are naturally modulated during consecutive infestations and are influenced greatly by immune characters other than the amount of antigen disposal. The recognition of rRmGRP by all tested sera from naturally infested *B. indicus* suggests that these putative naturally acquired resistant hosts maintain an IgG response under field conditions, although levels of IgG do not

necessary correlate with naturally acquired resistance following tick infestations (Cruz *et al.* 2008; Piper *et al.* 2016), even when dealing with essential molecules, as the functionally important portions may not be targeted or immunodominant (Havlíková *et al.* 2009). Additionally, the presence of the protein in non-salivary tissues, such as ovaries and fat bodies, as well as in eggs and larvae, suggest that this protein could be targeted in a ‘dual action strategy’, presenting properties of exposed and concealed antigens. ‘Dual action’ vaccines target both exposed and concealed antigenic epitopes, thus, host antibodies against the salivary RmGRP could cross-react with hidden epitopes, becoming more efficient (Nuttall *et al.* 2006), as previously described for 64P (Trimnell *et al.* 2002). However, the suggested reinforce of the immune response by natural infestations (Nuttall *et al.* 2006) should be evaluated on a “case by case” basis, as infestation density and host genetic heterogeneity seem to influence immune responses greatly (Ogden *et al.* 2002; Cruz *et al.* 2008), as could be seen for RmGRP. Other vaccination trials using GRPs as antigen were already described, such as RH50 of *R. haemaphysaloides*, which resulted in a low rate of attachment and high mortality of nymphs (Zhou *et al.* 2006), and p29 of *H. longicornis*, which showed a decrease of weight of fed females and an increase of larvae and nymphs mortality (Mulenga *et al.* 1999).

In the present study, we described the cDNA and amino acid sequences encoding to RmGRP, which presented glycine content and repeats characteristic from the superfamily of GRPs. The presence of the *rmgrp* mRNA in various tissues and developmental stages indicates its probable importance in different periods of the *R. microplus* life cycle. The rRmGRP recognition by naturally and experimentally infested bovines sera, the low larvae hatching from females silenced with dsRmGRP, the probable RmGRP presence in most adult tissues/developmental stages, in addition to important effects in ticks by previous vaccination trials with other GRPs, turns rRmGRP a potential antigen that deserves a further investigation in order to compose an anti-tick vaccine. We can also infer that RmGRP is possibly essential



in functions other than the host-parasite interface, such as larvae development, thereby opening new challenges for unraveling the importance of GRPs in tick biology.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Maria Claudia Rosa Garcia, Joanna Ines Ayres Reis, Betânia Souza de Freitas and Gaby Renard for their technical help and Sérgio Silva da Silva by providing of infested bovine sera.

### **FINANCIAL SUPPORT**

This study was supported by INCT-Entomologia Molecular, CNPq, CAPES and FAPERGS.

## REFERENCES

- Andersen, S. O., Hojrup, P. and Roepstorff, P.** (1995). Insect cuticular proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **25**, 153-176. doi: 0965-1748(94)00052-2.
- Anderson, J. M., Sonenshine, D. E. and Valenzuela, J. G.** (2008). Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics* **9**, 552. doi: 10.1186/1471-2164-9-552.
- Beckwitt, R., Arcidiacono, S. and Stote, R.** (1998). Evolution of repetitive protein: spider silks from *Nephila clavipes* (Tetragnathidae) and *Araneus bicentenarius* (Araneidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 121-30. doi: 10.1016/S0965-1748(97)00083-0.
- Bennington, K. C.** (1978). Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *International Journal for Parasitology* **8**, 97-115. doi: 10.1016/0020-7519(78)90004-8.
- Bishop, R., Lambson, B., Wells, C., Pandit, P., Osaso, J., Nikonge, C., Morzaria, S., Musoke, A. and Nene, V.** (2002). A cement protein of the tick *Rhipicephalus appendiculatus*, located in the secretory cell granules of the type III salivary gland acini, induces strong antibody responses in cattle. *International Journal for Parasitology* **32**, 833-842. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00027-9.
- Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S.** (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology* **294**, 1351-1362. doi: 10.1006/jmbi.1999.3310.

**Bullard, R. L., Williams, J. and Karim, S. (2016a).** Temporal gene expression analysis and RNA silencing of single and multiple members of gene family in the lone star tick *Amblyomma americanum*. *PLoS ONE* **11**, e0147966. doi: 10.1371/journal.pone.0147966.

**Bullard, R. L., Allen, P., Chao, C. C., Douglas, J., Das, P., Morgan, S. E., Ching, W. M. and Karim, S. (2016b).** Structural characterization of tick cement cones collected from in vivo and artificial membrane blood-fed lone star ticks (*Amblyomma americanum*). *Ticks and Tick-Borne Diseases* **7**, 880-892. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.04.006.

**Bustin, S. A., Beaulieu, J. F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F. S. B., Olsvik, P. A., Penning, L. C. and Toegel, S. (2010).** MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Molecular Biology* **11**, 74. doi: 10.1186/1471-2199-11-74.

**Canal, C. W., Maia, H. M., da Silva Vaz Jr., I., Chies, J. M., Farias, N. A. R., Masuda, A., Gonzales, J. C., Ozaki, L. S. and Dewes, H. (1995).** Changing patterns of vitellin-related peptides during development of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental & Applied Acarology* **19**, 325-336. doi: 10.1007/BF00052390.

**Cruz, A. P. R., Silva, S. S., Mattos, R. T., da Silva Vaz Jr., I., Masuda, A. and Ferreira, C. A. S. (2008).** Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines. *Veterinary Parasitology* **158**, 152-158. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.08.016.

**da Silva Vaz Jr., Ozaki, L. S. and Masuda, A.** (1994). Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissues. *Veterinary Parasitology* **52**, 71-78. doi: 10.1016/0304-4017(94)90037-X.

**da Silva Vaz Jr., Logullo, C., Sergine, M., Veloso, F. F., Rosa de Lima, M. F., Gonzales, J. V., Masuda, H., Oliveira, P. L. and Masuda, A.** (1998). Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **66**, 331-341. doi: 10.1016/S0165-2427(98)00194-9.

**de Castro, J. J. and Newson, R. M.** (1993). Host resistance in cattle tick control. *Parasitology Today* **9**, 13-17. doi: 10.1016/0169-4758(93)90154-8.

**de Castro, M. H., de Klerk, D., Pienaar, R., Latif, A. A., Rees, D. J. G. and Mans, B. J.** (2016). De novo assembly and annotation of the salivary gland transcriptome of *Rhipicephalus appendiculatus* male and female ticks during blood feeding. *Ticks and Tick-Borne Diseases* **7**, 536-548. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.01.014.

**de la Fuente, J., Rodríguez, M., Montero, C., Redondo, M., García-García, J. C., Méndez, L., Serrano, E., Valdés, M., Enríquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boué, O., Machado, H. and Leonart, R.** (1999). Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac™. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* **15**, 143-148. doi: 10.1016/S1050-3862(99)00018-2.

**de la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., de la Lastra, J. M. P., Kocan, K. M. and Willadsen, P.** (2007). A ten-year review of commercial vaccine performance for control of

tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews* **8**, 23-28. doi: 10.1017/S1466252307001193.

**de la Fuente, J., Kopáček, P., Lew-Tabor, A. and Maritz-Oliver, C.** (2016). Strategies for new and improved vaccines against ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*, in Press. doi: 10.1111/pim.12339.

**de Vos, S., Zeinstra, L., Taoufik, O., Willadsen, P. and Jongejan, F.** (2001). Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Experimental & Applied Acarology* **25**, 245-261. doi: 10.1023/A:1010609007009.

**Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Valero, L., Oleaga, A., Encinas-Grandes, A. and Pérez-Sánchez, R.** (2013). An insight into the proteome of the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata* reveals important differences in saliva protein composition between the sexes. *Journal of Proteomics* **80**, 216-235. doi: 10.1016/j.jprot.2013.01.015.

**Dunn, S. D.** (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on western blots by monoclonal antibodies. *Analytical Biochemistry* **157**, 144-153. doi: 10.1016/0003-2697(86)90207-1.

**Fabres, A., de Andrade, C. P., Guizzo, M., Sorgine, M. H. F., Paiva-Silva, G. D., Masuda, A., da Silva Vaz Silva, I. and Logullo, C.** (2010). Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. *Parasitology* **137**, 1537-1546. doi: 10.1017/S0031182010000284.

**Ferreira, C. A. S., Barbosa, M. C., Silveira, T. C. L., Valenzuela, J. G., da Silva Vaz Jr., I. and Masuda, A.** (2002). cDNA cloning, expression, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. *Parasitology* **125**, 265-274. doi: 10.1017/S0031182002002019.

**Fielden, L. J., Rechav, Y. and Bryson, N. R.** (1992). Acquired immunity to larvae of *Amblyornma marmoreurn* and *A. hebraeum* by tortoises, guinea-pigs and guinea-fowl. *Medical and Veterinary Entomology* **6**, 251-254. doi: 10.1111/j.1365-2915.1992.tb00614.x.

**Fragoso, H., Rad, P. H., Ortiz, M., Rodríguez, M., Redondo, M., Herrera, L. and de la Fuente, J.** (1998). Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* BmS6-containing vaccine Gavac. *Vaccine* **16**, 1990-1992. doi: 10.1016/S0264-410X(98)00116-9.

**Francischetti, I. M. B., Meng, Z., Mans, B. J., Guderra, N., Hall, M., Veenstra, T. D., Pham, V. M., Kotsyfakis, M. and Ribeiro, J. M. C.** (2008). An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. *Journal of Proteomics* **71**, 493-512. doi: 10.1016/j.jprot.2008.07.006.

**Garcia, G. R., Gardinassi, L. G., Ribeiro, J. M., Anatriello, E., Ferreira, B. R., Moreira, H. N. S., Mafra, C., Martins, M. M., Szabó, M. P. J., de Miranda-Santos, I. K. F. and Maruyama, S. R.** (2014). The sialotranscriptoma of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. *Parasites & Vectors* **7**, 430. doi: 10.1186/1756-3305-7-430.

**Garnier, J., Gibrat, J-F. and Robson, B.** (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. In *Methods in enzymology* (ed. Doolittle, R. F.), pp: 540-553. Academic Press, San Diego, CA.

**Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A.** (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (ed. Walker, J. M.), pp: 571-607. Humana Press, Totowa, NJ.

**Harnnoi, T., Sakaguchi, T., Xuan, X. and Fujisaki, K.** (2006). Identification of genes encoding cement-like antigens expressed in the salivary glands of *Haemaphysalis longicornis*. *Parasitology* **68**, 1155-1160. doi: 10.1292/jvms.68.1155.

**Havlíková, S., Roller, L., Koči, J., Trimnell, A. R., Kazimírová, M., Klempa, B. and Nuttall, P. A.** (2009). Functional role of 64P, the candidate transmission-blocking vaccine antigen from the tick, *Rhipicephalus appendiculatus*. *International Journal for Parasitology* **39**, 1485-1494. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.05.005.

**Jiang, X., Gao, J., Wang, W., Xu, M., Li, W., Qi, M., Yang, C., Ji, L., Zhang, D., Luo, J. and Yin, H.** (2014). Molecular characterization of an alanine-, proline-, glycine-, threonine-, and serine-rich protein of the hard tick *Haemaphysalis qinghaiensis* and its effect as a vaccine against tick infestation in sheep. *Ticks and Tick-Borne Diseases* **5**, 14-20. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.07.008.

**Jiz, M., Wu, H., Meng, R., Pond-Tor, S., Reynolds, M., Friedman, J. F., Olveda, R., Acosta, L. and Kurtis, J. D.** (2008). Pilot-scale production and characterization of paramyosin, a vaccine candidate for schistosomiasis japonica. *Infection and Immunity* **76**, 3164-3169. doi: 10.1128/IAI.00012-09.

**Karim, S. and Ribeiro, J. M. C.** (2015). An insight into the sialome of the lone star tick, *Amblyomma americanum*, with a glimpse on its time dependent gene expression. *PLoS ONE* **10**, e0131292. doi: 10.1371/journal.pone.0131292.

**Katoh-Fukui, Y., Noce, T., Ueda, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, N., Higashinakagawa, T., Killian, C. E., Livingston, B. T., Wilt, F. H., Benson, S. C., Sucov, H. M. and Davidson, E. H.** (1991). The corrected structure of the SM50 spicule matrix protein of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Developmental Biology* **145**, 201-201. doi: 10.1016/0012-1606(91)90226-S.

**Katoh-Fukui, Y., Noce, T., Ueda, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, N., Tanaka, S. and Higashinakagawa, T.** (1992). Isolation and characterization of cDNA encoding a spicule matrix protein in *Hemicentrotus pulcherrimus* micromeres. *The International Journal of Developmental Biology* **36**, 353-361.

**Kemp, D. H., Stone, B. F. and Binnington, K. C.** (1982). Tick attachment and feeding: role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and host response. In *Physiology of Ticks* (ed. Obenchain, FD, Galun, R.), pp: 119-168. Pergamon Press, Oxford, UK.



- Killian, C. E., Croker, L. and Wilt, F. H. (2010).** SpSM30 gene family expression patterns in embryonic and adult biomineralized tissues of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Gene Expression Patterns* **10**, 135-139. doi: 10.1016/j.gep.2010.01.002.
- Kim, T. K., Tirloni, L., Pinto, A. F. M., Moresco, J., Yates, J. R., da Silva Vaz, I. and Mulenga, A. (2016).** *Ixodes scapularis* tick saliva proteins sequentially secreted every 24 h during blood feeding. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **10**, e0004323. doi: 10.1371/journal.pntd.0004323.
- Kotál, J., Langhansová, H., Lieskovská, J., Andersen, J. F., Francischetti, I. M. B., Chavakis, T., Kopecký, J., Pedra, J. H. F., Kotsyfakis, M. and Chmelař, J. (2015).** Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics* **128**, 58-68. doi: 10.1016/j.jprot.2015.07.005.
- Leal, B. F., Seixas, A., Mattos, R. T., Coutinho, M. L., Masuda, A., da Silva Vaz Jr., I. and Ferreira, C. A. S. (2013).** Tissue expression and the host's immunological recognition of a *Rhipicephalus microplus* paramyosin. *Veterinary Parasitology* **197**, 304-311. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.06.020.
- Lew-Tabor, A. E., Moolhuijzen, P. M., Vance, M. E., Kurscheid, S., Rodriguez Valle, M., Jarrett, S., Minchin, C. M., Jackson, L. A., Jonsson, N. N., Bellgard, M. I. and Guerrero, F. D. (2010).** Suppressive subtractive hybridization analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larval and adult transcript expression during attachment and feeding. *Veterinary Parasitology* **167**, 304-320. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.033.

**Livingston, B. T., Shaw, R., Bailey, A. and Wilt, F.** (1991). Characterization of a cDNA encoding a protein involved in formation of the skeleton during development of the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Developmental Biology* **148**, 473-480.

**Lovis, L., Reggi, J., Berggoetz, M., Betschart, B. and Sager, H.,** 2013. Determination of acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) field populations of Argentina, South Africa, and Australia with the larval tarsal test. *Journal of Medical Entomology* **50**, 326-335. doi: 10.1603/ME12127.

**Mangeon, A., Junqueira, R. M. and Sachetto-martins, G.** (2010). Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signaling Behavior* **5**, 99-104.

**Maruyama, S. R., Anatriello, E., Anderson, J. M., Ribeiro, J. M., Brandão, L. G., Valenzuela, J. G., Ferreira, B. R., Garcia, G. R., Szabó, M. P. J., Patel, S., Bishop, R. and de Miranda-Santos, I. K. F.** (2010). The expression of genes coding for distinct types of glycine-rich proteins varies according to the biology of three metastriate ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense*. *BMC Genomics* **11**, 363. doi: 10.1186/1471-2164-11-363.

**Mendes, E. C., Mendes, M. C. and Sato, M. E.** (2013). Diagnosis of amitraz resistance in Brazilian populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) with larval immersion test. *Experimental & Applied Acarology* **61**, 357-369. doi: 10.1007/s10493-013-9697-3.

**Mulenga, A., Sugimoto, C., Ingram, G., Ohashi, K. and Onuma, M.** (1999). Molecular

cloning of two *Haemaphysalis Longicornis* Cathepsin L-like cysteine proteinase genes. *The Journal of Veterinary Medical Science* **61**, 497-502. doi: 10.1292/jvms.61.497.

**Mulenga, A., Sugimoto, C. and Onuma, M.** (2000). Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and Infection* **2**, 1353-1361. doi: 10.1016/S1286-4579(00)01289-2.

**Nunes, E. T., Mathias, M. I. C. and Bechara, G. H.** (2006). Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) tick female during feeding. *Veterinary Parasitology* **140**, 114-123. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.03.010.

**Nuttall, P. A., Trimnell, A. R., Kazimirova, M. and Labuda, M.** (2006). Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology* **28**, 155-163. doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00806.x.

**Ogden, N. H., Casey, A. N. J., French, N. P., Adams, J. D. W. and Woldehiwet, Z.** (2002). Field evidence for density-dependent facilitation amongst *Ixodes ricinus* ticks feeding on sheep. *Parasitology* **124**, 117-125. doi: 10.1017/S0031182001001081.

**Perner, J., Provazník, J., Schrenková, J., Urbanová, V., Ribeiro, J. M. C. and Kopáček, P.** (2016). RNA-seq analyses of the midgut from blood- and serum-fed *Ixodes ricinus* ticks. *Scientific Reports*. 6, 36695. doi: 10.1038/srep36695.

**Petersen, T. N., Brunak, S., Heijne, G. V. and Nielsen, H.** (2011). SignalP 4.0:

discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* **8**, 785-786. doi: 10.1038/nmeth.1701.

**Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST ©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. **30**, e36. doi: 10.1093/nar/30.9.e36.

**Piper, E. K., Jonsson, N. N., Gondro, C., Vance, M. E., Lew-Tabor, A. E. and Jackson, L. A.** (2016). Peripheral cellular and humoral responses to infestation with the cattle tick *Rhipicephalus microplus* in Santa-Gertrudis cattle. *International Journal for Parasitology* **4067**, in Press. doi: 10.1111/pim.12402.

**Pohl, P. C., Sorgine, M. H. F., Leal, A. T., Logullo, C., Oliveira, P. L., da Silva Vaz Jr. and Masuda, A.** (2008). An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* **151**, 392-399. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.08.008.

**Pohl, P. C., Klafke, G. M., Carvalho, D. D., Martins, J. R., Daffre, S., da Silva Vaz Jr., I. and Masuda, A.** (2011). ABC transporter efflux pumps: A defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *International Journal For Parasitology* **41**, 1323-1333. doi: 10.1016/j.ijpara.2011.08.004.

**Radulović, Ž. M., Kim, T. K., Porter, L. M., Sze, S.-H., Lewis, L. and Mulenga, A.** (2014). A 24-48 h fed *Amblyomma americanum* tick saliva immuno-proteome. *BMC Genomics* **15**, 518. doi: 10.1186/1471-2164-15-518.

**Reck Jr, J., Berger, M., Marks, F. S., Zingali, R. B., Canal, C. W., Ferreira, C. A. S., Guimarães, J. A. and Termignoni, C.** (2009). Pharmacological action of tick saliva upon haemostasis and the neutralization ability of sera from repeatedly infested hosts. *Parasitology* **136**, 1339-1349. doi: 10.1017/S0031182009990618.

