

**CARLA LEITE MEDEIROS**

**VACINA DE DNA UTILIZANDO GENES SINTÉTICOS DERIVADOS DO PEPTÍDEO  
SBm7462 CONTRA O CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E  
AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS Balb/c**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008**

**CARLA LEITE MEDEIROS**

**VACINA DE DNA UTILIZANDO GENES SINTÉTICOS DERIVADOS DO PEPTÍDEO  
SBm7462 CONTRA O CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E  
AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS Balb/c**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de maio de 2008.

---

Prof<sup>a</sup>. Marlene Isabel Vargas Vilorio  
(Co-orientador)

---

Prof. Sérgio Oliveira de Paula  
(Co-orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Márcia Rogéria de A. Lamêgo

---

Prof<sup>a</sup>. Juliana Lopes Rangel Filho

---

Prof. Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo  
(Orientador)

“Os dias prósperos não vêm por acaso  
nascem de muita fadiga e persistência.”

(Henry Ford)

“A vitória não está no destino final e sim na  
luta pelo caminho.”

(Aurora Controvertida)

## AGRADECIMENTOS

A *Deus* que esteve presente em todos os momentos da minha vida, principalmente nas horas que mais precisava; e a ele por ter colocado boas pessoas no meu caminho para me apoiar e ajudar neste percurso.

Aos que me ensinaram a nunca desistir sem tentar, ao amor, ao carinho, a paciência e ao respeito que sempre me dedicaram, meus amados pais, *Luiz e Cláudia*;

A minha irmã, *Mariana*, pelos alertas e conselhos, que sempre me incentivaram.

Ao meu noivo, *Guilherme*, por me confortar, ajudar a suportar a distância e me apoiar em todos os momentos com muito carinho, amor e dedicação.

A minhas tias, *Neuza e Silvia*, pelo carinho e atenção, além dos quitutes deliciosos que, por vezes, me supriam à falta da família querida.

A Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Veterinária e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) por contribuírem na formação científica.

Aos meus professores *Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo e Marlene Isabel Vargas Vilorio* pela valiosa orientação e amizade em todo tempo.

Ao Prof. *Sérgio Oliveira de Paula* pelas valiosas sugestões e por estar sempre disposto a ajudar. E a Carol, sua estudante de iniciação científica, quem muito me auxiliou.

À professora *Tânia Toledo*, por ter gentilmente cedido seu laboratório à permanência dos camundongos.

Ao pesquisador Marco Antônio Machado (EMPRAPA- Gado de Leite) e todo seu laboratório que me deram grande auxílio durante o seqüenciamento de minhas amostras.

Ao *Marcinho* pela amizade e a assessoria técnica nos momentos de dificuldade, pelas famosas “gambis”.

Ao amigo *Sidimar* pelos conselhos e sugestões em toda a caminhada.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV - BIOAGRO): *Ana Paula, Anna Paula, Carlos, Fabrício, Karlos, Letícia, Marina e Gabriel*, pela colaboração e principalmente pela amizade.

As minhas estagiárias e amigas, *Flavinha, Larissa e Bianca*, por toda a dedicação.

Ao Laboratório de Infectologia Molecular Animal/ BIOAGRO/ UFV, principalmente, a professora Márcia Rogéria e ao Abelardo.

A amizade e companheirismo da minha segunda família, as meninas da República: *Ana Paula, Cristina, Deisy e Susana*.

A grande amiga Isabel por seus sorrisos cheios de luz.

À Rose pela valiosa ajuda e disposição em todo momento.

A todos os amigos cuja presença e convívio fortaleceram a concretização do meu ideal, tornando mais agradável o trabalho realizado.

## BIOGRAFIA

Carla Leite Medeiros nasceu em 07 de fevereiro de 1982, na cidade de Três Rios, no estado do Rio de Janeiro.

Concluiu o ensino fundamental em 1992, no Colégio Santo Antônio e o ensino médio no Colégio Ruy Barbosa, em 1999, ambos em Três Rios - RJ.