**Renard, G., Garcia, J. F., Cardoso, F. C., Richter, M. F., Sanakari, J. A., Ozaki, L. S., Termignoni, C. and Masuda, A.** (2000). Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 1017-1026. doi: 10.1016/S0965-1748(00)00070-9.

**Ribeiro, J. M. C.** (1987). Role of saliva in blood feeding by arthropods. *Annual Reviews of Entomology* **32**, 463-478. doi: 10.1146/annurev.en.32.010187.002335.

**Ribeiro, J.M.C., Alarcon-Chaidez, F., Francischetti, I. M. B., Mans, B. J., Mather, T. N., Valenzuela, J. G. and Wikel, S. K.** (2006). An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **36**, 111-129. doi: 10.1016/j.ibmb.2005.11.005.

**Roberts, A. J. A.** (1968). Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini). I. Development of ticks on *Bos taurus*. *The Journal of Parasitology* **54**, 663-666.

**Rodriguez-Valle, M., Lew-Tabor, A., Gondro, C., Moolhuijzen, P., Vance, M., Guerrero, F. D., Bellgard, M. and Jorgensen, W.** (2010). Comparative microarray analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expression profiles of larvae pre-attachment and feeding

adult female stages on *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *BMC Genomics* **11**, 437. doi: 10.1186/1471-2164-11-437.

**Rott, M. B., Fernández, V., Farias, S., Ceni, J., Ferreira, H. B., Haag, K. L. and Zaha, A.** (2000). Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Tropica* **75**, 331-340. doi: 10.1016/S0001-706X(00)00069-3.

**Sachetto-Martins, G., Franco, L. O. and de Oliveira, D. E.** (2000). Plant glycine-rich proteins: A family or just proteins with a common motif? *Biochimica et Biophysica Acta* **1492**, 1-14. doi: 10.1016/S0167-4781(00)00064-6.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

**Shahein, Y. E., Aboueilla, A. M., Hussein, N. A., Hamed, R. R., El-Hakim, A. E., Abdel-Shafy, S. and Tork, S. E.** (2013). Identification of four novel *Rhipicephalus annulatus* upregulated salivary gland proteins as candidate vaccines. *The Protein Journal* **32**, 392-398. doi: 10.1007/s10930-013-9498-x.

**Shapiro, S. Z., Voigt, W. P. and Ellis, J. A.** (1989). Acquired resistance to ixodid ticks induced by tick cement antigen. *Experimental & Applied Acarology* **7**, 33-41.

**Stentoft, C., Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J., Kong, Y., Vester-Christensen, M. B., Schjoldager, K. T., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N. B., Marcos-Silva, L.,**

**Gupta, R., Bennett, E. P., Mandel, U., Brunak, S., Wandall, H. H., Levery, S. B. and Clausen, H.** (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO Journal* **32**, 1478-1488. doi: 10.1038/emboj.2013.79.

**Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K. and Takahashi, T.** (1997). Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature* **387**, 563-564. doi: 10.1038/42391.

**Tan, A. W. L., Francischetti, I. M. B., Slovak, M., Kini, R. M. and Ribeiro, J. M. C.** (2015). Sexual differences in the sialomes of the zebra tick, *Rhipicephalus pulchellus*. *Journal of Proteomics* **117**, 120-144. doi: 10.1016/j.jprot.2014.12.014.

**Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.

**Tirloni, L., Reck, J., Terra, R. M. S., Martins, J. R., Mulenga, A., Sherman, N. E., Fox, J. W., Yates, J. R., Termignoni, C., Pinto, A. F. M. and da Silva Vaz Jr., I.** (2014). Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: A comparison between partially and fully engorged females. *PLoS ONE* **9**, e94831. doi: 10.1371/journal.pone.0094831.

**Trager, W.** (1939). Acquired immunity to ticks. *The Journal of Parasitology* **25**, 57-81.

**Trimnell, A. R., Hails, R. S. and Nuttall, P. A.** (2002). Dual action ectoparasite vaccine

targeting “exposed” and “concealed” antigens. *Vaccine* **20**, 3560-3568. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00334-1.

**Trimnell, A. R., Davies, G. M., Lissina, O., Hails, R. S. and Nuttall, P. A.** (2005). A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine* **23**, 4329-4341. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.03.041.

**Tsitilout, S. G., Rodakis, G. C., Alexopoulou, M., Kafatos, F. C., Ito, K. and Iatroul, K.** (1983). Structural features of B family chorion sequences in the silkworm *Bombyx mori*, and their evolutionary implications. *The EMBO Journal* **2**, 1845-1852.

**Untalan, P. M., Guerrero, F. D., Haines, L. R. and Pearson, T. W.** (2005). Proteome analysis of abundantly expressed proteins from unfed larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 141-151. doi: 10.1016/j.ibmb.2004.10.009.

**Wang, H., Paesen, G. C., Nuttall, P. A. and Barbour, A. G.** (1998). Male ticks help their mates to feed. *Nature* **391**, 753-754. doi: 10.1038/35773.

**Willadsen, P. and Kemp, D. H.** (1988). Vaccination with ‘concealed’ antigens for tick control. *Parasitology Today* **4**, 196-198. doi: 10.1016/0169-4758(88)90084-1.

**Willadsen, P.** (2004). Anti-tick vaccines. *Parasitology* **129**, S367-S387. doi: 10.1017/S0031182003004657.



**Willadsen, P.** (2006). Vaccination against ectoparasites. *Parasitology* **133**, 9-25. doi: 10.1017/S0031182006001788.

**Xu, X. L., Cheng, T. Y., Yang, H. and Liao, Z. H.** (2016). De novo assembly and analysis of midgut transcriptome of *Haemaphysalis flava* and identification of genes involved in blood digestion, feeding and defending from pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* **38**, 62-72. doi: 10.1016/j.meegid.2015.12.005.

**Yamaguchi, E., Yamauchi, K., Gullion, T. and Asakura, T.** (2009). Structural analysis of the Gly-rich region in spider dragline silk using stable-isotope labeled sequential model peptides and solid-state NMR. *Chemical Communications* **28**, 4176-4178. doi: 10.1039/b906145b.

**Yazawa, K., Yamaguchi, E., Knight, D. and Asakura, T.** (2011). <sup>13</sup>C solid-state NMR study of the <sup>13</sup>C-labeled peptide, (E)<sub>8</sub>GGLGGQGAG(A)<sub>6</sub>GGAGQGGYGG as a model for the local structure of *Nephila clavipes* dragline silk (MaSp1) before and after spinning. *Biopolymers* **97**, 347-354. doi: 10.1002/bip.21718.

**Zhang, J., Goyer, C. and Pelletier, Y.** (2008). Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Molecular Biology* **17**, 209-216. doi: 10.1111/j.1365-2583.2008.00796.x.

**Zhong, Y. S., Mita, K., Shimada, T. and Kawasaki, H.** (2006). Glycine-rich protein genes, which encode a major component of the cuticle, have different developmental profiles from

other cuticle protein genes in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **36**, 99-110. doi: 10.1016/j.ibmb.2005.07.005.

**Zhou, J., Gong, H., Zhou, Y., Xuan, X. and Fujisaki, K.** (2006). Identification of a glycine-rich protein from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides* and evaluation of its vaccine potential against tick feeding. *Parasitology Research* **100**, 77-84. doi: 10.1007/s00436-006-0243-7.

```

1 GGCACGAGGTCGTTTTTCTGCCATTCGTTGTCTGGAGACCGGGAGTACCGGCTGTAAACAAA 60
61 GCGCCATGAAATTGTTGCTGGTCGCAGCCGCGCTGGTCGGACTTCCGCTGCGCAAAATT 120
1 1           M K L L L V A A A L V G L S A A Q I 18
121 GTCGAGCGCCGCGTGATCAAGAACCCTGACGGTTCGACCACACACATGGAGAGCAGCTCG 180
19   V E R R V I K N P D G S T T H M E S S S 38
181 TGGGGCCACAGTTCTTTCAACCAGGAGACTTCGGATAATGATGGCCTTATCAGTGGTTCGT 240
39   W G H S S F N Q E T S D N D G L I S G R 58
241 AGCGGCTACGCAGACAGCTCGGGAGTAAACTACGACCGCCACTACACCGTAGACCGCAAT 300
59   S G Y A D S S G V N Y D R H Y T V D R N 78
301 GGACAGCGCCGCTACATCGACCCCAAGGATAGCAAGCTGAAAGGGCCAGCCCCCTCCATC 360
79   G Q R R Y I D P K D S K L K G P A P S I 98
361 CCCATGCCATCAGGTGTCTTCGGAGGTAACGACGATTTCTGTCCGGACGATCAGGCTTC 420
99   P M P S G V F G G N D D F L S G R S G F 118
421 GGCAACTTGCCTGGATTTGGGAACCTTCCCGATTTGGAGGCAACGTGCCCGGATTCGGC 480
119   G N L P G F G N L P G F G G N V P G F G 138
481 GGCAACTTCCCCGGATTCGGCGGCAACCGTAGGAACAATTAAGCACTCGTCTTGCCCCC 540
139   G N F P G F G G N R R N N - 151
541 TGAGTCTTACACTCTTCCACTGTACCTCACCATCGACTCTGTCTTCAACACACTCTGGGT 600
601 GCCCTGTGTCTCCCCCTCCTCTTCACATGCCTTGAAGCCTGCACTGTGGAACAAGGACTT 660
661 GTTCCGAACTCTTCTCCGTGAACGTTTTTCTTCGACATCAGAACCATTGCCCACTCTGTA 720
721 TCTCAAACCAGTCTTCTGTTAGTTCTTTCTCAAACCTCTCTTTATTCTCTTCATCTTCCA 780
781 AACGCATTTCATAAAGCACGAAAGAAATTCGAAAAAAGGAAGTGGGAACCTTACCTAAAG 840
841 ACGTGTAGCAACGCATTTCCCGACCCAATGAGCACCGTTTTTGTTCATATTTTGAAAAAT 900
901 TGCTTTCATATGACGTAACAATTACCTTGCCAAAAACAATGAACTCTTTCTCTAAATGT 960
961 TTTTCTGCTCAGCTACTTTTGAGGCTTTATACAGGGTATCTATTTAATCATGTGATTTTC 1020
1021 GCGCTCATTACGTTTAAGTCAGATGCGAATTCAGTAGCTGCGTATTCGGAGTGGTTTCTG 1080
1081 TCTTTGCTATTA AAAAGCTTGAATCTCCAATCATGCTATGCAATTGTCTCTTTTCAGCAACA 1140
1141 CTGAAATGTGGCGCTTCTTTCCGCTGGATTTCAGATTT 1179

```

Fig. 1. Nucleotide and predicted amino acid sequence of the cDNA of a glycine-rich protein of *Rhipicephalus microplus* (RmGRP). Signal peptide is underlined. Glycine residues and therepeats FGGN, GFGN and GFGGN, preceded or not by P (Proline), are highlighted in gray.

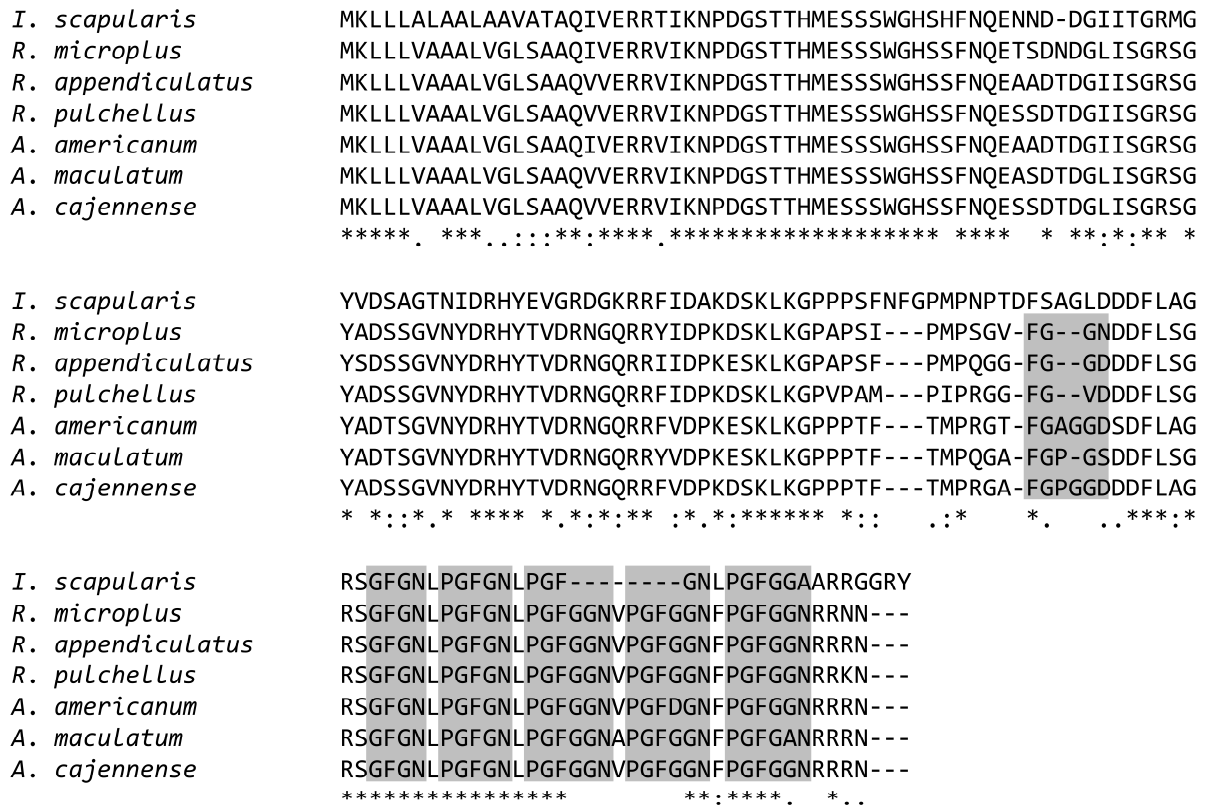


Fig. 2. Multiple sequence alignment analysis. ClustalW was used to align RmGRP with glycine-rich proteins from four tick species. Repeats are highlighted in gray boxes. GenBank accession numbers: *Ixodes scapularis*, AAY66550.1; *Rhipicephalus microplus*, KY271084; *Rhipicephalus appendiculatus*, JAP85432.1; *Rhipicephalus pulchellus*, JAA64016.1; *Amblyomma americanum*, EL593292.1; *Amblyomma maculatum*, AEO33043.1; *Amblyomma cajennense*, JAC24024.1.

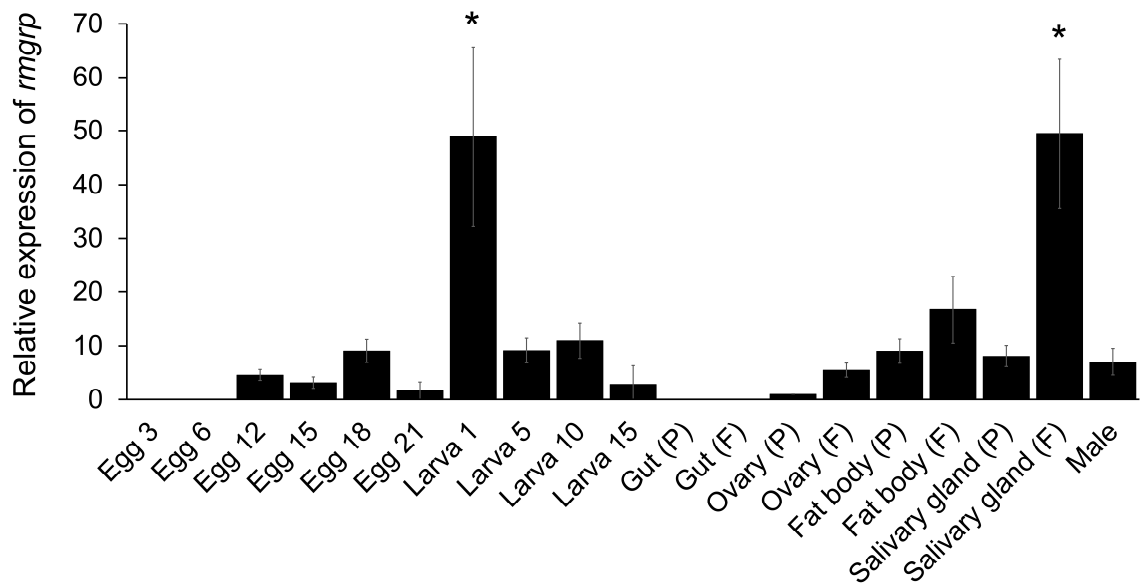


Fig. 3. Analysis of relative *rmgrp* transcript levels in eggs, larvae, partially and fully engorged female tissues and males of *Rhipicephalus microplus* by qRT-PCR. P: Partially engorged females; F: Fully engorged females. Eggs and larvae are represented by days after laying and hatching, respectively. *rmgrp* transcription was normalized using the 40S ribosomal gene. Data are expressed as average  $\pm$  SD. The asterisks (\*) indicate means statically different from others. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA and Tukey post-test ( $P < 0.01$ ).

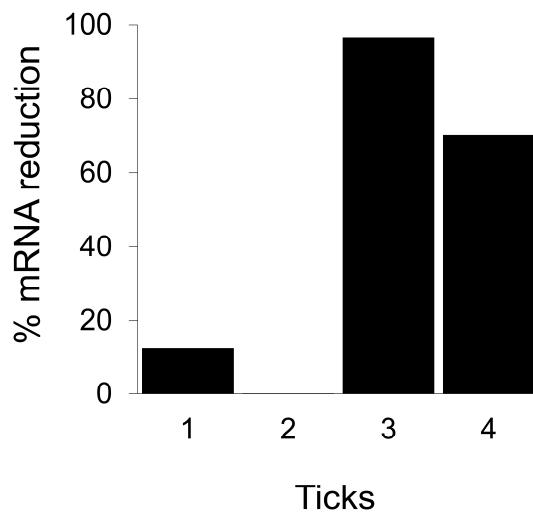


Fig. 4. RNAi-mediated *rmgrp* silencing in ovary of *Rhipicephalus microplus* adult females injected with dsRmGRP or dsMSP1 (control). Ovaries extracted 24 h after treatment were used to determine the suppression of mRNA corresponding to RmGRP of each tick treated (1, 2, 3 and 4). mRNA expression was analyzed by qRT-PCR using the comparative Ct method, which was normalized using the 40S ribosomal gene. Percentage of mRNA reduction was calculated by comparison of *rmgrp* transcription from ticks treated with dsMSP-1 or dsRmGRP.