Em Março de 2001, ingresso no curso de Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG, finalizando-o em maio de 2006. Iniciou-se na pesquisa como estagiária no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/ Bioagro/ UFV, em maio de 2003. De Janeiro de 2004 a Janeiro de 2005, obteve sua primeira bolsa de iniciação científica pelo programa PIBIC/CNPQ (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica) com o projeto “Identificação e Purificação de Proteínas Antigênicas de *Neospora caninum* para Elaboração de Testes de Dot-ELISA e ELISA Utilizados no Diagnóstico Sorológico da Neosporose.”. Prosseguiu de Fevereiro de 2005 a Julho de 2005 com o projeto “Controle de *Boophilus microplus* e de *Babesia bovis* em bovinos pela aplicação simultânea dos imunógenos sintéticos SBm 7462, SBbo 23290 e de um imunógeno polivalente composto pelos mesmos.”, ambos no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/Bioagro/UFV sob a orientação do Prof. Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo.

Durante os meses de julho à dezembro de 2005 fez seu estágio curricular supervisionado na EMBRAPA - Gado de Leite, em Juiz de Fora, Minas Gerais, na área de Reprodução Animal, sob orientação do pesquisador da Dr. Luís Sérgio Camargo e do professor da UFV, Eduardo Paulino da Costa.

Em maio de 2006 ingressou no Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, pelo Departamento de Medicina Veterinária.

## SUMÁRIO

|   |     |
|---|-----|
| LISTA DE FIGURAS .....  | vii |
| LISTA DE TABELAS .....  | ix  |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....   | x   |
| RESUMO .....  | xi  |
| ABSTRACT .....  | xii |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 1   |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....  | 3   |
| 2.1. O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e sua importância ..... | 3   |
| 2.2. Vacinas anti <i>R. (B.) microplus</i> .....                                    | 5   |
| 2.3. A vacina Sintética SBm7462 .....   | 6   |
| 2.4. Vacinas de DNA .....   | 8   |
| 2.4.1. Vantagens e desvantagens do uso de vacinas de DNA .....                      | 9   |
| 2.4.2. Classificação e Composição de uma vacina de DNA .....                        | 11  |
| 2.4.3. Mecanismo de Ação .....  | 12  |
| 2.4.4. Fatores que determinam a imunogenicidade de uma vacina de DNA .....          | 14  |
| 3. OBJETIVOS .....  | 17  |
| 3.1. GERAL .....  | 17  |
| 3.2. ESPECÍFICOS .....  | 17  |
| 4. MATERIAS E MÉTODOS .....   | 18  |
| 4.1. Local do Estudo .....  | 18  |
| 4.2. Animais .....  | 18  |
| 4.3. Desenho e Síntese do Gene .....  | 19  |
| 4.4. Esquema dos Vetores utilizados .....   | 20  |
| 4.5. Produção do vetor pSC-A com o inserto e extração do DNA plasmidial .....       | 21  |
| 4.6. Isolamento do seq 1 do vetor pSC-A .....                                       | 22  |
| 4.7. Purificação dos fragmentos de DNA em gel de agarose .....                      | 23  |
| 4.8. Abertura do vetor pCIneo com as enzimas de restrição XhoI e EcoRI ..           | 23  |
| 4.9. Construção do cassete de expressão .....                                       | 24  |
| 4.10. Triagem bacteriana por PCR para pCIneo1 transformante .....                   | 24  |
| 4.11. Crescimento bacteriano em meio líquido e estoque dos clones .....             | 25  |
| 4.12. Extração de DNA plasmidial para posterior seqüenciamento das amostras .....   | 26  |