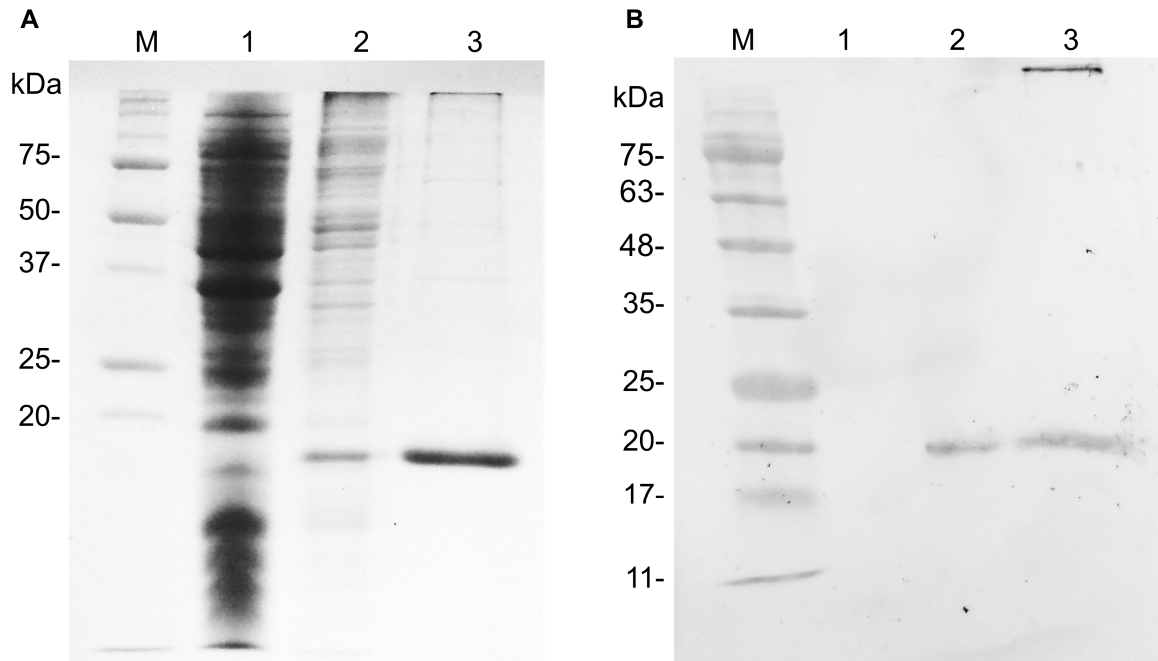


Fig. 5. SDS-PAGE (A) and western-blot (B) analysis of recombinant RmGRP. M: Molecular weight marker; 1: *E. coli* BL21/pET 23a; 2: RmGRP expressed in *E. coli* BL21; 3: rRmGRP purified. Western-blot was performed using Anti-PolyHistidine Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich). Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad) and BLUEye prestained protein ladder (Sigma-Aldrich) were used as molecular weight markers in (A) and (B), respectively.

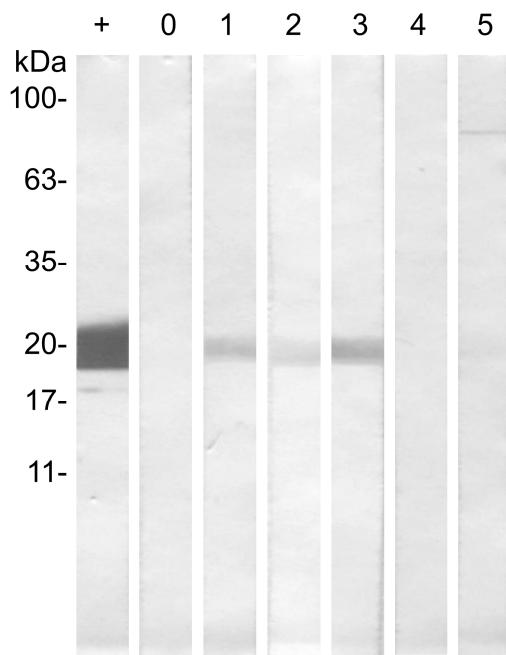


Fig. 6. Western-blot of rRmGRP immunogenicity analysis by rabbit sera. +: Monoclonal Anti-polyHistidine conjugated with alkaline phosphatase; 0: non-immune serum; 1: anti-saliva of partially engorged females serum; 2: anti-salivary glands of partially engorged females serum; 3: anti-saliva of fully engorged females serum; 4: anti-gut serum; 5: anti-egg serum. Sera were diluted 1:200.



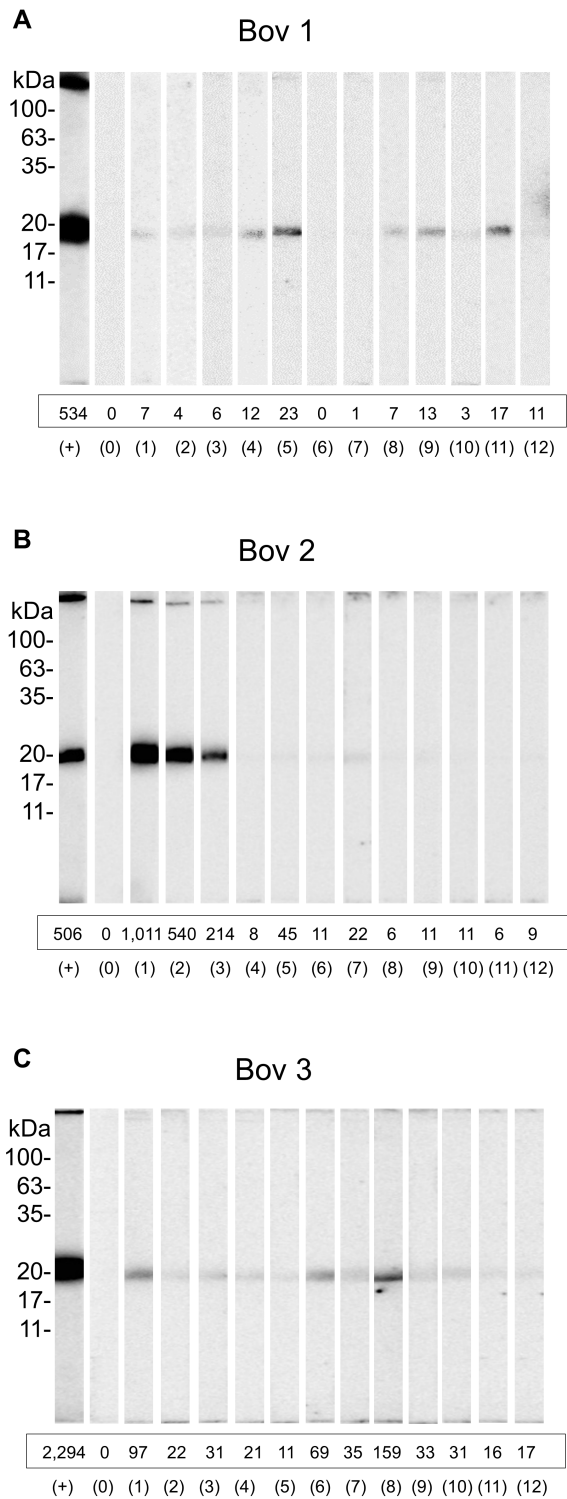


Fig. 7. Recognition of rRmGRP by sera of three experimentally infested *Bos taurus*. The serum respective to each consecutive experimental infestation (infestation number between parentheses) and relative band intensities (infested serum value minus pre-infested serum

value) are indicated below each strip. +: positive control (anti-*R. microplus* saliva rabbit serum); 0: pre-infestation bovine sera; 1-12: bovine sera from twelve successive infestations (6 heavy infestations followed by 6 light infestations). Sera of bovines 1 (A), 2 (B) and 3 (C) were diluted 1:250, 1:250 and 1:200, respectively.

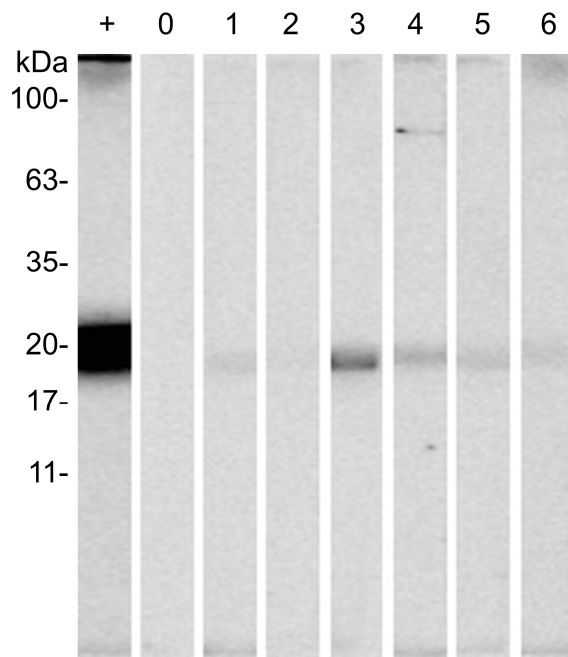


Fig. 8. Recognition of rRmGRP by naturally infested *Bos indicus* sera. +: positive control (anti-*R. microplus* saliva rabbit serum); 0: non-infested bovine serum; 1-6: naturally infested bovine sera. All sera were diluted 1:200.

Table 1. Effect of gene silencing by treatment of partially engorged females with dsRNAs of genes coding for a glycine-rich protein of *Rhipicephalus microplus* (RmGRP)

dsRNA	Weight gain (mg) <sup>a</sup>	Weight gain (%) <sup>b</sup>	Egg weight (mg)	Egg weight reduction (%) <sup>c</sup>	Larvae weight (mg)	Larvae weight reduction (%) <sup>d</sup>	Hatching rate (%) <sup>e</sup>
RmGRP	65±22.8	248.7±94.7	17.4±18.6	28.2	1.5±2.5**	91.4**	8.6
MSP-1*	45.1±31.6	171.6±116.8	24.3±20.6	-	13.4±6.8	-	55.8

\* Merozoite surface protein-1 of *Plasmodium falciparum* (negative control)

\*\*Statistically significant (Statistical analyses were performed by unpaired *t*-test (P<0.001))

Weight gain (mg), weight gain (%), egg weight (mg) and larvae weight (mg) are presented as average ± SD.

<sup>a</sup> final weight - initial weight (before artificial feeding)

<sup>b</sup> weight gain (mg)\*100/ initial weight

<sup>c</sup> (100-(egg weight of each tick treated with dsRmGRP\*100/egg weight mean of dsMSP-1 group))

<sup>d</sup> (100-(larvae weight of each tick treated with dsRmGRP\*100/larvae weight mean of dsMSP-1 group))

<sup>e</sup> (larvae weight mean/ eggs weight mean)\*100

## **Capítulo 3**

### **Resultados parciais**

Introdução

Materiais e métodos

Resultados

### 3.1 INTRODUÇÃO

Os antígenos protetores contra ectoparasitos têm sido classificados como expostos (reconhecidos naturalmente pelo sistema imune do hospedeiro) e ocultos (antígenos não reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro) (40, 41). Experimentos de vacinação com antígenos ocultos mostraram uma proteção parcial do hospedeiro (53, 57, 60). Entretanto, quando alguns antígenos foram combinados, a proteção aumentou, o que indica que um coquetel de antígenos deve ser mais eficiente em elicitar uma resposta imune protetora contra infestações por carrapatos (54, 87). Antígenos expostos também têm sido analisados em ensaios de vacinação (75, 76). A paramiosina (PRM), um antígeno salivar considerado exposto ao sistema imune do hospedeiro (162), foi inicialmente identificada como uma proteína muscular de invertebrados, com provável envolvimento na determinação do comprimento e estabilidade dos filamentos musculares (188, 189). Porém, em parasitos, já foi descrito o seu papel na modulação do sistema imunológico de hospedeiros pela inibição do sistema complemento, pela ligação ao colágeno do tipo I (161, 197) e pela capacidade de ligar a porção Fc de imunoglobulinas (161, 202). Além disso, a PRM mostrou-se um importante antígeno vacinal contra helmintos (217, 236), sendo indicada como uma potencial candidata a compor vacinas contra esquistossomose (213), filariose (215) e cisticercose (216).

A PRM é formada por hélice- $\alpha$  em quase toda a sua extensão, porém apresenta duas regiões com estruturas secundárias distintas, que compreendem as porções N-terminal e C-terminal da proteína (191). Alguns artigos indicam o reconhecimento preferencial da região N-terminal, C-terminal ou interna da PRM de parasitos por soros de hospedeiros infectados (231, 237, 239) e, portanto, a identificação dos fragmentos possivelmente imunodominantes da PRM de *R. microplus* (RmPRM) em bovinos pode ser importante na preparação de um futuro antígeno vacinal.

O objetivo desse trabalho foi clonar e expressar a sequência codificadora das regiões N-terminal, interna e C-terminal da RmPRM em *E. coli* e da sequência completa da RmPRM em *P. pastoris*, além de avaliar os efeitos do silenciamento da proteína em fêmeas parcialmente ingurgitadas.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Clonagem das sequências de DNA codificantes para as regiões N-terminal, interna e C-terminal da RmPRM em vetor procariótico

As sequências de DNA codificantes para as regiões N-terminal (N-PRM), interna (Int-PRM) e C-terminal (C-PRM) da RmPRM foram amplificadas por PCR, resultando em fragmentos de 426 pb, 1861 pb e 438 pb, respectivamente. Os oligonucleotídeos iniciadores diretos e reversos utilizados foram: 5'-atttttcatatgtctagcaggagcagcaag-3' e 5'-tttttgaattctca ATGGTGATGGTGATGATGctgttctctgcacatctctgcgacgg-3', para a N-PRM; 5'-**caccatggacctcatg** accaaggcc-3' e 5'-tcaATGGTGATGGTGATGATGagcctccagcttcgcatg-3', para a Int-PRM; 5'-**caccatgaggatccgcatgttgagatcg**-3' e 5'-aaaaagaattcttaGTGGTGGGTGGTGGTGGTGGaagttctggctggactcctcg-3', para a C-PRM. Todos os oligonucleotídeos iniciadores reversos foram desenhados com uma sequência codificante para uma cauda de seis histidinas (indicados acima em letras maiúsculas). Em negrito está representada a região complementar ao plasmídeo em que a sequência foi inserida, enquanto que os códons de término estão sublinhados. Os oligonucleotídeos iniciadores descritos acima para Int-PRM e C-PRM foram sintetizados de acordo com as recomendações do “Champion pET Directional TOPO Expression kit” (Invitrogen) e os amplificados resultantes foram clonados por recombinação no vetor pET101/D-TOPO, usando o kit de clonagem citado. Já os oligonucleotídeos iniciadores sintetizados para a N-PRM continham sítios de restrição para *NdeI* e *EcoRI* (em itálico). O produto de PCR correspondente à N-PRM foi clonado no vetor PCR-Blunt usando o “Zero Blunt PCR Cloning kit” (Invitrogen) e o plasmídeo recombinante foi clivado com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI*. O fragmento resultante foi inserido no vetor de expressão pET 23a (Novagen), previamente clivado com as mesmas enzimas de restrição, usando “T4 DNA ligase” (Fermentas).

```

1  ATGTCTAGCAGGAGCAGCAAGTACATGTACAAGAGCAGCGAGGTGCTGGAGATATCTCCATCGAATATGGCACCGACCTCGGCGCACTACCAGGCTTGAGGACAAGCTCCGCCTGCTT 120
1  M S S R S S K Y M Y K S S G G A G D I S I E Y G T D L G A L T R L E D K L R L L 40
121 CAAGAGGACCTCGAGTCCGAACGGGAGCTCAGGCAAAAGATTGAGCGCGAGAAGTCGGACCTGACGGTGCAGCTGATGCAGCTGAGCGACCGCTTGAAGAAGCCGAGGGCTCCCTCGGAG 240
41  Q E D L E S E R E L R Q R I E R E K S D L T V Q L M Q L S D R L E E A E G S S E 80
241 ACTGTGGTCGAGATGAACAAGAAGCGCGACACCGAGCTGCCAAGCTGCGCAAGCTGCTCGAGGATGTGCACCTGGAGAGCGAGGAGACTGCACACCACCTGCGCAAGAAGCACCAGGAG 360
81  T V V E M N K K R D T E L S K L R K L L E D V H L E S E E T A H H L R K K H Q E 120
361  GCGTCCGAGAGATGCAAGAACAGATGGACCTCATGACCAAGGCCAAGAGCAAGGCCGAGAAGGAGAGGCAAGTTCCAGGCCGAAGTTACGAGCTCTGGCTCAGGTGGAAAAACAG 480
121  A V A E M Q E Q M D L M T K A K S K A E K E R Q K F Q A E V Y E L L A Q V E N T 160
481 AACAAAGGAGAAGATCACGATCCAGAAGACCGTGGAGAAGCTGGAGCACACCGTGTACGAGCTGAACATCCGCATCGAGGAACGAACCGCACCGTACCAGGAGTACCGCCAGAGGACC 600
161  N K E K I T I Q K T V E K L E H T V Y E L N I R I E E L N R T V E T V T A Q R T 200
601  CGCCTTAGTGCAGAACCGCGAGTACCTCAAGGAGGTGCACGAACCTCAAGTCTCGCTGGACCAAGCTCAACACCTCAAGAGCCAGCTCGCCACCCAGCTTGAGGACACCCGCGCCGCGC 720
201  R L S A E N A E Y L K E V H E L K V S L D N V N H L K S Q L A T Q L E D T R R R 240
721  CTTGAAGATGAGGAGAGAAACCGCCACGCTGGAATCTTCGATGCACACTCTTGAGGTTGAGATCGAGTCTCTCAAGGTTACGCTGGAAGAAGAATCCGAGGCTAGGCTTGAAGTCGAG 840
241  L E D E E R K R A S L E S S M H T L E V E I E S L K V Q L E E E S E A R L E V E 280
841  AGGCAGTAGTCAAAGCCACGCTGATCCGCGCTTACAAGACCAAGTATGAGACTGAAGTCCAGGCCATGCTGACGAAGTTGAGGAACCTAGGCGCAAGATGGCTCAGAAGATTTCCG 960
281  R Q L V K A N A D A A A Y K T K Y E T E V Q A H A D E V E E L R R K M A Q K I S 320
961  GAGTACGAAGAGCAGCTCGAGCCCTGCTGACCGCTGCAGCAACTGGAGAAGCAGAAGTCCGCACTCAGAGCGAAGTCGAGGTGCTCATTATGAGACTGGAGAAGGCTACTGCGCAT 1080
321  E Y E E Q L E A L L T R C S N L E K Q K S R L Q S E V E V L I M D L E K A T A H 360
1081 GCGCAGAACCTGGAGAAGCGTGTGCTCAGCTCAGAGCTCAACATCGACCTCAAGTCCAAGTGGAAAGGCTCACCATCCTGCTGGAGCAGAGCCAGCGTGAAGTGCAGAGGTTG 1200
361  A Q N L E K R V A Q L E K L N I D L K S K V E E L T I L L E Q S Q R E L R Q K V 400
1201 GCGCAAAATCCAGAAGCTGCAGCAGAGTACGAGAAGATGCGCGAACAGCGAGAGCCCTTACGCGAGAGAACAAAGCTCGTGCAGACCTGCTCCGAGCTTCCGAGGACACCCGCGCCGAC 1320
401  A E I Q K L Q H E Y E K M R E Q R D A L Q R E N K K L V D D L S E A K S Q L A D 440
1321 GCCATCCCGGCTGCACGAGTACGAGCTGGAGATCAAGCGGCTGGAGAAGCAGCGTGCAGCTGGCTGCCCTACAAGGAGGCGAGACACTGCGCAAGCAGGAGGAAGCCAAAGTGC 1440
441  A I R R L H E Y E L E I K R L E N E R D E L A A A Y K E A E T L R K Q E E A K C 480
1441 CAGAGGCTCACCAGGCTCGCTCAGTGCAGCAGTACGAGCGCCCTCCAGATCAAGGAAGAGGAGATCGAAGCCCTGCGCAAGCAATACCAGTGGAAAGTGGAGCAGTCAAC 1560
481  Q R L T A E L A Q V R H E Y E R R L Q I K E E E I E A L R K Q Y Q L E V E Q L N 520
1561 ATGCGCCTTGTGAGGCGAGGCAAGCTCAAGACGGAGTGTGCTCGCATCAAGAAGAAGTACCGGCCAGATCACGGAGCTGGAGATGTCTTGTGACGCTGCCAACAGCAGAACATG 1680
521  M R L A E A E A K L K T E I A R I K K K Y Q A Q I T E L E M S L D A A N K Q N M 560
1681 GACCTCCAGAAGATCATCAAGAAGCAGGCCATCCAAATCACCAGCTGCAGGCCACTACGACGAGGTTACCAGCCAACTGCAGCAGTGCAGGACAGCTGGCCATTTCCAGCGCCG 1800
561  D L Q K I I K K Q A I Q I T E L Q A H Y D E V H R Q L Q Q C A D Q L A I S Q R R 600
1801 TGCCAGGACTGCAGGCCAAGTGGACGAACAGCGTGTGGCTCTCGAATCCGCTTCCGCTTCAAGCGGGCGCAGAGCAGTCCCTGGAGGATCGCAGGCACGCGTGAACGAAGTGAAC 1920
601  C Q G L Q A E L D E Q R V A L E S A L R S K R A A E Q S L E E S Q A R V N E L T 640
1921 ACCATCAACGTGAACATTGCTGCAGCCAAGAACAAGTGGAGAGCGAGCTCTCCGCGTGCAGGCTGACTACGACGAGCTGCACAAGGAGCTCCGGGTGGTTGACGAAGCTTGCAGCGC 2040
641  T I N V N I A A A K N K L E S E L S A L Q A D Y D E L H K E L R V V D E R C Q R 680
2041 ACGATTGTTGAGCTTAAGAGCACCAAGGACATCCTGGTGAAGAAGCAGGAGCGCTACATCAAGTGCAGTCTATCAAGAAATCCCTCGAGGTCGAAGTCCGCAACCTTCAAGTGCAGCTG 2160
681  T I V E L K S T K D I L V E E Q E R Y I K V E S I K K S L E V E V R N L Q V R L 720
2061 GAGGAAGTGAAGCAATGCTTTGGCTGGAGGCAAGCGTGTATCGCGAAGCTGGAGGCTTAGGATCCCGATGTTGAGATCGAGTTGGAAGAAGAGAAGGCGCCACGCTGAGACGAG 2280
721  E E V E A N A L A G G K R V I A K L E A R I R D V E I E L E E E K K R H A E T Q 760
2281 AAGATTCTGCGCAAGAAAGACCACCGCGCAAGGAGCTGCTGCTCCAGACTGAAGAGGACCACAAGACCATCACCATGCTCAACGACGCGCTCGAGAAGCTCAACGAGAAGTCAAGGTC 2400
761  K I L R K K D H R A K E L L L Q T E E D H K T I T M L N D A V E K L N E K V K V 800
2401 TACAAGCGACAGCTCAACGAACAGGAGGGTCTGAGCCAGCAGAACCTGACCCGCTGCGCCGCTTCCAACGCGAACTGGAGGCGGCCGAAGACCGCGGACTCCGCGGAGAGCAACCTG 2520
801  Y K R Q L N E Q E G L S Q Q N L T R V R R F Q R E L E A A E D R A D S A E S N L 840
2521 TCCCTGATTCCGCGCAAGCACCGCTCCTGGGTGACCACCAGCAAGTTCGCCGTGGCACCAGGCGAGTCTTCTGTCACCGAGGAGTCCAGCCAGAACTTC 2619
841  S L I R A K H R S W V T T S Q V P G G T R Q V F V T E E S S Q N F 873