|  |    |
|--|----|
| 4.13. Seqüenciamento das amostras .....  | 26 |
| 4.14. Transfecção de células VERO .....  | 28 |
| 4.15. DOT- ELISA para avaliação de células VERO transfectadas .....                          | 28 |
| 4.16. Ensaio de Peroxidase-anti-peroxidase (PAP) .....                                       | 29 |
| 4.17. Produção de DNA plasmidial .....   | 30 |
| 4.18. Esquema de vacinação.....  | 30 |
| 4.19. Coletas de Sangue .....  | 31 |
| 4.20. Mensuração de Anticorpos totais por ELISA .....  | 32 |
| 4.21. Inserção do códon de iniciação .....   | 33 |
| 4.22. Clonagem de Fragmentos no pGEM® - T Easy Vector .....                                  | 34 |
| 4.23. Triagem bacteriana por PCR para transformantes pGEM® - T Easy Vector + seq1 .....      | 35 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 37 |
| 5.1. Digestão dos plasmídeos por endonucleases de restrição.....                             | 37 |
| 5.2. Triagem de colônias positivas por PCR.....  | 38 |
| 5.3. Seqüenciamento do cassete de expressão (pCIneo 1) .....                                 | 38 |
| 5.4. Verificação da expressão do peptídeo SEQ1 in vitro.....                                 | 39 |
| 5.5. Avaliação dos títulos de anticorpos anti SEQ1 e anti o peptídeo sintético SBm7462 ..... | 41 |
| 5.6. Inserção do códon de iniciação .....  | 45 |
| 5.7. Alternativas futuras .....  | 50 |
| 6. CONCLUSÕES .....  | 56 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 57 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Diagrama mostrando os típicos fatores de um vetor plasmidial para uso como vacina de DNA.....           | 12 |
| <b>Figura 2.</b> Esquema de 4 possíveis vias de processamento do antígeno em células dendríticas .....                   | 13 |
| <b>Figura 3.</b> Estrutura do gene proposto e sua respectiva proteína .....  | 19 |
| <b>Figura 4.</b> Mapa dos vetores utilizados.....  | 21 |
| <b>Figura 5.</b> Esquema cronológico de imunizações e coletas de sangue.....   | 32 |
| <b>Figura 6.</b> Construção dos primers para inserção da mutação .....   | 33 |
| <b>Figura 7.</b> Gel de agarose 1%, mostrando a clivagem da seq 1 e o vetor de expressão pCI-neo.....                    | 36 |
| <b>Figura 8.</b> Gel de agarose 0,8% da PCR de 16 colônias transformadas ...   | 37 |
| <b>Figura 9.</b> Seqüência nucleotídica resultante do seqüenciamento do cassete de expressão .....                       | 38 |
| <b>Figura 10.</b> Comparação das seqüências aminoacídicas desenhada e seqüenciada .....                                  | 38 |
| <b>Figura 11.</b> Resultado do DOT- ELISA 48h após a transfecção da células VERO .....                                   | 39 |
| <b>Figura 12.</b> Resultado do teste de PAP 48h após a transfecção das células VERO .....                                | 40 |
| <b>Figura 13.</b> Comparação dos valores de absovância nas três coletas realizadas em cada um dos grupos vacinados ..... | 42 |
| <b>Figura 14.</b> Comparação dos valores de absovância entre coletas descontando o valor da absorvância branca .....     | 43 |
| <b>Figura 15.</b> Comparação dos valores de absovância entre grupos descontando o valor da absorvância branca .....      | 43 |
| <b>Figura 16.</b> Gel de agarose 0,8% com as PCRs feitas com os primers 1 e T3 .....                                     | 45 |
| <b>Figura 17.</b> Gel de agarose 0,8% com as PCRs feitas com os primers 2 e T3.....                                      | 45 |
| <b>Figura 18.</b> Gel de agarose 0,8% com as PCRs feitas com os primers 3 e T3.....                                      | 46 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 19.</b> Gel de agarose 0,8% com as PCRs feitas com os primers 4 e T3 .....   | 46 |
| <b>Figura 20.</b> Gel de agarose 1% com a PCR de 4 colônias brancas transformadas com pGem+seq1 teoricamente mutada .....          | 47 |
| <b>Figura 21.</b> Seqüenciamento do pGem com a seq1 teoricamente mutada e seqüência 1 esperada, com ATG inserido corretamente..... | 48 |
| <b>Figura 22.</b> Estrutura dos gene A e B otimizados para bovinos com sua tradução em proteína .....                              | 52 |
| <b>Figura 23.</b> Comparação de nucleotídeos do seq1 atual (1) e do gene A proposto (1 ATG) com códon otimizados para bovinos..... | 53 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos utilizados nas PCR para verificar pCIneo 1 transformantes.....  | 25 |
| <b>Tabela 2.</b> Esquema de inoculação nos camundongos .....   | 31 |
| <b>Tabela 3.</b> Primers criados para a inserção da mutação .....  | 34 |
| <b>Tabela 4.</b> Comparação das médias de absorvância óptica (492nm) obtidas no ELISA indireto para os grupos I, II, III, IV e V vacinados.....  | 42 |
| <b>Tabela 5.</b> Comparação das médias de absorvância óptica (492nm) obtidas no ELISA indireto descontando o valor do branco de cada coleta para todos os grupos vacinados.....                                | 43 |
| <b>Tabela 6.</b> Frequência das trincas mais usadas em CDS para: <i>Pichia pastoris</i> , <i>Bos taurus</i> e <i>Mus musculus</i> . .....  | 50 |
| <b>Tabela 7.</b> Comparação entre as porcentagens de ocorrência de CG em <i>Pichia pastoris</i> , <i>Bos taurus</i> e <i>Mus musculus</i> , no genoma e em cada posição das letras dos códons utilizados ..... | 51 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|             |   |
|-------------|---|
| <i>seq1</i> | Seqüência nucleotídica de 438pb construída no LBCHV, sintetizada pela Entelecon (Alemanha) e utilizada como inserto |
| SEQ1        | Seqüência aminoacídica derivada da <i>seq1</i>  |
| pCIneo      | Vetor de expressão em mamíferos   |
| pCIneo1     | Vetor de expressão em mamíferos com a <i>seq1</i> inserida (cassete de expressão)                                   |
| pSC-A       | Vetor de clonagem no qual a <i>seq1</i> veio inserida   |
| Gene A      | Seqüência nucleotídica baseada na <i>seq1</i> com códons otimizados para bovinos                                    |
| Gene B      | Seqüência nucleotídica baseada na <i>seq1</i> com códons otimizados para bovinos mais uma seqüência Kozak           |

## RESUMO

MEDEIROS, Carla Leite M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2008.

**Vacina de DNA utilizando genes sintéticos derivados do peptídeo SBm7462 contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e avaliação da resposta imune em camundongos Balb/c.** Orientador: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Co-orientadores: Marlene Isabel Vilória Vargas e Sérgio Oliveira de Paula.

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um dos mais importantes artrópodes em medicina veterinária devido perdas econômicas e problemas de saúde causados na produção de gado na América Central e do Sul, bem como na Austrália. Como alternativa ao controle químico, a imunização de bovinos com antígeno proteico Bm86 induz uma resposta imune protetora. Um peptídeo sintético, SBm 7462, derivado da Bm86, tem obtido excelentes resultados no controle de carrapatos. A construção e síntese de uma sequência nucleotídica baseada neste peptídeo podem ser útil para o desenho de uma vacina de DNA que tem muitas vantagens sob uma vacina sintética. Um gene, denominado seq1, foi construído repetindo três vezes a sequência nucleotídica do SBm 7462. Ele foi clonado no vetor de expressão em mamíferos, pCIneo, transfectado em células VERO e injetado em camundongos BALB/c. Dois métodos foram usados para análise da expressão do peptídeo *in vitro*: DOT –ELISA e PAP. Em ambos, os resultados demonstraram que a seqüência nucleotídica (seq1) não havia sido expressa em células VERO. *In vivo*, quando camundongos foram inoculados com o cassete de expressão eles não responderam ao ELISA. Eles elevaram os títulos de anticorpos, apenas, quando inoculados com o peptídeo sintético SBm 7462. Os melhores títulos de imunoglobulinas foram vistos quando o SBm 7462 foi administrado subcutâneamente. Após isso, inserimos uma mutação no início do seq 1, porém, o sequenciamento demonstrou que nenhum códon de iniciação (ATG) tinha sido inserido.

## ABSTRACT

MEDEIROS, Carla Leite M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2008. **DNA vaccine using syntetic gene derivate of peptide SBm 7462 anti-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and assessment of immune response in Balb/c mouse.** Adviser: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Co- Advisers: Marlene Isabel Vilória Vargas and Sérgio Oliveira de Paula.