```

**Figura 1. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos predita do cDNA codificador da paramiosina de *Rhipicephalus microplus*.** As sequências codificadoras das regiões N-terminal (sublinhada), interna e C-terminal (destacada em cinza) da paramiosina foram escolhidas para a clonagem e expressão em *E. coli*. As sequências de DNA utilizadas na síntese dos oligonucleotídeos iniciadores diretos e reversos estão indicadas em azul e vermelho, respectivamente.



### 3.2.2 Expressão em *E. coli* e purificação das proteínas recombinantes

Todas as construções foram inseridas por eletroporação na linhagem BL21 Star de *E. coli*. Uma colônia de *E. coli* transformada com cada construção foi cultivada em 15 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) com 50 µg/mL de ampicilina durante a noite a 37 °C com agitação de 180 rpm. Os cultivos foram inoculados em 3 L de meio LB contendo ampicilina 50 µg/mL e IPTG 1 mM e, após, incubados a 37 °C por 4 h em um agitador a 180 rpm. As células foram centrifugadas a 5000 × *g* por 5 min a 4 °C e o precipitado foi ressuspenso em 100 mL de tampão de ligação (PBS com adição de 20 mM de imidazol, pH 7,4). As células foram rompidas em uma prensa de French e a cultura foi centrifugada a 18000 × *g* por 20 min a 4 °C. Após a centrifugação dos extratos, o sobrenadante foi filtrado usando uma membrana de 0,45 µm e estocado a -20°C. A Int-PRM também foi detectada na fração insolúvel e, portanto, foi solubilizada em 50 mL do tampão para solubilização de corpos de inclusão (ureia 8 M, tris-HCl 10 mM, ditiotreitól 1 mM, pH 8,0) por 1 h sob agitação a temperatura ambiente. Após solubilizado, o extrato foi filtrado como já descrito (243).

As três proteínas recombinantes (rN-PRM, rInt-PRM e rC-PRM) foram purificadas por cromatografia de afinidade usando a coluna HisTrap (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante. Os tampões de ligação e eluição usados na purificação de Int-PRM a partir da porção insolúvel foram preparados com a adição de ureia 8 M. O grau de pureza das proteínas recombinantes purificadas foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com azul de Coomassie (Sigma-Aldrich). Além disso, foi realizado um western-blot usando o anticorpo anti-polihistidina conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) e anti-RmPRM para confirmar a presença e identidade da proteína. As proteínas recombinantes foram quantificadas por espectrometria a A280 nm.

### 3.2.3 Clonagem da sequência de DNA codificante para a RmPRM e expressão em *P. pastoris*

A sequência de DNA codificante para a RmPRM foi amplificada por PCR usando os oligonucleotídeos iniciadores direto 5'-*atcgatatgtctagcaggagcagcaag*-3' e reverso 5'-*gcggccgctcaATGATGATGATGATGATGgaagttctgctggactcctcg*-3', onde: os sítios para as enzimas de restrição *Cla*I e *Not*I estão destacados em itálico; no oligonucleotídeo iniciador reverso, a sequência codificante para seis histidinas está em letras maiúsculas e o códon de

término, sublinhado. O produto de PCR foi clonado no vetor pGEM-T Easy, usando o kit “pGEM-T Easy Vector System I” (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. A construção foi inserida em *E. coli* linhagem TOP10 por eletroporação. A sequência de DNA codificante para a RmPRM foi clivada, usando as enzimas de restrição *ClaI* e *NotI*, e inserida no vetor pPICZ $\alpha$ C (Invitrogen), clivado previamente com as mesmas enzimas, usando “T4 Ligase” (Fermentas). A reação foi realizada a 16 °C durante 18 h e a construção foi novamente inserida em *E. coli*. O plasmídeo contendo o inserto foi linearizado com a enzima de restrição *PmeI* e transferido, por eletroporação, para as linhagens X33 e GS115 de *P. pastoris*. A preparação de células competentes e a transformação foi realizada de acordo com o protocolo condensado de Lin-Cereghino et al. (244). As culturas foram semeadas em placas de Petri contendo YPDS com 25  $\mu$ g/mL de zeocina e as colônias de levedura foram visualizadas após três dias na estufa a 28°C.

A fim de induzir a expressão da RmPRM, uma colônia de cada linhagem de *P. pastoris* foi inoculada em meio de cultura BMGY durante a noite a 29°C com agitação de 200 rpm. As células foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura BMMY, o qual foi colocado em um novo erlenmeyer contendo 10 mL de BMMY até atingir DO<sub>600</sub> igual a 1. Os cultivos de BMMY foram crescidos durante a noite a 29 °C com agitação de 200 rpm e 1 mL era retirado do cultivo e centrifugado a 5000 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante era transferido para um microtubo com 0,525 g de sulfato de amônio e colocado sob agitação durante a noite. O microtubo era centrifugado a 12000 rpm por 1 h a 4 °C. O sobrenadante era descartado e o precipitado ressuspensado em 40  $\mu$ L de PBS 1x. O procedimento acima foi realizado durante cinco dias seguidos e, a cada dia, era adicionado 0,5 % de metanol ao cultivo. A expressão em *P. pastoris* foi realizada de acordo com o manual “pPICZ $\alpha$  A, B, and C - *Pichia pastoris* vectors for selection on Zeocin and purification of secreted, recombinant proteins” disponibilizado pela empresa Invitrogen.

Após o processo de expressão da RmPRM em *P. pastoris*, as células foram rompidas por congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. O tampão de proteína 5x foi adicionado às amostras, as quais foram fervidas e, logo após, submetidas ao SDS-PAGE e western-blot, a fim de analisar a expressão da RmPRM.

### 3.2.4 SDS-PAGE e western-blot

As proteínas recombinantes purificadas foram ressuspensas em tampão de amostra 5x e separadas por SDS-PAGE em tampão Tris-Glicina. As proteínas foram coradas com azul de Coomassie ou transferidas para uma membrana de nitrocelulose por 1 h a 70 V (245). A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com blotto 5% (PBS com 5 % de leite em pó desnatado com adição de 0,05 % de Tween 20) por 2 h e, depois, incubada durante a noite a 4 °C com o anticorpo anti-poli-histidina ou anti-RmPRM diluído em blotto 1:4.000 e 1:1.000, respectivamente. O soro anti-RmPRM foi adsorvido por 1 h a temperatura ambiente com extrato total de células de *E. coli* BL21, as quais foram preparadas de acordo com Rott et al. (246). Após a incubação com o anticorpo anti-poli-histidina, a membrana foi lavada 5 vezes com PBS 1x adicionado de 0,05% de tween 20 e incubada com o tampão de revelação para fosfatase alcalina, NBT e BCIP. Já após a retirada do anti-RmPRM, a membrana foi submetida a 5 lavagens de 10 minutos cada com blotto 5% e incubada por 1 h com o anticorpo anti-IgG bovino conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído 1:10.000 em blotto 5%. Após 5 lavagens com PBS 1x/tween 20 0,05%, a revelação foi realizada como descrito acima.

### 3.2.5 RNA interferência

Os oligonucleotídeos iniciadores direto 5'-ggatcctaatacgactcactatagggaggctaagagccaactgg-3' e reverso 5'-ggatcctaatacgactcactataggttaagctcaacaatcgtgcg-3' foram sintetizados para amplificar uma sequência de 761 pb codificante para a RmPRM. Os oligonucleotídeos iniciadores, contendo a sequência do promotor T7 (sublinhado) na região 5', foram desenhados usando o website do IDT (<https://www.idtdna.com>). A reação de PCR foi realizada com “Elongase Enzyme Mix” (Invitrogen), 0,6 pmol de oligonucleotídeos iniciadores e 100 ng de cDNA. O produto de PCR foi purificado com “GeneClean II kit” (MP Biomedicals) e usado como molde para a síntese de dsRNA, a qual foi realizada com o “Ribomax Express T7 kit” (Promega). O dsRNA correspondente ao gene MSP-1 de *Plasmodium falciparum* (dsMSP-1), usado como controle negativo, foi sintetizado seguindo o mesmo protocolo descrito para a síntese de dsRmPRM, usando os oligonucleotídeos iniciadores direto 5'-taatacgactcactataggtgatgcaagcgattcagat-3' e reverso 5'-taatacgactcactataggtgtattccagaattggcc-3' fornecidos pelo Dr. Gerhard Wunderlich (Departamento de

Parasitologia – Universidade de São Paulo, SP-Brasil). A quantificação dos dsRNAs foi realizada espectrometricamente usando A260 nm e diluídos em água Mili-Q para 8 µg/µl. A síntese do RNA dupla-fita (dsRNA), assim como a metodologia usada no experimento de RNA interferência, estão de acordo com Pohl et al. (247).

Um total de 28 fêmeas parcialmente ingurgitadas com tamanhos entre 20 e 45 mg foram coletadas de um bovino infestado com *R. microplus*. Todos os carrapatos foram alimentados artificialmente com sangue bovino usando capilares de vidro, de acordo com Fabres et al. (248). Após 1 h sob temperatura e umidade controladas, as fêmeas foram distribuídas em dois grupos de 14 carrapatos e injetadas com 1 µl (8 µg) de dsRNA correspondente a *rmprm* ou *mssl* (gene não-relacionado usado como controle negativo) com uma seringa Hamilton. Os carrapatos foram novamente alimentados e, 24 h após o tratamento, três carrapatos de cada grupo foram dissecados para a remoção dos ovários, os quais foram estocados em TRIzol a -70 °C até o uso. As demais fêmeas foram novamente pesadas, fixadas com a região dorsal para baixo em placas de Petri e colocadas para postura em uma estufa a 28°C com umidade relativa de 85%. Após uma semana, os ovos foram pesados, colocados em microtubos e incubados nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Após o período de eclosão, a massa das larvas foi mensurada.

Os ovários das fêmeas parcialmente ingurgitadas, isolados após o tratamento com dsRNA, foram processados individualmente. Os RNAs foram extraídos com TRIzol (Invitrogen) e tratados com DNase I (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A presença de DNA cromossomal contaminante nas amostras de RNA, após o tratamento com DNase I, foi analisada por PCR e visualizada em gel de agarose. A síntese do cDNA foi realizada com a transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante.

O silenciamento gênico foi confirmado por qRT-PCR usando os oligonucleotídeos iniciadores 5'-ccagcgcacgattgttga-3' e 5'-cacttgaaggttgccgacttc-3' (desenhados com o software PrimerExpress 3.0 – Applied Biosystems, Foster City, USA) sendo a quantificação relativa normalizada pela expressão do gene 40S ribossomal, usando os oligonucleotídeos iniciadores 5'-ggacgaccgatggctacct-3' e 5'-tgagttgattggcgcacttct-3' (249). As reações de qRT-PCR foram realizadas em duplicatas, com o termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen), usando Go-Taq qPCR Master Mix (Promega), 300 ng de cDNA e 10 pmol de oligonucleotídeos iniciadores. Os dados obtidos foram analisados pelo “Relative Expression Software Tool” (REST) (250).

### 3.2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por teste t de Student não pareado usando GraphPad Prism versão 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA). Valores com significância de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente diferentes.

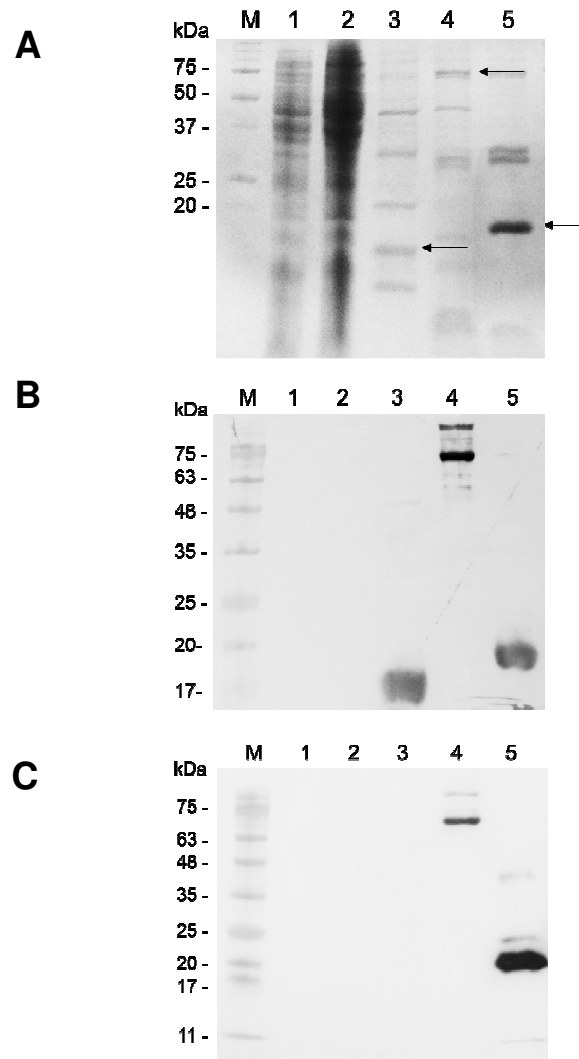
### 3.2.7 Aspéctos éticos

Os procedimentos realizados nesse trabalho envolvendo animais estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA/UFRGS) sob o protocolo nº 27559.

## 3.3. RESULTADOS

### 3.3.1 Clonagem das sequências de DNA codificantes para as regiões N-terminal, interna e C-terminal da RmPRM e purificação das proteínas recombinantes

A correta inserção das sequências codificantes para as três regiões da RmPRM nos vetores de expressão foi confirmada por sequenciamento do DNA plasmidial. As proteínas rN-PRM, rInt-PRM e rC-PRM purificadas por cromatografia de afinidade foram detectadas em SDS-PAGE 12% e western-blot (Fig. 2A, B e C). Todas as proteínas foram reconhecidas pelo soro anti-RmPRM (2B), enquanto que somente a rN-PRM não foi reconhecida pelo anticorpo anti-polihistidina (2C). Os extratos de *E. coli* expressando somente o plasmídeo pET 23a ou pET 101 não foram reconhecidos por ambos os soros (Fig. 2B e C). As massas moleculares esperadas para rN-PRM, rInt-PRM e rC-PRM eram de 15,6, 72,3 e 16,6 kDa, respectivamente, porém a migração em gel de poliacrilamida da rN-PRM e rC-PRM indicam tamanhos em torno de 17 e 20 kDa.

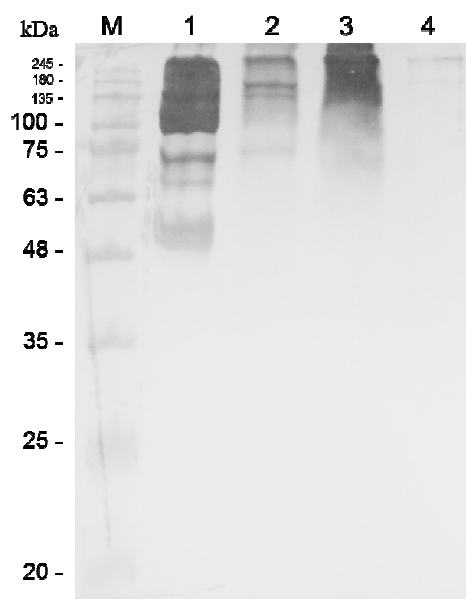


**Figura 2.** SDS-PAGE (A) e western-blot (B e C) das regiões N-terminal (rN-PRM), interna (rInt-PRM) e C-terminal (rC-PRM) recombinantes da RmPRM parcialmente purificadas por cromatografia de afinidade. M: Marcador de massa molecular; 1: Vetor pET 23a expresso em *E. coli* BL21; 2: Vetor pET 101 expresso em *E. coli* BL21; 3: rN-PRM; 4: rInt-PRM; 5: rC-PRM. A: O SDS-PAGE foi realizado usando gel de poliacrilamida 12% e corado com azul de Coomassie. B: O western-blot foi realizado usando soro bovino anti-RmPRM (diluído 1:1.000 em blotto), como anticorpo primário, e anti-IgG bovino conjugado com fosfatase alcalina (Fermentas) diluído 1:10.000 em blotto 5%, como anticorpo secundário. C: Western-blot realizado com anticorpo monoclonal anti-poli-histidina conjugado com fosfatase alcalina (diluuição 1:4.000 em blotto 5%). As flechas indicam as regiões da RmPRM com as massas moleculares esperadas para 15,6, 72,3 e 16,6 kDa, respectivamente.

### 3.3.2 Expressão da RmPRM em *P. pastoris*

A baixa expressão em *E. coli*, além da dificuldade de purificação da RmPRM previamente descrita (161), levaram a testar métodos alternativos de expressão da RmPRM. A produção de proteínas recombinantes expressas em *P. pastoris* tem mostrado algumas vantagens em relação a *E. coli*, como a secreção da proteína recombinante (facilitando a purificação da proteína). A clonagem em pPICZ $\alpha$ C foi confirmada por sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos iniciadores AOX 1, enquanto que a incorporação do inserto na levedura foi confirmada por PCR (dado não mostrado).

A expressão da RmPRM em duas linhagens de *P. pastoris* (X33 e GS115) foi confirmada por western-blot usando o soro anti-RmPRM (Fig. 3). O extrato de *P. pastoris* foi usado como controle negativo, enquanto o extrato de *E. coli* expressando a RmPRM foi usado como controle positivo.



**Figura 3. Western-blot da expressão da paramiosina de *R. microplus* (RmPRM) em *P. pastoris*.** M: Marcador de massa molecular; 1: RmPRM expressa em *E. coli* BL21; 2: RmPRM expressa na linhagem GS115 de *P. pastoris*; 3: RmPRM expressa na linhagem X33 de *P. pastoris*; 4: Extrato de *P. pastoris*. O western-blot foi realizado usando soro bovino anti-RmPRM diluído 1:1.000 em blotto.

### 3.3.3 Silenciamento da RmPRM

O experimento de RNAi foi realizado a fim de avaliar os efeitos do silenciamento da RmPRM na mortalidade e na massa das fêmeas tratadas, assim como na postura de ovos e eclosão das larvas. Assim, carrapatos fêmeas parcialmente ingurgitadas, 24 h após o tratamento com dsRmGRP ou dsMSP-1 (controle negativo), foram dissecadas e foi realizada a extração de RNA dos ovários para avaliar o nível de silenciamento gênico por qRT-PCR. Os demais carrapatos foram colocados para oviposição. A injeção com dsRmPRM diminuiu em 79,4% a postura dos ovos e em 95,1% a eclosão das larvas comparado ao controle. A taxa de eclosão no grupo tratado com dsRmPRM foi de 13%, enquanto que no grupo controle foi de 55%, já a massa das fêmeas não foi estatisticamente diferente entre os dois grupos 24 h após o tratamento (Tabela 1). Os níveis de RNAm correspondentes à RmPRM foram reduzidos nos três carrapatos tratados com dsRmPRM (82,9%, 96,1% e 99,8%) comparado com o grupo injetado com dsMSP-1 (Figura 4). Não foi observada mortalidade de carrapatos após o tratamento.



**Tabela 1. Efeitos do silenciamento gênico a partir do tratamento de fêmeas parcialmente ingurgitadas com dsRmPRM**

dsRNA	Ganho de massa (mg) <sup>a</sup>	Ganho de massa (%) <sup>b</sup>	Massa dos ovos (mg)	Redução da massa dos ovos (%) <sup>c</sup>	Massa das larvas (mg)	Redução da massa das larvas (%) <sup>d</sup>	Taxa de eclosão (%) <sup>e</sup>
RmPRM	46,1±18,2	175,3±71,6	5±8,1**	79,4	0,7±1,1**	95,1	13,3
MSP-1*	45,1±31,6	171,6±116,8	24,3±20,6	-	13,4±6,8	-	55,8

\* Proteína da superfície do merozoíto-1 de *Plasmodium falciparum* (controle negativo).

\*\*Estatisticamente significativo (a análise estatística foi realizada por teste t não-pareado (P<0.05)).

Ganho de massa (mg), ganho de massa (%), massa dos ovos (mg) e massa das larvas (mg) estão apresentados como média ± desvio padrão.

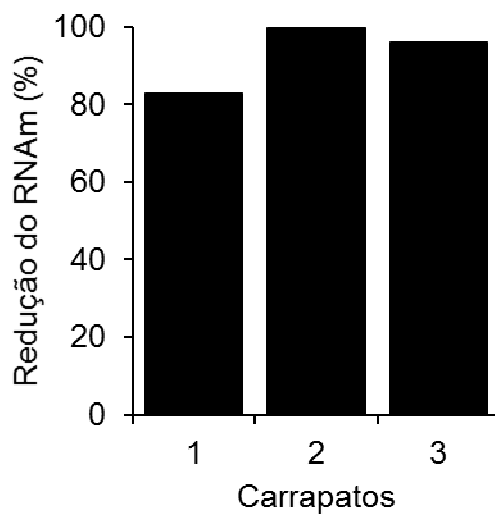
a = massa final - massa inicial

b = ganho de massa (mg)\*100/ massa inicial

c = (100-(massa dos ovos dos carrapatos tratados com dsPRM\*100/média da massa dos ovos do grupo tratado com dsMSP-1))

d = (100-(massa das larvas de carrapatos tratados com dsPRM\*100/média da massa das larvas do grupo tratado com dsMSP-1))

e = (massa de larvas média/ massa de ovos média)\*100



**Figura 4. Silenciamento do *rmprm* no ovário de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* 24 h após o tratamento com dsRmPRM ou dsMSP1 (controle).** A supressão do RNAm relativo a RmPRM em cada carrapato tratado (1, 2 e 3) foi analisada por qRT-PCR, usando o método Ct comparativo e o software REST. A expressão gênica foi normalizada usando o RNA ribossômico 40S.

## **Capítulo 4**

### **Considerações finais**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O *R. microplus* é o principal carrapato de importância econômica, comprometendo a criação de gado em diversos países (4). O desenvolvimento de uma vacina anti-carrapato de amplo espectro parece ser a melhor alternativa ao uso de acaricidas, porém ainda não foi possível encontrar um antígeno ou um coquetel de antígenos suficientemente protetor contra uma ampla gama de espécies de carrapatos (64, 88). Moléculas salivares são essenciais para a fixação, alimentação do carrapato no hospedeiro e na transmissão de patógenos, o que as torna potenciais antígenos a serem estudados contra carrapatos e patógenos transmitidos por eles (126). Entre as proteínas salivares identificadas em carrapatos, uma PRG e a PRM de *R. microplus* foram caracterizadas nesse estudo. As PRGs foram inicialmente detectadas no cone de cimento, estrutura importante na fixação do carrapato no hospedeiro, formada por proteínas da saliva (251). As PRGs parecem modular o sistema imune de hospedeiros expondo regiões de alta variabilidade com repetidas glicinas a ele (160) e, ao mesmo tempo, por conterem motivos repetidos ricos em glicinas semelhantes ao colágeno de vertebrados (75). A PRM constitui-se em antígeno vacinal extensivamente avaliado em helmintos (209, 217) e alérgeno em ácaros (104, 221). Além da sua função na musculatura, a PRM pode ser associada à inibição do sistema complemento (196) e ligação à porção Fc de imunoglobulinas (161, 203). Essas, entre outras características, indicaram a importância de ambas as proteínas no parasitismo e a necessidade de mais estudos para identificar o potencial protetor da PRM e PRGs como antígenos vacinais.

A identidade da proteína rica em glicinas de *R. microplus* (RmPRG) foi confirmada pela alta similaridade com PRGs de outras espécies de carrapatos (Figura 2 do artigo). A sequência de aminoácidos da RmPRG revelou duas regiões distintas: a região N-terminal, composta por glicinas isoladas ao longo da sequência, e a região C-terminal, formada por repetições contendo glicinas precedidas ou não por prolina. Tendo em vista essas duas regiões com características distintas, futuramente, a clonagem e expressão dessas regiões separadamente e produção das proteínas recombinantes seria importante para identificar se existe uma porção mais imunogênica e se apresenta a mesma característica observada na 64P, de *R. appendiculatus*, em que a região C-terminal (rica em glicinas) é imunogênica, porém não protetora (160). Caso seja semelhante à 64P, pode se especular que a região C-terminal da RmPRG, com as repetições ricas em glicinas, seja a região exposta ao hospedeiro e, portanto, mais imunogênica, enquanto a porção N-terminal fique menos exposta ao hospedeiro.

A partir dos ensaios de reconhecimento com soros de animais infestados, a RmPRG mostrou-se altamente antigênica, sendo reconhecida por todos os bovinos *B. indicus* naturalmente infestados com o *R. microplus*, mas também por soros de bovinos *B. taurus* submetidos a 12 infestações sucessivas (seis infestações pesadas seguido por seis infestações leves). O grau de reconhecimento da RmPRG foi bastante discrepante tanto entre os bovinos como entre as infestações. Essa heterogeneidade no reconhecimento já foi descrita anteriormente (38, 162), podendo ser explicada pela diferença genética entre indivíduos da mesma raça, idade, além de outros componentes do sistema imune que modulem a resposta imune do bovino durante infestações sucessivas, não necessariamente relacionados ao grau de infestação. O reconhecimento da RmPRG por soros de bovinos naturalmente e experimentalmente infestados confirma que a RmPRG é um antígeno exposto ao hospedeiro, sendo provavelmente secretada pela saliva. Antígenos expostos são naturalmente reconhecidos por anticorpos de seus hospedeiros, portanto, sucessivas infestações com o carrapato geram resistência, que, entretanto, é parcial, visto que alguns indivíduos sempre conseguem completar o ciclo parasitário. A modulação/evasão do sistema imune por moléculas salivares pode auxiliar a explicar não somente esta sobrevivência de alguns parasitos em hospedeiro resistentes, como também o maior reconhecimento de proteínas do *R. microplus* por soros de bovinos após a primeira infestação, com queda gradual até a estabilidade do reconhecimento, ou o constante reconhecimento ao longo das infestações, como os mostrados para a RmPRG.

A análise do reconhecimento da RmPRG por soros de coelhos imunizados com ovos, saliva e glândulas salivares de fêmeas de *R. microplus* estão de acordo com o RT-PCR que identificou o *rmprg* em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento do carrapato. Algumas PRGs já foram encontradas no intestino de carrapatos (98, 187), porém, os dados indicaram que a RmPRG, assim como o *rmgrp*, não estão presentes no intestino de *R. microplus*. Além disso, a maior expressão do *rmgrp* nas glândulas salivares de fêmeas totalmente ingurgitadas do que em parcialmente ingurgitadas também pode ser relacionada ao ensaio de reconhecimento da RmPRG por soros de coelhos imunizados, uma vez que a RmPRG foi reconhecida pelo soro de coelho imunizado com glândulas salivares de fêmeas totalmente ingurgitadas e o seu reconhecimento foi visualmente mais intenso pelo soro anti-saliva de fêmeas totalmente ingurgitadas do que parcialmente ingurgitadas. Essa alta expressão da *rmprg* em glândulas salivares de fêmeas totalmente ingurgitadas (fêmeas coletadas após o desprendimento do hospedeiro) é bastante interessante, visto que a principal função conhecida das PRGs em carrapatos está relacionada ao cone de cimento, produzido no momento de

fixação o carrapato. Outros trabalhos já indicaram a presença de PRGs na saliva e glândulas salivares de fêmeas totalmente ingurgitadas (175, 176), porém o seu papel nesse período do ciclo de vida do carrapato ainda não foi esclarecido. A *rmprg* também foi detectada nos corpos gordurosos e ovários de fêmeas parcialmente e totalmente ingurgitadas, em larvas e em machos adultos. Os dados de qRT-PCR e reconhecimento da RmPRG por soros de coelhos imunizados indicam uma provável importância dessa proteína no período de rápido ingurgitamento de fêmeas ou ainda na embriogênese.

O silenciamento do gene correspondente à RmPRG em fêmeas parcialmente ingurgitadas reduziu em 91% a massa de larvas eclodidas em relação ao grupo controle. Porém, nenhum efeito foi verificado no ganho de massa das fêmeas e na postura de ovos após o tratamento com o dsRmPRG, incluindo o período de ingurgitamento por alimentação artificial. Ainda, a *rmprg* foi altamente expressa em larvas de 1 dia, o que sugere (juntamente com o RNAi) um possível papel da RmPRG no desenvolvimento larval.

A clonagem do cDNA codificador da PRM de *R. microplus* em *E. coli* foi previamente realizada por Ferreira et al. (161), produzindo uma proteína recombinante de 102 kDa. Entretanto, a utilização de apenas um fragmento da proteína, que contenha epítomos protetores, pode apresentar maior eficácia em ensaios de vacinação do que a proteína inteira. Assim como a PRM de alguns helmintos e ácaros (229, 231, 239), a RmPRM deve apresentar graus divergentes de imunogenicidade e proteção entre diferentes fragmentos da proteína. Dessa forma, três regiões da RmPRM, N-terminal (N-PRM), interna (Int-PRM) e C-terminal (C-PRM), foram clonadas separadamente. As sequências de DNA codificantes para PRM-I e PRM-C foram clonadas no vetor pET 101/D-TOPO utilizando o sistema de recombinação, porém, com a dificuldade de expressão da PRM-N com o mesmo sistema, a sequência correspondente a essa região foi expressa no vetor pET 23a. Os protocolos de expressão e purificação foram realizados nas mesmas condições para todas as regiões, exceto para a Int-PRM que foi purificada em duas fases, a porção solúvel separada da porção de baixa solubilidade. As três proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade usando a coluna HisTrap (GE Healthcare), que contém resina de níquel. Tendo em vista a purificação parcial obtida, serão necessários novos protocolos de purificação adicionais. Além disso, as diferentes bandas visualizadas no SDS-PAGE podem indicar que a proteína recombinante está formando agregados resistentes à SDS-ureia e/ou está sendo clivada por ação de proteases. Posteriormente, as três regiões da PRM recombinantes deverão ser utilizadas em ensaios de reconhecimento por bovinos experimentalmente e naturalmente infestados com o *R. microplus*, mas também por soros de bovinos e coelhos imunizados com

diferentes extratos de tecidos de fêmeas, além de extratos de ovos e larvas do carrapato. Adicionalmente, ensaios de atividade, como ligação ao colágeno, inibição da via clássica do sistema complemento e agregação plaquetária, serão realizados com as três regiões da PRM recombinantes. A identificação da região de maior antigenicidade e função imunomoduladora será importante para direcionar um possível ensaio de alimentação artificial com anticorpos e/ou vacinação contra o *R. microplus*.

Devido à dificuldade de purificação da RmPRM inteira fusionada à GST (161) ou com a adição de uma cauda de seis histidinas (dado não publicado) com expressão em *E. coli*, a RmPRM foi então expressa em duas linhagens da levedura *P. pastoris* (X-33 e GS115). As duas linhagens são designadas Mut<sup>+</sup>, ou seja, apresentam crescimento rápido após a indução com metanol. A GS115 apresenta uma mutação no gene HIS4 (HIS4<sup>-</sup>) e requer que o vetor utilizado contenha esse gene, como os vetores pPIC (usado nesse trabalho) (252). A expressão proteica em *P. pastoris* pode apresentar diversas vantagens como: extensas modificações pós-traducionais, a incorporação da sequência alvo ao genoma, a secreção da proteína heteróloga para o meio extracelular, o que simplifica a purificação proteica, uma vez que a *P. pastoris* secreta uma quantidade pequena de proteínas nativas, além de ser livre de endotoxinas (253). A RmPRM expressa em levedura só foi detectada na porção insolúvel do cultivo e, portanto, a proteína recombinante não foi secretada no meio extracelular, necessitando de maior purificação, assim como a proteína expressa em *E. coli*. A produção da proteína recombinante a partir da expressão em levedura seria importante para comparar o grau de reconhecimento das proteínas expressas em *E. coli* e *P. pastoris* por soros de animais infestados com o carrapato e em ensaios de atividade, uma vez que a baixa taxa de modificações pós-traducionais em *E. coli* poderia ocultar alguma atividade relacionada à proteína nativa.

O silenciamento gênico correspondente à RmPRM apresentou uma redução na massa de ovos de 79% e na massa de larvas de 95%, mas não mostrou diferença no ganho de massa de fêmeas alimentadas. A PRM é uma proteína muscular, portanto ela deve ser essencial no desenvolvimento da musculatura do carrapato. Dessa forma, a redução na taxa de eclosão de larvas após o silenciamento gênico é condizente com a importância presumida da PRM no desenvolvimento da musculatura da larva. O silenciamento da PRM também já foi avaliado após o tratamento de larvas de *T. spiralis* com siRNA corresponde à uma porção da proteína. Como resultado, houve redução na muda de larvas tratadas, além de danos superficiais e menor mobilidade, sugerindo seu papel na regulação da muda durante o desenvolvimento larval (218). Ainda que as fases de desenvolvimento silenciadas sejam diferentes nos dois experimentos, o silenciamento da PRM em helmintos e carrapatos gerou algum efeito

deletério na larva, porém em períodos distintos do seu desenvolvimento. Entretanto, Zawadzki et al. (254) analisaram o silenciamento da PRM em ovos e larvas de *Haemonchus contortus* por eletroporação e nenhum efeito foi verificado. Previamente, foi indicado que o *rmprm* foi encontrado em ovos, larvas, machos adultos e em todos os tecidos de fêmeas de *R. microplus* (162). A expressão gênica foi medida nos ovos de 1, 3, 6, 12 e 18 dias, indicando sua presença somente no ovo de 18 dias, além de da expressão em larvas de 5 e 10 dias, mas não nas larvas de 15 dias. Esses dados sugerem que possivelmente haja necessidade de maiores quantidades de PRM no momento da eclosão da larva e no seu desenvolvimento. A *rmprm* também foi detectada no ovário, podendo estar relacionada à musculatura da parede do tecido, a qual poderia ser importante durante a oviposição. Deve ser enfatizado ainda que os maiores níveis de expressão gênica foram detectados no corpo gorduroso, tecido sem musculatura aparente, o que indica que a redução na postura de ovos e na eclosão de larvas podem também estar ligadas a uma função não muscular da proteína.