The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is one of the most important arthropods in veterinary medicine due economic losses and health problems caused in cattle production, mainly in Central and South America, as well as in Australia. As an alternative to chemical control, immunization of bovines with Bm86 antigen to induce a protective immune response. A synthetic peptide, SBm 7462, derived from Bm86, has been shown great results in control of ticks. The construction and synthesis of one nucleotide sequence based on this peptide might be useful for design a DNA vaccine that has many advances than peptide vaccine. A gene, called seq1, was constructed with a three repetition of nucleotide sequence of SBm 7462. It was cloned into a pCIneo vector expression in mammals, transfected in VERO cells and injected in BALB/c mouse. Two methods were used to analysis of peptide expression *in vitro*: DOT –ELISA and PAP. In both, the results showed that the nucleotide sequence (seq1) had not been express in VERO cells. *In vivo*, when mice were inoculated with the expression cassette they did not response in ELISA. They elevated antibody titles only when vaccinated with the syntetic peptide SBm 7462. And, the best titles of immunoglobulins were seen when the SBm 7462 was administered subcutaneously. After that, we insert a mutation at the begging of seq1, but, the sequenciament demonstrated that any initiation codon (ATG) had been inserted.

## 1. INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o parasita de maior impacto econômico na pecuária do Brasil e dos países com clima tropical e subtropical. Ele está presente entre os paralelos 32°N e 32°S. Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), os prejuízos causados pela infestação por carrapatos e as doenças, por eles transmitidas, ultrapassam sete bilhões de dólares anuais. Recentemente, estudos realizados por GRISI *et al* (2002) indicaram, somente no Brasil, prejuízos da ordem de 2 bilhões de dólares anuais. Se considerarmos apenas as vendas realizadas pelas Indústrias de Medicamentos Veterinários pode-se dimensionar com clareza os efeitos das parasitose sobre os sistemas de produção (DOMINGUES *et al.*, 2008). Foram vendidos, só no ano de 2006, R\$ 780 088 405,00 de produtos antiparasitários (SINDAN, 2006), dos quais, os ecto parasiticidas representavam 12,4% desse total, o que equivale R\$ 96 730 962,22.

A demanda por vacinas parasitárias em saúde animal é crescente, e empresas remetem lucros acima de três bilhões de dólares somente nesse setor (DALTON e MULCAHY, 2001). O avanço das técnicas de biologia molecular providencia ferramentas para compreender muitas questões biológicas, sendo esses métodos aplicados em várias linhas de pesquisa na área de parasitologia veterinária (SANGSTER, 2001). O sucesso na prevenção e controle de doenças parasitárias advém do melhor conhecimento das interações parasita-hospedeiro e também de estudos nas áreas da genômica, proteômica e bioinformática, além dos avanços nas áreas da engenharia genética (PRICHARD e TAIT, 2001).

A vacina sintética anti *R. (B.) microplus* (SBm 7462), patenteada no Brasil, USA, México, Austrália e a União Européia, é uma vacina eficiente desenhada a

partir da seqüência da proteína intestinal de *R. (B). microplus* denominada Bm86, com média de 80% de eficiência na redução de carrapatos (PATARROYO *et al.*, 2002). Porém, existem no mundo apenas seis centros especializados na síntese química de peptídeos em escala industrial. Esse empecilho oneraria a produção e envio de grandes quantidades de peptídeo em curtos espaços de tempo, o que, certamente, acarretariam problemas de distribuição dessa vacina entre os inúmeros potenciais mercados consumidores. Para suprir essa necessidade, em curto prazo, vemos como uma das alternativas viáveis, o desenvolvimento de uma vacina de DNA, na qual a produção do antígeno seria feita pelo próprio hospedeiro (via endógena), de modo eficiente e mais barato.

Nosso intuito, neste trabalho, foi testar um gene sintético já construído e atualmente testado em levedura *Pichia pastoris* que codifica o peptídeo SBm7462 para a utilização deste como vacina de DNA contra o carrapato. Além disso, estudar a resposta imunológica humoral conferida pelo imunógeno em camundongos Balb/C inoculados com o mesmo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e sua importância

Trabalhos moleculares para estudo de filogenia têm demonstrado que o gênero *Boophilus* é parafilético com os carrapatos do gênero *Rhipicephalus* o que leva alguns autores a proporem uma mudança de classificação, passando de *Boophilus microplus* para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BARKER e MURRELL, 2004; MURRELL *et al.*, 2000; MURRELL *et al.*, 2001). Dessa maneira, taxonomicamente, o novo status do carrapato *B. microplus* pode ser classificado da seguinte forma, conforme (HORAK *et al.*, 2002):