O RNAi foi realizado usando o mesmo protocolo para o silenciamento de RmPRG e RmPRM. Somente a redução do RNAm correspondente à RmPRM em fêmeas tratadas com dsRNA mostrou diminuir a postura de ovos. Por outro lado, o silenciamento de ambos os genes reduziu a massa de larvas eclodidas, o que sugere a importância das duas proteínas no ciclo de vida do carrapato e o potencial de ambas como antígeno vacinal. A partir desses dados, o próximo passo seria avaliar os efeitos da alimentação artificial de carrapatos fêmeas com anticorpos anti-RmPRG e anti-RmPRM, o que, juntamente ao RNAi, poderia indicar uma ou ambas as proteínas para um ensaio de vacinação.

A partir dos resultados alcançados nesse estudo, em conjunto com dados previamente publicados (161, 162), podemos afirmar que a RmPRM/*rmprm* e a RmPRG/*rmprg* foram encontradas em diferentes tecidos de fêmeas adultas e fases do desenvolvimento do *R. microplus*, ambas as proteínas mostraram que podem ser importantes no desenvolvimento da larva do carrapato e, ainda, foram reconhecidas por soros de bovinos naturalmente e experimentalmente infestados. A RmPRM e a RmPRG já seriam consideradas essenciais no desenvolvimento do carrapato e parasitismo por suas funções previamente conhecidas (na musculatura e no cone de cimento, respectivamente), porém os dados obtidos indicam que ambas devem apresentar papéis adicionais no ciclo de vida desse parasito. Em conjunto com as características citadas, a possibilidade de evadir ou modular o sistema imune do hospedeiro já sugeridos para a RmPRM (161) e para a PRM de outros organismos (194, 200, 202), assim como para PRGs (75, 160), indica o potencial de ambas as proteínas como antígeno vacinal.



**REFERÊNCIAS**

1. NCBI taxonomy. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6941>. Último acesso em: 10 de outubro de 2013.
2. Murrell A, Campbell NJH, Barker SC. Phylogenetic Analyses of the Rhipicephaline Ticks Indicate That the Genus *Rhipicephalus* Is Paraphyletic. *Mol Phylogenet Evol.* 2000;16:1-7.
3. Murrell A, Barker SC. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari : Ixodidae). *Syst Parasitol.* 2003;1844:169-72.
4. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology.* 2004;129:S3.
5. Estrada-Peña A. Prediction of Habitat Suitability for Ticks. *Ann NY Acad Sci.* 2006;284:275-84.
6. Roberts AJA. Resistance of Cattle to the Tick *Boophilus microplus* (Canestrini). I. Development of Ticks on *Bos taurus*. *J Parasitol.* 2013;54:663-6.
7. Roberts AJA. Resistance of Cattle to the Tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. Stages of the Life Cycle of the Parasite against Which Resistance Is Manifest. *J. Parasitology.* 2013;54:667-73.
8. Gonzales JC. O controle do carrapato do boi. Porto Alegre: JCG;1993.
9. Farias NAR. Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. Guaíba: Agropecuária; 1995.
10. Guerrero DG, Nene VM, George JE, Barker SC, Willadsen P. Sequencing a new target genome: The *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) genome project. *J Med Entomol.* 2006;43:9-16.
11. Peter RJ, Bossche P Van Den, Penzhorn BL, Sharp B. Tick, fly, and mosquito control - Lessons from the past, solutions for the future. *Vet Parasitol.* 2005;132:205-15.
12. Willadsen P. Vaccination against ectoparasites. *Parasitology.* 2006;133:9-25.
13. Delgado C, Rosegrant M, Steinfeld H, Ehui S, Courbois C. "Livestock to 2020 – The Next Food Revolution". Food, Agriculture and the Environment Discussion Paper. 28. Washington, D.C. (USA): IFPRI;1999.
14. Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, León AAP, Pereira, JB, Villela, HS. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz J Vet Parasitol.* 2014;23:150-156.
15. Willadsen P. Anti-tick vaccines. *Parasitology.* 2004;129:367-387.

16. de la Fuente J, Almazán C, Lastra JMP, Kocan KM, Willadsen P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res.* 2007;8:23-28.
17. Mendes EC, Mendes MC, Sato ME. Diagnosis of amitraz resistance in Brazilian populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) with larval immersion test. *Exp Appl Acarol.* 2013;61:357-369.
18. Lovis L, Reggi J, Berggoetz M, Betschart B, Sager H. Determination of acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) field populations of Argentina, South Africa, and Australia with the Larval Tarsal Test. *J Med Entomol.* 2013;50:326-325.
19. Abbas RZ, Zaman MA, Colwell DD, Gilleard J, Iqbal Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Vet Parasitol.* 2014;203:6-20.
20. Ghosh S, Azhahianambi P, Yadav MP. Upcoming and future strategies of tick control: a review. *J Vect Borne Dis.* 2007;44:79-89.
21. Guerrero FD, Miller RJ, León AAP. Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *Int J Parasitol.* 2012;42:421-427.
22. de la Fuente J, Kocan KM. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Rev Vaccines.* 2003;2:583-593.
23. Lew-Tabor AE, Rodriguez Valle M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7:573-585.
24. de Castro JJ, Newson RM. Host Resistance in Cattle Tick Control. *Parasitol Today.* 1993;9:13-17.
25. Piper EK, Jonsson NN, Gondro C, Lew-Tabor AE, Moolhuijzen P, Vance ME, et al. Immunological Profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* Cattle Infested with the Cattle Tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16:1074-1086.
26. Tatchell RJ. Interactions between ticks and their hosts. *Int J Parasitol.* 1987;17:597-606.
27. Rechav Y, Clarke FC, Dauth J. Acquisition of immunity in cattle against the blue tick, *Boophilus decoloratus*. *Exp Appl Acarol.* 1991;11:51-56.
28. Wikel SK. Host immunity to ticks. *Annu Rev Entomol.* 1996;41:1-22.
29. Biegelmeier P, Nizolib LQ, da Silva SS, dos Santos TRB, Dionello NJL, Gulias-Gomes CC, Cardoso FF. Bovine genetic resistance effects on biological traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol.* 2015;208:231-237.

30. Kemp DH, Koudstaal D, Roberts JA, Kerr JD. *Boophilus microplus*: the effect of host resistance on larval attachments and growth. *Parasitology*. 1976;73:123–136.
31. Allen JR. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. *Exp Appl Acarol*. 1989;7:5–13.
32. Kemp DH, Bourne A. *Boophilus microplus*: the effect of histamine on the attachment of cattle-tick larvae—studies in vivo and in vitro. *Parasitology*. 1980;80:487–496.
33. Schleger AV, Lincoln DT, McKenna RV, Kemp DH, Roberts JA. *Boophilus microplus*: cellular responses to larval attachment and their relationship to host resistance. *Aust J Biol Sci*. 1976;29:499-512.
34. Schleger AV, Lincoln DT, Bourne AS. Arteriovenous anastomoses in the dermal vasculature of the skin of *Bos taurus* cattle, and their relationship with resistance to the tick, *Boophilus microplus*. *Aust J Biol Sci*. 1981;34:27–35.
35. Piper EK, Jackson LA, Bielefeldt-ohmann H, Gondro C, Lew-tabor AE, Jonsson NN. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. *Int J Parasitol*. 2010;40:431–41.
36. Brannan JL, Riggs PK, Olafson PU, Ivanov I, Holman PJ. Expression of bovine genes associated with local and systemic immune response to infestation with the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014;5:676-688.
37. Kashino SS, Resende J, Sacco AM, Rocha C, Proença L, Carvalho WA, et al. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp Parasitol*. 2005;110:12-21.
38. Cruz APR, Silva SS, Mattos RT, Da Silva Vaz I Jr, Masuda A, Ferreira CA. Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines. *Vet Parasitol*. 2008;158:152–158.
39. Shapiro SZ, Voigt WP, Ellis JA. Acquired resistance to ixodid ticks induced by tick cement antigen. *Exp Appl Acarol*. 1989;7:33-41.
40. Willadsen P, Kemp DH. Vaccination with ‘concealed’ antigens for tick control. *Parasitol Today*. 1988;4:196-198.
41. Mulenga A, Sugimoto C, Onuma M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infect*. 2000;2:1353-1361.
42. Opdebeeck JP, Wong JYM, Jackson LA, Dobson, C. Vaccines to protect Hereford cattle against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Immunol*. 1988;63:363-367.
43. Willadsen P, Eisemann CH, Tellam RL. ‘Concealed’ Antigens: Expanding the Range of Immunological Targets. *Parasitol Today*, 1993;9:132-135.

44. Wikel SK, Ramachandra RN. Tick-induced modulation response. *Aust Soc Parasitol.* 1994;24:59–66.
45. Nuttall PA, Trimnell AR, Kazimirova M, Labuda M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.* 2006;28:155–163.
46. Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J. Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology.* 1995;110:S43-50.
47. de Vos S, Zeinstra L, Taoufik O, Willadsen P, Jongejan F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Exp Appl Acarol.* 2001;25:245-261.
48. Rodriguez M, Penichet ML, Mouris AE, Labarta V, Luaces LL, Rubiera R et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet Parasitol.* 1995;57:339-349.
49. de la Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, García-García JC, Méndez L, et al. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac™. *Genet Anal.* 1999;15:143-148.
50. Valle MR, Méndez L, Valdez M, Redondo M, Espinosa CM, Vargas M, et al. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac. *Exp Appl Acarol.* 2004;34:375–382.
51. Fragoso H, Rad PH, Ortiz M, Rodriguez M, Redondo M, Herrera L, et al. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* BmS6-containing vaccine Gavac. *Vaccine.* 1998;16:1990-1992.
52. Popara M, Villara M, Mateos-Hernández L, de Meraa IGF, Marinab A, del Valle M, et al. Lesser protein degradation machinery correlates with higher BM86 tick vaccine efficacy in *Rhipicephalus annulatus* when compared to *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine.* 2013;31:4728–4735.
53. Riding GA, Jarmey J, McKenna RV, Pearson R, Cobon GS, Willadsen PA. Protective “Concealed” Antigen from *Boophilus microplus*. Purification, Localization, and Possible Function. *J Immunol.* 1994;153:5158-5166.
54. McKenna RV, Riding GA, Jarmey JA, Pearson RD, Willadsen P. Vaccination of cattle against *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. *Parasite Immunol.* 1998;20:325-336.
55. García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine.* 2000;18:2275-2287.
56. da Silva Vaz Jr. I, Logullo C, Sorgine M, Velloso FF, Rosa de Lima MF, Gonzales JC, et al. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor

- isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;66:331-41.
57. Leal AT, Seixas A, Pohl PC, Ferreira CA, Logullo C, Oliveira PL, et al. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;114:341-345.
  58. Seixas A, Leal AT, Nascimento-Silva MC, Masuda A, Termignoni C, da Silva Vaz Jr I. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;124:332-340.
  59. da Silva Vaz Jr I, Imamura S, Ohashi K, Onuma M. Cloning, expression and partial characterization of a *Haemaphysalis longicornis* and a *Rhipicephalus appendiculatus* glutathione S-transferase. *Insect Mol Biol.* 2004;13:329-335.
  60. Parizi LF, Utiumi KU, Imamura S, Onuma M, Ohashi K, Masuda A, da Silva Vaz Jr. I. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Exp Parasitol* 2011;127:113-118.
  61. Ali A, Parizi LF, Guizzo MG, Tirloni L, Seixas A, da Silva Vaz Jr. I, et al. Immunoprotective potential of a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* metalloprotease. *Vet Parasitol.* 2015;207:107-114.
  62. Andreotti R, Cunha RC, Soares MA, Guerrero FD, Leite FP, de León AA. Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine.* 2012;30:6678-6685.
  63. Manzano-Román R, Días-Martín V, Oleaga A, Siles-Lucas M, Pérez-Sánchez R. Subolesin/akirin orthologs from *Ornithodoros* spp. Soft ticks: Cloning, RNAi gene silencing and protective effect of the recombinant proteins. *Vet Parasitol.* 2012;185:248-259.
  64. Contreras M, de la Fuente J. Control of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* tick infestations in rabbits vaccinated with the Q38 Subolesin/Akirin chimera. *Vaccine.* 2016; 34:3010-3013.
  65. Lu P, Zhou Y, Yu Y, Cao J, Zhang H, Gong H, et al. RNA interference and the vaccine effect of a subolesin homolog from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Exp Appl Acarol.* 2016;68:113-126.
  66. Olds CL, Mwaura S, Odongo DO, Scoles GA, Bishop R, Daubenberger C. Induction of humoral immune response to multiple recombinant *Rhipicephalus appendiculatus* antigens and their effect on tick feeding success and pathogen transmission. *Parasit Vectors.* 2016;9:484.
  67. Almazán C, Blas-Machadob U, Kocana KM, Yoshiokaa JH, Blouina EF, Atilio J, et al. Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations? *Vaccine.* 2005;23:4403-4416.

68. Almazán C, Kocana, KM, Blouina EF, de la Fuente J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*. 2005;23:5294-5298.
69. Wang H, Nuttall PA. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cell Mol Life Sci*. 1999;56:286-295.
70. Gong H, Qin S, Wan X, Zhang H, Zhou Y, Cao J, et al. Immunoglobulin G binding protein (IGBP) from *Rhipicephalus haemaphysaloides*: identification, expression, and binding specificity. *Parasitol Res*. 2014;113:4387-4395.
71. Galay RL, Umemiya-Shirafuji R, Bacolod ET, Maeda H, Kusakisako K, Koyama J, et al. Two kinds of ferritin protect ixodid ticks from iron overload and consequent oxidative stress. *PLoS ONE*. 2014;9:e90661.
72. Hajduseka O, Almazán C, Loosova G, Villar M, Canales M, Grubhofferd L, et al. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine*. 2010;28:2993-2998.
73. Galay RL, Miyata T, Umemiya-Shirafuji R, Maeda H, Kusakisako K, Tsuji N, et al. Evaluation and comparison of the potential of two ferritins as anti-tick vaccines against *Haemaphysalis longicornis*. *Parasit Vectors*. 2014;7:482.
74. Moorhouse DE, Tatchell RJ. The feeding process of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini): A study in host-parasite relations. *Parasitology* 1966;56:623-631.
75. Bishop R, Lambson B, Wells C, Pandit P, Osaso J, Nkonge C et al. A cement protein of the tick *Rhipicephalus appendiculatus*, located in the secretory e cell granules of the type III salivary gland acini, induces strong antibody responses in cattle. *Int J Parasitol*. 2002;32:833-842.
76. Trimnell AR, Hails RS, Nuttall PA. Dual action ectoparasites vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine*. 2002;20:3560-3568.
77. Labuda M, Trimnell AR, Ličková M, Kazimírová M, Davies GM, Lissina O, et al. An antivector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathogens*. 2006;2(4):e27.
78. Trimnell AR, Davies GM, Lissina O, Hails RS, Nuttall PA. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*. 2005;23:4329-41.
79. Imamura S, da Silva Vaz Jr. I, Sugino M, Ohashi K, Onuma M. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*. 2005;23:1301-1311.
80. Imamura S, Namangala B, Tajima T, Tembo ME, Yasuda J, Ohashi K, Onuma M. Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune

- response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vaccine*. 2006;24:2230-2237.
81. Tirloni L, Seixas A, Mulenga A, da Silva Vaz I, Termignoni C. A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Exp Parasitol*. 2014;137:25–34.
  82. Contreras M, de la Fuente J. Control of infestations by *Ixodes ricinus* tick larvae in rabbits vaccinated with aquaporin recombinant antigens. *Vaccine*. 2017;35:1323-1328.
  83. Guerrero FD, Andreotti R, Bendele KG, Cunha RC, Miller RJ, Yeater K, Pérez de León AA. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. *Parasit Vectors*. 2014;7:475.
  84. Tan AWL, Francischetti IMB, Slovak M, Kini RM, Ribeiro JMC. Sexual differences in the sialomes of the zebra tick, *Rhipicephalus pulchellus*. *J Proteomics*. 2015;117:120-144.
  85. Bian Y, Chen W, Yang G, Gu X, Wang S, Sun J, et al. Cloning, expression and evolution of the efficacy of a recombinant *Haemaphysalis concinna* Hc-23 antigen in rabbits. *Vaccine*. 2011;29:1041-1044.
  86. Willadsen P, Billingsley PF. Immune intervention against blood-feeding insects. In: Lehane MJ, Billingsley PF, editors. *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall. 1996. p. 323-344.
  87. Imamura S, Konnai S, da Silva Vaz Jr. I, Yamada S, Nakajima C, Ito Y. Effects of anti-tick cocktail vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. *Jpn J Vet Res*. 2008;56:85-98.
  88. Parizi LF, Reck J, Oldiges DP, Guizzo MG, Seixas A, Logullo C, et al. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation. *Vaccine*. 2012;30:6912–6917.
  89. Almazán 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.
  90. Ribeiro JMC, Alarcon-Chaidez F, Francischetti IMB, Mans BJ, Mather TN, Valenzuela JG et al. An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006;36:111-129.
  91. Tirloni L, Islam MS, Kim TK, Diedrich JK, John R. Yates III, Pinto AFM, et al. Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: a proteomic study. *Parasit Vectors*. 2015;8:338.

92. Radulović ZM, Kim TK, Porter LM, Sze S-H, Lewis L, Mulenga A. A 24-48 h fed *Amblyomma americanum* tick saliva immuno-proteome. *BMC Genomics*. 2014;15:518.
93. de Castro MH, de Klerk D, Pienaar R, Latif AA, Rees DJG, Mans BJ. De novo assembly and annotation of the salivary gland transcriptome of *Rhipicephalus appendiculatus* male and female ticks during blood feeding. *Ticks Tick Borne Dis*. 2016;7:536-548.
94. Moreira HN, Barcelos RM, Vidigal PM, Klein RC, Montandon CE, Maciel TE, et al. A deep insight into the whole transcriptome of midguts, ovaries and salivary glands of the *Amblyomma sculptum* tick. *Parasitol Int*. 2017;66:64-73.
95. Garcia GR, Gardinassi LG, Ribeiro JM, Anatriello E, Ferreira BR, Moreira HNS, et al. The sialotranscriptoma of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. *Parasit Vectors*. 2014;7:430.
96. Ribeiro JMC, Slovák M, Francischetti IMB. An insight into the sialome of *Hyalomma excavatum*. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017;8:201-207.
97. Anderson JM, Sonenshine DE, Valenzuela JG. Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics*. 2008;9:552.
98. Perner J, Provazník J, Schrenková J, Urbanová V, Ribeiro JMC, Kopáček P. RNA-seq analyses of the midgut from blood- and serum-fed *Ixodes ricinus* ticks. *Sci Rep*. 2016;6:36695.
99. Marr EJ, Sargison ND, Nisbet AJ, Burgess ST. RNA interference for the identification of ectoparasite vaccine candidates. *Parasite Immunol*. 2014;36:616-626.
100. de la Fuente J, Kopáček P, Lew-Tabor, Maritz-Oliver C. Strategies for new and improved vaccines against ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol*. 2016;38:754-769.
101. Kocan KM, Blouin E, de la Fuente J. RNA Interference in Ticks. *JoVE*. 2011;47. Disponível em: <http://www.jove.com/details.php?id=2474>. doi: 10.3791/2474.
102. Tang W, Luo XY, Sanmuels V. Gene silencing: double-stranded RNA mediated mRNA degradation and gene inactivation. *Cell Res*. 2001;11:181-186.
103. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004;431:343-349.
104. Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, et al. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 2004;117:69-81.



105. Sontheimer EJ. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:127-138.
106. Kavi HH, Fernandez HR, Xie W, Birchler JA. RNA silencing in *Drosophila*. *FEBS Lett.* 2005;579:5940-5949.
107. Hoa NT, Keene KM, Olson KE, Zheng L. Characterization of RNA interference in an *Anopheles gambiae* cell line. *Insect Biochem Mol Biol.* 2003;33:949-957.
108. Fire AZ. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* 2007;14:1998-2012.
109. Fabres A, de Andrade CP, Guizzo M, Sorgine MHF, Paiva-Silva GD, Masuda A, et al. Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. *Parasitology.* 2010;137:1537-1546.
110. Hussein HE, Scoles GA, Ueti MW, Suarez CE, Adham FK, Guerrero FD et al. Targeted silencing of the Aquaporin 2 gene of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* reduces tick fitness. *Parasit Vectors.* 2015;8:618.
111. Galay RL, Hernandez EP, Talactac MR, Maeda H, Kusakisako K, Umemiya-Shirafuji R, et al. Induction of gene silencing in *Haemaphysalis longicornis* ticks through immersion in double-stranded RNA. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7:813-816.
112. Ruiz N, de Abreu LA, Parizi LF, Kim TK, Mulenga A, Braz GRC, et al. Non-invasive delivery of dsRNA into de-waxed tick eggs by electroporation. *PLoS ONE.* 2015;10:e130008.
113. Soares CA, Lima CM, Dolan MC, Piesman J, Beard CB, Zeidner NS. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Mol Biol.* 2005;14:443-52.
114. Garcia S, Billecocq A, Crance J-M, Prins M, Daniel Garin D, Bouloy M. Viral suppressors of RNA interference impair RNA silencing induced by a Semliki Forest virus replicon in tick cells. *J Gen Virol.* 2006;87:1985-1989.
115. Schnettler E, Ratinier M, Watson M, Shaw AE, McFarlane M, Varela M, et al. RNA interference targets arbovirus replication in Culicoides cells. *J Virol.* 2013;87:2441-2454.
116. Nijhof AM, Taoufk A, de la Fuente J, Kocan KM, de Vries E, Jongejan F. Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *Int J Parasitol.* 2007;37:653-662.
117. de la Fuente J, Kocan KM. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol.* 2006;28:275-283.

118. Alzugaray MF, Parizi LF, Seixas A, Benavides U, da Silva Vaz I Jr. Molecular and functional characterization of Bm05br antigen from *Rhipicephalus microplus*. Ticks Tick Borne Dis. 2017;8:320-329.
119. Bifano TD, Ueti MW, Esteves E, Reif KE, Braz GR, Scoles GA, et al. Knockdown of the *Rhipicephalus microplus* cytochrome c oxidase subunit III gene is associated with a failure of *Anaplasma marginale* transmission. PLoS ONE. 2014;9:e98614.
120. Kim TK, Zeljko Radulovic Z, Mulenga A. Target validation of highly conserved *Amblyomma americanum* tick saliva serine protease inhibitor 19. Ticks Tick Borne Dis. 2016;7:405-414.
121. Ferrolho J, Antunes S, Sanches GS, Couto J, Évora PM, Rosa C, et al. Ferritin 1 silencing effect in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) during experimental infection with *Ehrlichia canis*. Ticks Tick Borne Dis. 2017;8:174-184.
122. Wang Y, Zhou Y, Gong H, Cao J, Zhang H, Li X, Zhou J. Functional characterization of a cystatin from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. Parasit Vectors. 2015;8:140.
123. Aung KM, Boldbaatar D, Liao M, Umemiya-Shirafuji R, Nakao S, Matsuoka T, et al. Identification and characterization of class B scavenger receptor CD36 from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. Parasitol Res. 2011;108:273-285.
124. Gao X, Shi L, Zhou Y, Cao J, Houshuang Zhang H, Zhou J. Characterization of the anticoagulant protein Rhipilin-1 from the *Rhipicephalus haemaphysaloides* tick. J Insect Physiol. 2011;57:339-343.
125. Ribeiro JMC. Role of Saliva in Tick / Host Interactions. Exp Appl Acarol. 1989;7:15-20.
126. Kazimírová M, Štibrániová I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. Front Cell Infect Microbiol. 2013;3:1-19.
127. Kazimírová M, Jancinová V, Petříková M, Takác P, Labuda M, Nosál' R. An inhibitor of thrombin-stimulated blood platelet aggregation from the salivary glands of the hard tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae). Exp Appl Acarol. 2002;28:97-105.
128. Reck Jr J, Berger M, Marks FS, Zingali RB, Canal CW. Pharmacological action of tick saliva upon haemostasis and the neutralization ability of sera from repeatedly infested hosts. Parasitology. 2009;136:1339-1349.
129. Francischetti IMB, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JMC. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. Blood. 2002;99:3602-3612.

130. Narasimhan S, Koski RA, Beaulieu B, Anderson JF, Ramamoorthi N, Kantor F. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2002;11:641-650.
131. Bowman AS, Sauer Jr, Zhu Kuichun, Dillwith JW. Biosynthesis of Salivary Prostaglandins in the Lone Star Tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Biochem Mol Biol*. 1995;25:735-741.
132. Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JM. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem*. 2000;275:18717-18723.
133. Nunn MA, Sharma A, Paesen GC, Adamson S, Lissina O, Willis AC, Nuttall PA. Complement Inhibitor of C5 Activation from the Soft Tick *Ornithodoros moubata*. *J Immunol*. 2005;174:2084-2091.
134. Nonaka M, Yoshizaki F. Evolution of the complement system. *Mol Immunol*. 2004;40:897-902.
135. Rus H, Cudrici C, Niculescu F. The Role of the Complement System in Innate Immunity. *Immunol Res*. 2005;33:103-112.
136. Daix V, Schroeder H, Praet N, Georgin J-P, Chiappino I, Gillet L, et al. Ixodes ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Mol Biol*. 2007;16:155-166.
137. Schroeder H, Skelly PJ, Zipfel PF, Losson B, Vanderplasschen A. Subversion of complement by hematophagous parasites. *Dev Comp Immunol*. 2009;33:5-19.
138. Hourcade DE, Akk AM, Mitchell LM, Zhou H-F, Hauhart R, Pham CTN. Anti-complement activity of the *Ixodes scapularis* salivary protein Salp20. *Mol Immunol*. 2016;69:62-69.
139. Franco PF, Silva NC, Fazito do Vale V, Abreu JF, Santos VC, Gontijo NF, et al. Inhibition of the classical pathway of the complement system by saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Exp Parasitol*. 2016;164:91-96.
140. Mulenga A, Kim TK, Ibelli AM. Deorphanization and target validation of cross-tick species conserved novel *Amblyomma americanum* tick saliva protein. *Int J Parasitol*. 2013;43:439-451.
141. Silva NCS, Vale VF, Franco PF, Gontijo NF, Valenzuela JG, Pereira MH, et al. Saliva of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. *Parasit Vectors*. 2016;9:445.
142. Nunn MA, Sharma A, Paesen GC, Adamson S, Lissina O, Anthony C, Willis AC, et al. Complement Inhibitor of C5 Activation from the Soft Tick *Ornithodoros moubata*. *J Immunol*. 2005;174:2084-2091.

143. Ribeiro JMC. Role of saliva in blood feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol.* 1987;32:463-478.
144. Bowman AS, Dillwith JW, Sauer JR. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. *Parasitol Today.* 1996;12:388-396.
145. Ribeiro JM, Makoul GT, Robinson DR. *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. *J Parasitol.* 1988;74:1068-1069.
146. Chmelar J, Calvo E, Pedra JHF, Francischetti IMB, Kotsyfakis M. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *PMC.* 2012;16:3842-3854.
147. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin Formation, Structure and Properties. *Subcell Biochem.* 2017;82:405-456.
148. Yu Y, Cao J, Zhou Y, Zhang H, Zhou J. Isolation and characterization of two novel serpins from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013;4:297-303.
149. Ibelli AMG, Kim TK, Hill CC, Lewis LA, Bakshi M, Miller S, Porter L, et al. A blood meal-induced *Ixodes scapularis* tick saliva serpin inhibits trypsin and thrombin, and interferes with platelet aggregation and blood clotting. *Int J Parasitol.* 2014;44:369-379.
150. Kim TK, Radulovic Z, Mulenga A. Target validation of highly conserved *Amblyomma americanum* tick saliva serine protease inhibitor 19. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015;7:405-414.
151. Macedo-Ribeiro S, Almeida C, Calisto BM, Friedrich T, Mentele R, Stürzebecher J, et al. Isolation, cloning and structural characterisation of Boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS ONE.* 2008;3:e1624.
152. Soares TS, Oliveira F, Torquato RJ, Sasaki SD, Araujo MS, Paschoalin T, et al. BmTI-A, a Kunitz type inhibitor from *Rhipicephalus microplus* able to interfere in vessel formation. *Vet Parasitol.* 2016;219:44-52.
153. Azzolini SS, Sasaki SD, Torquato RJ, Andreotti R, Andreotti E, Tanaka AS. *Rhipicephalus sanguineus* trypsin inhibitors present in the tick larvae: isolation, characterization, and partial primary structure determination. *Arch Biochem Biophys.* 2003;417:176-182.
154. Keller PM, Waxman L, Arnold BA, Schultz LD, Condra C, Connolly TM. Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation. *J Biol Chem.* 1993;268:5450-5456.
155. Jaworski DC, Simmen FA, Lamoreaux W, CoonsLB, Muller MT, Needham GR. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *J Insect Physiol.* 1995;41:369-375.

156. Ferreira CAS, da Silva Vaz I, da Silva SS, Haag KL, Valenzuela JG, Masuda A. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Exp Parasitol*. 2002;101:25-34.
157. Soares TS, Watanabe RMO, Tanaka-Azevedo AM, Torquato RJS, Lu S, Figueiredo AC et al. Veterinary Parasitology Expression and functional characterization of boophilin, a thrombin inhibitor from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut. *Vet. Parasitol*. 2012;187:521-528.
158. Chmelar J, Oliveira CJ, Rezacova P, Francischetti IMB, Kovarova Z, Pejler G, et al. A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood*. 2011;117:736-744.
159. Parizi LF, Githaka NW, Acevedo C, Benavides U, Seixas A, Logullo C, et al. Sequence characterization and immunogenicity of cystatins from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ticks Tick Borne Dis*. 2013;4:492-499.
160. Havlíková S, Roller L, Koci J, Trimmell AR, Kazimírová M, Klempa B, Nuttall PA. Functional role of 64P, the candidate transmission-blocking vaccine antigen from the tick, *Rhipicephalus appendiculatus*. *Int J Parasitol*. 2009;39:1485-1494.
161. Ferreira CAS, Barbosa MC, Silveira TCL, Valenzuela JG, Da Silva Vaz Jr I, Masuda A. cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. *Parasitology*. 2002;125:265-274.
162. Leal BF, Seixas A, Mattos RT, Coutinho ML, Masuda A, da Silva Vaz Jr. I, et al. Tissue expression and the host's immunological recognition of a *Rhipicephalus microplus* paramyosin. *Vet Parasitol* 2013;197:304-311.
163. Mangeon A, Junqueira RM, Sachetto-martins G. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal Behav*. 2010;99-104.
164. Andersen SO, Hojrup P, Roepstorff P. Insect cuticular proteins. *Insect Biochem Mol Biol*. 1995;25,153-176.
165. Tsitilout SG, Rodakis GC, Alexopoulou M, Kafatos FC, Ito K, Iatroul K. Structural features of B family chorion sequences in the silkworm *Bombyx mori*, and their evolutionary implications. *EMBO J*. 1983;2:1845-1852.
166. Yamaguchi E, Yamauchi K, Gullion T, Asakura T. Structural analysis of the Gly-rich region in spider dragline silk using stable-isotope labeled sequential model peptides and solid-state NMR. *Chem Commun*. 2009;28:4176-4178.
167. Sudo S, Fujikawa T, Nagakura T, Ohkubo T, Sakaguchi K, Tanaka M, Nakashima K, Takahashi T. Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature*. 1997;387:563-564.
168. Mariyama M, Leinonen A, Mochizuki, T, Tryggvason K, Reeders, ST. Complete Primary Structure of the Human  $\alpha 3$  (IV) Collagen Chain. *J Biol Chem*. 1994;269:23013-23017.

169. Sicot F-X, Exposito J-Y, Masselot M, Garrone R, Deutsch J, Gaill F. Cloning of an annelid fibrillar-collagen gene and phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate collagens. *Eur J Biochem.* 1997;58:50-58.
170. Maruyama SR, Anatriello E, Anderson JM, Ribeiro JM, Brandão LG, Valenzuela JG, et al. The expression of genes coding for distinct types of glycine-rich proteins varies according to the biology of three metastriate ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense*. *BMC Genomics.* 2010;11:1–17.
171. Zhou J, Gong H, Zhou Y. Identification of a glycine-rich protein from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides* and evaluation of its vaccine potential against tick feeding. *Parasitol. Res.* 2006;100:77-84.
172. Mulenga A, Sugimoto C, Sako Y, Ohashi K, Musoke A, Shubash M et al. Molecular Characterization of a *Haemaphysalis longicornis*. Tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. 1999;67:1652-1658.
173. Jiang X, Gao J, Wang W, Xu M, Li W, Qi M, et al. Molecular characterization of an alanine-, proline-, glycine-, threonine-, and serine-rich protein of the hard tick *Haemaphysalis qinghaiensis* and its effect as a vaccine against tick infestation in sheep. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:14-20.
174. Shahein YE, Abouelella AM, Hussein NA, Hamed RR, El-Hakim AE, Abdel-Shafy S, et al. Identification of four novel *Rhipicephalus annulatus* upregulated salivary gland proteins as candidate vaccines. *Protein J.* 2013;32:392-398.
175. Kim TK, Tirloni L, Pinto AFM, Moresco J, Yates JR, da Silva Vaz Jr. I, et al. *Ixodes scapularis* tick saliva proteins sequentially secreted every 24 h during blood feeding. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004323.
176. Bullard RL, Williams J, Karim S. Temporal gene expression analysis and RNA silencing of single and multiple members of gene family in the lone star tick *Amblyomma americanum*. *PLoS ONE.* 2016;11: e0147966.
177. Nene V, Lee D, Kang S, Skilton R, Shah T, de Villiers E, et al. Genes transcribed in the salivary glands of female *Rhipicephalus appendiculatus* ticks infected with *Theileria parva*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34:1117-1128.
178. Francischetti IMB, Meng Z, Mans BJ, Guderra N, Hall M, Veenstra TD, et al. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. *J Proteomics.* 2008;71:493-512.
179. Ribeiro JMC, Labruna MB, Mans BJ, Maruyama SR, Francischetti IMB, Barizon GC, et al. The sialotranscriptome of *Antricola delacruzi* female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food. *Insect Biochem Mol Biol.* 2012;42:332-342.

180. Karim S, Singh P, Ribeiro JMC. A Deep Insight into the Sialotranscriptome of the Gulf Coast Tick. PLoS ONE. 2011;6:e28525.
181. Ribeiro JMC, Anderson JM, Manoukis NC, Meng Z, Francischetti IMB. A further insight into the sialome of the tropical bont tick *Amblyomma variegatum*. BMC Genomics. 2011;12:136.
182. Oliveira CJ, Anatriello E, de Miranda-Santos IK, Francischetti IM, Sá-Nunes A, Ferreira BR, et al. Proteome of *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva induced by the secretagogues pilocarpine and dopamine. Ticks Tick Borne Dis. 2013;4:469-477.
183. Untalan, P. M., Guerrero, F. D., Haines, L. R. and Pearson, T. W. Proteome analysis of abundantly expressed proteins from unfed larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus*. Insect Biochem Mol Biol. 2005;35:141-151.
184. Lew-Tabor, AE, Moolhuijzen PM, Vance ME, Kurscheid S, Rodriguez Valle M, Jarrett S, et al. Suppressive subtractive hybridization analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larval and adult transcript expression during attachment and feeding. Vet Parasitol. 2010;167:304-320.
185. Rodriguez-Valle M, Lew-Tabor A, Gondro C, Moolhuijzen P, Vance M, Guerrero FD, et al. Comparative microarray analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expression profiles of larvae pre-attachment and feeding adult female stages on *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. BMC Genomics. 2010;11:437.
186. Díaz-Martín V, Manzano-Román R, Valero L, Oleaga A, Encinas-Grandes A, Pérez-Sánchez R. An insight into the proteome of the saliva of the argasid tick *ornithodoros moubata* reveals important differences in saliva protein composition between the sexes. J Proteomics. 2013;80:216-235.
187. Xu XL, Cheng TY, Yang H, Liao ZH. De novo assembly and analysis of midgut transcriptome of *Haemaphysalis flava* and identification of genes involved in blood digestion, feeding and defending from pathogens. Infect, Genet Evol. 2016;38:62-72.
188. Cohen C, Szent-Györgyi AG, Kendrick-Jones J. Paramyosin and the filaments of molluscan “catch” muscles. I. Paramyosin: structure and assembly. J Mol Biol 1971;56:239-248.
189. Mackenzie Jr. RM, Epstein HF. Paramyosin is necessary for determination of nematode thick filament length in vivo. Cell, 1980;22:747-755.
190. Watabe S, Hartshorne DJ. Paramyosin and the catch mechanism. Comp Biochem Physiol. 1990;96:636-646.
191. Johnson WH, Kahn JS, Szent-Györgyr AG. Paramyosin and contaction of “Catch Muscles”. Science. 1959;130:160-161.

192. Gazarian KG, Solis CF, Gazarian TG, Rowley M, Laclette JP. Paramyosin: Implications for parasite- and host-protective roles of the protein. *Peptides*. 2011;34:232-241.
193. Landa A, Laclette JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB. cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol Biochem Parasitol*. 1993;60:343-348.
194. Laclette JP, Landa A, Arcos L, Willms K, Davis AE, Shoemaker CB. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol*. 1991;44:287-295.
195. Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller, A. Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol*. 1992;148:124-128.
196. Sun R, Zhao X, Wan Z, Yang J, Zhao L, Zhan B, et al. *Trichinella spiralis* Paramyosin Binds Human Complement C1q and Inhibits Classical Complement Activation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0004310.
197. Strube C, Buschbaum S, Schnieder T. Parasitology International Stage-dependent transcriptional changes and characterization of paramyosin of the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*. *Parasitol Int*. 2009;58:334-340.
198. Park T, Kang J, Na B, Sohn W. Molecular Cloning and Characterization of a Paramyosin from *Clonorchis sinensis*. *Korean J Parasitol*. 2009;47:359-367.
199. Deng J, Gold D, Loverde PT, Fishelson Z. Inhibition of the Complement Membrane Attack Complex by *Schistosoma mansoni* Paramyosin. *Infect Immun*. 2003;71:6402-6410.
200. Deng J, Gold D, Loverde PT, Fishelson Z. Mapping of the complement C9 binding domain in paramyosin of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol*. 2007;37:67-75.
201. Zang Z, Wei J, Yang J, Chen X, Zhao et al. *Trichinella spiralis* paramyosin binds to C8 and C9 and protects the tissue-dwelling nematode from being attacked by host complement. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:e1225.
202. Loukas A, Jones MK, King LT, Brindley PJ, McMannus DP. Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. *Infect Immun*. 2001;69:3646-3651.
203. Kalinna BH, McManus DP. An IgG (Fc $\gamma$ )-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with schistosome paramyosin. *Parasitology*. 1993;106:289-296.
204. Matsumoto Y, Perry G, Levine RJC, Blanton R, Mahmoud AAF, Aikawa M. Paramyosin and actin in schistosomal teguments. *Nature*. 1988;333:76-78.