Filo: Arthropoda

Classe: Arachnida

Ordem: Acari

Subordem: Metastigmata

Família: Ixodidae

Subfamília: Rhipicephalinae

Gênero: *Rhipicephalus*

Espécie: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Estudos recentes, também, tendo como fundamentos análises filogenéticas, levam a crer que a origem dos carrapatos da subfamília *Rhipicephalinae* tenham sido na região Afro-tropical e/ou Afro-oriental (BARKER e MURRELL, 2002). Mesmo o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* não tendo sua origem no continente americano se encontra amplamente distribuído pelo Brasil, norte da Argentina, Paraguai, Uruguai, leste da Bolívia, Colômbia e Venezuela. No

Brasil, destacam-se às regiões Sudeste e Centro-Oeste e toda a costa brasileira, obviamente pelas boas condições de umidade e temperatura e pela exploração pecuária mais intensa. (ESTRADA-PEÑA, 1999; ESTRADA-PENÃ *et al.*, 2006).

A estrutura histológica intestinal do *R. (B.) microplus* é constituída por uma membrana basal coberta de fibras musculares longitudinais e circulares (HERNÁNDEZ *et al.*, 1997). As células digestivas intestinais promovem a endocitose de componentes do sangue e grandes quantidades de heme são armazenadas no hemossomo, o heme é liberado durante a digestão da hemoglobina e está envolvido em catalises nas reações de redox. O heme possui sua toxicidade inibida por uma lipoproteína de ligação do heme (*heme-binding lipoprotein* – HeLp), podendo dessa forma, ser reutilizada pelo carrapato (GRAÇA-SOUZA *et al.*, 2006; LARA *et al.*, 2005; MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2004).

Os prejuízos causados pelo *R. (B.) microplus* à pecuária nacional são de ordem direta e indireta. Os primeiros remetem para animais com perda de peso, baixa conversão alimentar, lesão da pele, perdas na qualidade do couro com desvalorização do mesmo, baixa considerável à produção de vacas leiteiras, liberação de toxinas no hospedeiro, entre outros. Foi calculado que cada fêmea ingurgitada é responsável por uma redução de aproximadamente 1,37g de peso dos bovinos (JONSSON, 2006). O mesmo autor ainda relata anemia, supressão do apetite e alteração no metabolismo como conseqüências da perda de produção devido à infestação de *R. (B.) microplus*. Nos prejuízos por danos indiretos, as maiores preocupações, sem dúvida, estão relacionadas com a transmissão dos agentes patogênicos da “babesiose” ou “tristeza parasitária bovina” (*Babesia bovis* e *B. bigemina*). Tendo, também, participação na epidemiologia de *Anaplasma marginale* (PATARROYO, 1994; RUIZ *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 1998). Ainda com relação a prejuízos, estima-se que os custos globais com carrapatos e doenças por eles transmitidas esteja na casa de US\$ 7 x 10<sup>9</sup> (JONGEJAN e UILENBERG, 2004).

O controle de carrapatos, ainda, repousa, principalmente, na utilização de drogas carrapaticidas que são responsáveis pela seleção de populações resistentes (GEORGE *et al.*, 2004). Outro problema com o uso de acaricidas é a contaminação com resíduos na carne, leite e derivados e no meio ambiente. Tudo isso aponta para

a necessidade de pesquisas de métodos alternativos, seguros e eficientes de controle, os quais possam atuar de modo integrado (WILLADSEN, 2006).

## **2.2. Vacinas anti *R. (B.) microplus***

Entre as diversas vantagens do uso de vacinas pode-se destacar: uma ação mais sustentável, são ecologicamente corretas, são mais espécie-específica, podem ter um custo menor de produção, de fácil administração e minimização das chances de ocorrer problemas com resistência (WILLADSEN, 2004).

Há mais de 70 anos que a imunidade contra infestações de carrapatos é induzida por vacinação com uma variedade de materiais antigênicos, incluindo macerados de todo o carrapato, extratos das glândulas salivares, material intestinal, cutículas, entre outros (WILLADSEN, 2004). Existem, atualmente, pelo menos duas correntes para estudo e produção de vacinas para controle de carrapatos (NUTTALL *et al.*, 2006). A primeira investiga séries complexas de reações fisiológicas e imunológicas de interação carrapato - hospedeiro. Para isto, utiliza antígenos de glândulas salivares e de partes do aparelho bucal, denominados antígenos expostos. Uma segunda corrente procura por efeitos que estimulam interações imunológicas que não ocorram como resultado de infestações naturais. Essas interações podem ser com antígenos que não são expostos ao hospedeiro como resultado do parasitismo natural. Estes antígenos são normalmente designados “concealed antigens” ou antígenos ocultos (WILLADSEN e JONGEJAN, 1999). Alguns autores relatam, ainda, o uso de antígenos expostos com reações cruzadas à antígenos ocultos. Estes combinam as características dos dois tipos de antígenos anteriores, por exemplo, a versão recombinante da proteína 64P de *R. appendiculatus* (DE LA FUENTE e KOCAN, 2006).

WILLADSEN *et al.* (1989) isolaram uma glicoproteína, de 89.000 Da de peso molecular e ponto isoelétrico entre 5,1 a 5,6, da membrana intestinal de uma amostra de *R. (B.) microplus* australiana (Yeerongpilly) e denominaram essa proteína de Bm86, estando presente em larvas, ninfas e adultos. OLIVEIRA (1998) determinou que a Bm86 se localiza, mais precisamente, nas microvilosidades da membrana das células epiteliais do intestino, sendo altamente concentrada próximo à membrana basal. É uma molécula de 650 aminoácidos com potenciais sítios de

glicosilação. O gene *bm86* possui 2225 nucleotídeos. Especula-se que sua função esteja relacionada com a endocitose.

Hoje, já faz mais de uma década que a primeira vacina comercial contra o *R. (B.) microplus* foi liberada. Foi em 1994, na Austrália, que utilizando clonagem do gene *bm86* em *Escherichia coli* foi produzida a proteína recombinante Bm86 (rBm86), que deu origem a TickGARD® (Hoeschst Animal Health, Austrália). Subsequentemente, em 1996, denominada TickGARD Plus®, devido a troca de adjuvante (SMITH *et al.*, 1995; WILLADSEN, 1997). Com base no mesmo antígeno foi formulada em Cuba, também em 1994, a vacina Gavac® (Heber Biotec AS, Havana, Cuba) e Gavac Plus®, produzida em *Pichia pastoris* (GARCIA-GARCIA *et al.*, 1998). A eficácia destas vacinas tem variado entre 50 e 91%. Esses valores são avaliados pela redução da viabilidade e do número de ovos, consequentemente diminuindo o número de carrapatos nas gerações subsequentes, tendo todos os estágios de desenvolvimento comprometidos (DE LA FUENTE *et al.*, 2007). Alterações histológicas do trato digestivo do *R. (B.) microplus* pela ação de anticorpos anti-rBm86 também já foram avaliados por HERNÁNDEZ *et al.* (1997), que observaram as destruições de células digestivas, secretoras e basofílicas, além de erosão e ruptura da parede intestinal e extravasamento do conteúdo digestivo para a cavidade celomática.

O isolamento geográfico de cepas de *R. (B.) microplus* pode levar a diferenças genéticas e fisiológicas, remetendo a uma resposta negativa ao controle pela vacinação (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 1999). Existindo, portanto, sempre a constante busca por um imunógeno ou a combinação de antígenos que cubram o maior número possível de populações, protegendo o rebanho das infestações por *R. (B.) microplus*. A proteína Bm95 (2225 nucleotídeos), com função homóloga a Bm86, isolada, a partir, gene *bm95* de uma população de carrapatos argentinos (cepa A), foi utilizada como vacina recombinante, controlando a população de *R. (B.) microplus* que era resistente a rBm86 (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000).