205. Gobert GN. The role of microscopy in the investigation of paramyosin as a vaccine candidate against *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Today*, 1998;14:115-118.
206. Laclette JP, Skelly PL, Merchant MT, Shoemaker CB. Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in platyhelminth parasites. *Exp Parasitol*. 1995;81:140-144.
207. Cancela M, Carmona C, Rossi S, Frangione B, Goñi F, Berasain P. Purification, characterization, and immunolocalization of paramyosin from the adult stage of *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res*. 2004;92:441-448.
208. Zhao QP, Moon SU, Na BK, Kim SH, Cho SH, Lee HW, et al. *Paragonimus westermani*: biochemical and immunological characterizations of paramyosin. *Exp Parasitol*. 2006;115:9-18.
209. Wang X, Chen W, Lv X, Tian Y, Men J, Zhang X, et al. Identification and Characterization of Paramyosin from Cyst Wall of Metacercariae Implicated Protective Efficacy against Infection. *PLoS ONE*. 2012;7:e33703.
210. Lanar DE, Pearce EJ, James SL, Sher A. Identification of paramyosin as schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science*. 1986;234:593-596.
211. Pearce EJ, James SL, Hieny S, Lanar DE, Sher A. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:5678-5682.
212. Ramirez B, Kurtis JD, Wiest PM, Arias P, Aligui F, Acosta L, et al. Paramyosin: a candidate vaccine antigen against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol*. 1996;18:49-52.
213. Zhou SH, Liu S, Song G, Xu Y. Cloning, sequencing and expression of the full-length cDNA encoding paramyosin of Chinese *Schistosoma japonicum*. *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases*. 1999;17:196-199.
214. Jiz MA, Wu H, Olveda R, Jarilla B, Kurtis JD. Development of paramyosin as a vaccine candidate for schistosomiasis. *Front Immunol*. 2015;6:347.
215. Li BW, Chandrashekar R, Weil GJ. Vaccination with recombinant filarial paramyosin induces partial immunity to *Brugia malayi* infestation in jirds. *J Immunol*. 1993;150:1881-1885.
216. Vazquez-Talavera J, Solís CF, Terrazas LI, Laclette JP. Characterization and protective potential of the immune response of *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. *Infect Immun*. 2001;23:575-579.
217. Strube C, Haake C, Sager H, Schorderet Weber S, Kaminsky R, Buschbaum S. Vaccination with recombinant paramyosin against the bovine lungworm

- Dictyocaulus viviparus* considerably reduces worm burden and larvae shedding. *Parasit Vectors*. 2015;8:119.
218. Chen X, Yang Y, Yang J, Zhang Z, Zhu X. RNAi-Mediated silencing of paramyosin expression in *Trichinella spiralis* results in impaired viability of the parasite. *PLoS ONE*. 2012;7:e49913.
  219. Hao Y, Zhao X, Yang J, Gu Y, Sun R, Zhu X. Monoclonal antibody targeting complement C9 binding domain of *Trichinella spiralis* paramyosin impairs the viability of *Trichinella* infective larvae in the presence of complement. *Parasit Vectors*. 2014;4:313.
  220. Mattsson JG, Ljunggren EL, Bergström K, Paramyosin from the parasitic mite *Sarcoptes scabiei*: cDNA cloning and heterologous expression. *Parasitology*. 2001;122:555-562.
  221. Ramos JDA, Cheong N, Lee BW, Chua KY. cDNA cloning and expression of Blo t 11, the *Blomia tropicalis* allergen homologous to paramyosin. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;126:286-293.
  222. Tsai LC, Peng HJ, Lee CS, Chao PL, Tang RB, Tsai JJ, et al. Molecular cloning and characterization of full-length cDNAs encoding a novel high-molecular-weight *Dermatophagoides pteronyssinus* mite allergen, Der p 11. *Allergy*. 2005;60:927-937.
  223. Tsai LC, Sun Y-C, Chao PL, NG H-P, Hung MW, Hsieh S-H, et al. Sequence analysis and expression of a cDNA clone encoding a 98-kDa allergen in *Dermatophagoides farinae*. *Clin Exp Allergy*. 1999;29:1606-1613.
  224. Gu X, Yue Xie Y, Wang S, Peng X, Lai S, Yang G. Immune response induced by candidate *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* DNA vaccine encoding paramyosin in mice. *Exp Appl Acarol*. 2014;63:401-412.
  225. Wright HW, Bartley K, Huntley JF, Nisbet AJ. Characterisation of tropomyosin and paramyosin as vaccine candidate molecules for the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Parasit Vectors*. 2016;9:544.
  226. Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:1139-1146.
  227. Kim KH. Overview of atopic dermatitis. *Asia Pac Allergy*. 2013;3:79-87.
  228. Marangi M, Cafiero MA, Capelli G, Camarda A, Sparagano OA, Giangaspero A. Evaluation of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) susceptibility to some acaricides in field populations from Italy. *Exp Appl Acarol*. 2009;48:11-18.
  229. Tsai LC, Chao PL, Hung MW, Sun YC, Kuo IC, Chua KY, et al. Protein sequence analysis and mapping of IgE and IgG epitopes of an allergenic 98-kDa *Dermatophagoides farinae* paramyosin, Der f 11. *Allergy*. 2000;55:141-147.

230. Lee CS, Tsai LC, Chao PL, Lin CY, Hung MW, Chien AI, et al. Protein sequence analysis of a novel 103-kDa *Dermatophagoides pteronyssinus* mite allergen and prevalence of serum immunoglobulin E reactivity to rDer p 11 in allergic adult patients. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:354-362.
231. Steel C, Limberger RJ, McReynolds LA, Ottesen EA, Nutman TB. B cell responses to paramyosin. *J Immunol*. 1990;145:3917-3923.
232. Li YS, Ross AG, Sleight AC, Li Y, Waine GJ, Williams GJ, Tanner M, McManus DP. Antibody isotype responses, infection and re-infection for *Schistosoma japonicum* in a marshland area of China. *Acta Trop*. 1999;73:79-92.
233. Moghadam ZK, Ghaffarifar F, Khalilpour A, Aziz FA, Saadatnia G, Noordin R. IgG4 Detection of *Echinococcus granulosus* Paramyosin Is a Useful Diagnostic Test for Human Hydatidosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20:50.
234. da Silva Vaz Jr. I, Ozaki LS, Masuda A. Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissues. *Vet Parasitol*. 1994;52:71-78.
235. Pruett JH, Untalan PM, Davey RB. Identification and partial purification of serologically defined *Boophilus microplus* larval antigens by natural ectoparasite exposure. *Vet Parasitol*. 2006;140:148-157.
236. Nara T, Iizumi K, Ohmae H, Sy OS, Tsubota S, Inaba Y, et al. Antibody isotype responses to paramyosin, a vaccine candidate for schistosomiasis, and their correlations with resistance and fibrosis in patients infested with *Schistosoma japonicum* in Leyte, the Philippines. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76:384-391.
237. Ferrer E, Moyano E, Benitez L, González LM, Bryce D, Foster-Cuevas M, et al. Cloning and characterization of *Taenia saginata* paramyosin cDNA. *Parasitol Res*. 2003;91:60-67.
238. Hu Y, Zhang J, Yang S, Wang H, Zeng H, Zhang T, et al. Screening and Molecular Cloning of a Protective Antigen from the Midgut of *Haemaphysalis longicornis*. *Korean J Parasitol*. 2013;51:327-334.
239. Kang J-M, Ju H-L, Lee J, Kim TI, Cho S-H, Kim T-S et al. Mapping of the putative epitope domain of *Clonorchis sinensis* paramyosin (CsPmy) recognized by CsPmy-specific immunoglobulin G in sera of human clonorchiasis. *Mol Biochem Parasitol*. 2015;201:66-71.
240. Ramos JDA, Cheong N, Lee BW, Chua KY. Peptide mapping of immunoglobulin G immunodominant epitopes of an allergenic *Blomia tropicalis* paramyosin, Blot t 11. *Clin. Exp. Allergy*. 2003;33:511-517.
241. Ramos JDA, Teo ASM, Ou KL, Tsai LC, Lee BW, Cheong N, et al. Comparative allergenicity studies of native and recombinant *Blomia tropicalis* Paramyosin (Blot t 11). *Allergy*. 2003;58:412-419.

242. Nanduri J, Kazura JW. Paramyosin-enhanced clearance of *Brugia malayi* microfilaremia in mice. *J. Immunol.* 1989;143:3359-3363.
243. Jiz M, Wu H, Meng R, Pond-Tor S, Reynolds M, Friedman JF et al. Pilot-scale production and characterization of paramyosin, a vaccine candidate for schistosomiasis japonica. *Infect Immun.* 2008;76:3164-3169.
244. Lin-Cereghino J, Wong WW, Xiong S, Giang W, Luong LT, Vu J, et al. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques.* 2005;38:44,46,48.
245. Dunn SD. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem.* 1986;157:144-153.
246. Rott MB, Fernández V, Farias S, Ceni J, Ferreira HB, Haag KL, et al. Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Trop.* 2000;75:331-340.
247. Pohl PC, Klafke GM, Carvalho DD, Martins JR, Daffre S, da Silva Vaz Jr. I. et al. ABC transporter efflux pumps: A defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Int J Parasitol.* 2011;41:1323-1333.
248. Fabres A, de Andrade, CP, Guizzo M, Sorgine MHF, Paiva-Silva GD, Masuda A, et al. Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. *Parasitology.* 2010;137:1537-1546.
249. Pohl PC, Sorgine MHF, Leal AT, Logullo C, Oliveira PL, da Silva Vaz Jr. I, et al. An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008;151:392-399.
250. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST ©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:e36.
251. Bullard RL, Allen P, Chao CC, Douglas J, Das P, Morgan SE, et al. Structural characterization of tick cement cones collected from in vivo and artificial membrane blood-fed lone star ticks (*Amblyomma americanum*). *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7:880-892.
252. Pichia Technology From RCT. Disponível em: <http://www.pichia.com/try-pichia/vendors/>. Último acesso em: 13 de março de 2017.
253. Ciarkowska A, Jakubowska A. *Pichia pastoris* as an expression system for recombinant protein production. *Postepy Biochem.* 2013;59:315-321.

254. Zawadzki JL, Kotze AC, Fritz JA, Johnson NM, Hemsworth JE, Hines BM, et al. Silencing of essential genes by RNA interference in *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. 2012;139:613-629.

## Apêndice A

### Soluções

- **Soluções para SDS-PAGE e western-blot**

#### **PBS 10x**

NaCl	85 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	15,5 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,3 g
H <sub>2</sub> O destilada	1 L
pH 7,3	

#### **PBS 1x com 0,05% de Tween 20**

PBS 10x	100 mL
H <sub>2</sub> O destilada	900 mL
Tween 20	0,5 mL

#### **Blotto**

Leite em pó	5 g
PBS 1x com tween 20	100 mL

#### **Tampão de amostra 5x**

Tris-HCl (pH 8,0)	62,5 mM
Azul de bromofenol	0,001%
Glicerol	10%
β-mercaptoetanol	5%
SDS	2%
Ureia	8 M

**Tampão Tris-Glicina 1x**

Tris	0,25 M
Glicina	1,92 M
SDS	1%
pH 8,3	

**Tampão de Transferência 1x**

Bicarbonato de sódio	13 mM
Metanol	20%
pH 9,9	

**Tampão de revelação para fosfatase alcalina**

Tris	3 g
NaCl	1,5 g
MgCl <sub>2</sub>	0,25 g
H <sub>2</sub> O destilada	250 mL
pH 9,5	

**NBT**

NBT	50 mg
Dimetilformamida	700 µL
H <sub>2</sub> O destilada	300 µL

**BCIP**

BCIP	50 mg
Dimetilformamida	1 mL

**Tampão de revelação com NBT e BCIP**

Tampão de revelação para fosfatase alcalina	10 mL
NBT	66 µL
BCIP	34 µL

**Azul de Coomassie**

Metanol	45%
Ácido acético	10%
Corante Azul Brilhante R	3 g
H <sub>2</sub> O destilada	45%
Filtrar com papel filtro	

- **Soluções para gel de poliacrilamida**

**Solução de Poliacrilamida**

Acrilamida	29 g
Bisacrilamida	1 g
H <sub>2</sub> O destilada	100 mL
Filtrar com papel filtro	

**Gel de corrida 15%**

Solução de poliacrilamida	5 mL
Tris 1M (pH 8,8)	2 mL
SDS 10%	100 µL
APS 10%	100 µL
Temed	10 µL
Ureia	3,6 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	10 mL

**Gel de empilhamento 5%**

Solução de poliacrilamida	0,84 mL
Tris 1M	0,5 mL
SDS 10%	50 µL
APS 10%	50 µL
Temed	5 µL
Ureia	1,4 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	5 mL



- **Soluções para purificação de proteínas**

**Tampão de ligação**

Fosfato de sódio	20 mM
NaCl	0,5 M
Imidazol	20 mM
Ureia (adicionada para proteínas de baixa solubilidade)	8 M
pH 7,4	

**Tampão de lavagem**

Fosfato de sódio	20 mM
NaCl	0,5 M
Imidazol	50 mM
Ureia (adicionada para proteínas de baixa solubilidade)	8 M
pH 7,4	

**Tampão de eluição**

Fosfato de sódio	20 mM
NaCl	0,5 M
Imidazol	0,5 M
Ureia (adicionada para proteínas de baixa solubilidade)	8 M
pH 7,4	

**Tampão para solubilização de corpos de inclusão**

Ureia	8 M
Tris-HCl	10 mM
Ditiotreitol (DTT)	1 mM
pH 8,0	

- **Meios de cultivo**

**Luria-Bertani (LB) caldo**

Triptona	1%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	0,5%

**Luria-Bertani (LB) agar**

Triptona	1%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	0,5%
Agar	1,5%

**YPD**

Extrato de levedura	1%
Peptona	2%
Dextrose	2%

**YPDS agar**

Extrato de levedura	1%
Peptona	2%
Dextrose	2%
Sorbitol	1 M
Agar	2%

**BMGY**

Extrato de levedura	10 g
Triptona	20 g
Fosfato de potássio	100 mL
YNB	100 mL
500X Biotina	2 mL
Glicerol 1:10	100 mL
H <sub>2</sub> O destilada	1 L

**BMMY**

Extrato de levedura	10 g
Triptona	20 g
Fosfato de potássio 1 M	100 mL
YNB	100 mL
500X Biotina	2 mL
Metanol 1:20	100 mL
H <sub>2</sub> O destilada	1 L

**YNB**

YNB	134 g
H <sub>2</sub> O destilada	1 L

**Fosfato de Potássio 1 M**

K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M	132 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M	868 mL

**Metanol 1:20**

H <sub>2</sub> O destilada autoclavada	95 mL
Metanol	5 mL

**Glicerol 1:10**

H <sub>2</sub> O destilada autoclavada	900 mL
Glicerol	100 mL

**500x Biotina**

Biotina	20 mg
H <sub>2</sub> O destilada	100 mL

Esterilizar por filtração com membrana de 0,22 µm

- **Antibióticos**

**Ampicilina**

50 mg/mL

Dissolver em água Milli-Q

Esterilizar por filtração com membrana de 0,22 µm

**Canamicina**

50 mg/mL

Dissolver em água Milli-Q

Esterilizar por filtração com membrana de 0,22 µm

**Zeocina**

25 mg/mL

Dissolver em água Milli-Q

Esterilizar usando filtro de 0,22 µm

**Anexo A**

Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA-UFRGS



## CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 25551

Título: UFRGS, UENF e INTA: pesquisa e formação de recursos humanos na área de genômica de artrópodes

Pesquisadores:

**Equipe UFRGS:**

ITABAJARA DA SILVA VAZ JUNIOR - coordenador desde 01/12/2013

CARLOS TERMIGNONI - pesquisador desde 01/12/2013

MARIANA LONER COUTINHO - pesquisador desde 01/12/2013

LUIS FERNANDO PARIZI - Aluno de Doutorado desde 01/12/2013

Magnus Larruscaim Dalmolin - Aluno de Mestrado desde 01/12/2013

Aline Domingues Schuler - Aluno de Mestrado desde 01/12/2013

DAIANE PATRICIA OLDIGES - Aluno de Doutorado desde 01/12/2013

Lucas Tirloni - Aluno de Doutorado desde 01/12/2013

Gabriela Alves Sabadin - Aluno de Mestrado desde 01/12/2013

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 5 bovinos Linhagem/Cepa Hereford, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.***

Porto Alegre, Quinta-Feira, 26 de Dezembro de 2013

STELA MARIS KUZE RATES  
Coordenador da comissão de ética

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 21260

**Título:** Programas de Pós-graduação da UFRGS, UENF, FIOCRUZ e UFRJ: Estímulo a formação de recursos humanos em parasitas e vetores

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

ITABAJARA DA SILVA VAZ JUNIOR - coordenador desde 01/07/2011  
CARLOS TERMIGNONI - pesquisador desde 01/07/2011  
ADRIANA SEIXAS - Pós-Doutorado desde 01/07/2011  
LUIS FERNANDO PARIZI - Aluno de Doutorado desde 01/07/2011  
PAULA CRISTIANE POHL - Aluno de Doutorado desde 01/07/2011

**Equipe Externa:**

Pedro L Oliveira - pesquisador desde 01/07/2011  
Gabriela Paiva-Silva - pesquisador desde 01/07/2011  
Marcos F Sorgine - pesquisador desde 01/07/2011  
Marcus F Oliveira - pesquisador desde 01/07/2011  
Katia C Gondim - pesquisador desde 01/07/2011  
Georgia C Atella - pesquisador desde 01/07/2011  
Mario AC Silva-Neto - pesquisador desde 01/07/2011  
Hatisaburo Masuda - pesquisador desde 01/07/2011  
Carlos Logullo - pesquisador desde 01/07/2011  
Fernando Ariel Genta - pesquisador desde 01/07/2011

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 26 bovinos linhagem Hereford (machos e fêmeas, seis meses), de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.***

Porto Alegre, Quarta-Feira, 25 de Julho de 2012

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO  
Coordenador da comissão de ética



**U F R G S**

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética Na Utilização De Animais



## **CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética Na Utilização De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 19587

**Título:** Desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato: Caracterização da imunogenicidade da paramiosina de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

ITABAJARA DA SILVA VAZ JUNIOR - coordenador desde 01/09/2010

CARLOS TERMIGNONI - pesquisador desde 01/09/2010

AOI MASUDA - pesquisador desde 01/09/2010

ADRIANA SEIXAS - pesquisador desde 01/09/2010

***Comissão De Ética Na Utilização De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.***

Porto Alegre, Sexta-Feira, 29 de Outubro de 2010

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO  
Coordenador da comissão de ética





Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria Acadêmica  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [proacad@pucrs.br](mailto:proacad@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br/proacad](http://www.pucrs.br/proacad)