### **2.3. A vacina Sintética SBm7462**

Baseados na proteína Bm 86 e fazendo uso de ferramentas matemáticas, pesquisadores do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e

Vetores/BIOAGRO/Departamento de Veterinária/ Universidade Federal de Viçosa – MG desenharam três seqüências peptídicas denominadas 4822 (aa. 398 – 411), 4823 (aa. 21 – 35) e 4824 (aa. 132 – 145). Os números dos peptídeos foram dados de acordo com sua catalogação no livro de seqüências do Instituto de Imunologia Del Hospital San Juan de Dios em Bogotá – Colômbia, onde foram sintetizados. A junção destas seqüências de aminoácidos em diferentes ordens levou a construção de três peptídeos distintos (SBm 4912, SBm 19733 e SBm7462). No entanto, de acordo com PORTELA (2000) o peptídeo designado SBm 7462 composto pelas seqüências 4822 – 4824 – 4823, nesta ordem, somando 43 aminoácidos, foi o que apresentou maior eficácia final, quando analisados todos os fatores biológicos de teleóginas, ovos e larvas. O peptídeo sintético SBm 7462 foi a primeira vacina sintética contra o *R. (B.) microplus* patenteada tendo sua eficiência comprovada, em vários testes:

A eficácia vacinal mostrou-se satisfatória (81,05%) na redução do número de carrapatos, promovendo imunidade de rebanho e não apenas individual (PATARROYO *et al.*, 2002). Testes a campo da vacina mostraram aumento do título de anticorpos específicos, redução do número de teleóginas, da taxa de ovoposição, da relação peso das larvas/peso dos ovos, do peso dos ovos, das teleóginas e da fertilidade dos ovos, alcançando uma eficiência final de 53,29% para o grupo vacinado com 2,0 mg do peptídeo SBm7462 (COUTO-PIMENTEL, 2002).

GONZÁLEZ LOMBANA (2003) demonstrou que o SBm7462 estimulou a produção de uma resposta imune com predominância estatisticamente diferente do isotipo IgG1 sobre o isotipo IgG2. Os mecanismos induzidos foram similares ao de uma proteína integra recombinante ou natural, inclusive conferindo imunidade protetora (PATARROYO e GONZÁLEZ-LOMBANA, 2004).

Estudos em camundongos BALB/c inoculados com o peptídeo sintético SBm7462 associado ao adjuvante saponina e a PLGA (polylactideco-glycolide) mostraram que a associação peptídeo/saponina apresentou resposta celular mais precoce que a associação com PLGA. Dessa maneira, a saponina parece, melhor, potencializar a resposta imune do peptídeo SBm7462 (SALES-JUNIOR *et al.*, 2005).

Além disso, pesquisas realizadas por PATARROYO *et al.* (2002), demonstraram, também, que a porção 4824 é a mais hidrofílica do peptídeo vacinal SBm7462, sendo a responsável pela maior produção dos anticorpos IgG1 protetores dessa vacina. Por conta disso, SOSSAI (2004) através de estudos de polimorfismos

de DNA determinou que a porção 4824 mostrava-se conservada entre populações de *R. (B.) microplus* brasileiras, argentinas, colombianas, uruguaias e venezuelanas, o que deixa o imunógeno SBm7462 em situação de ser utilizado universalmente em todas as populações de *R. (B.) microplus*. Após alinhamento entre as proteínas Bm86 e Bm95 foi observado que apenas duas mudanças ocorrem dentro das seqüências que constituem a SBm7462. Acredita-se que essas seqüências se mantiveram conservadas durante a evolução deste parasito (SOSSAI *et al.*, 2005). Confirmando esse parecer de antígeno universal, PECONICK *et al.* (2008) demonstraram haver conservação nas porções 4822 e 4823 do peptídeo sintético SBm 7462.

#### **2.4. Vacinas de DNA**

Com as recentes descobertas na genômica, biotecnologia, imunologia e do reconhecimento da importância da multidisciplinaridade tem se aumentado drasticamente o potencial para o desenvolvimento de vacinas. E, embora, imunizações possam ser feitas de muitas formas, a mais recente adição ao armamentário da imunização envolve o DNA ou imunização gênica (LITTEL-van den HURK *et al.*, 2001).

Vacinas de DNA são os mais novos tipos de vacinas de subunidades, que permitem a expressão de proteínas em tecidos animais após a introdução de um plasmídeo ou um vetor viral, codificando o antígeno protetor selecionado (IVORY e CHADEE, 2004). Há mais de 40 anos atrás, ITO (1960) já relatava o princípio de uso de DNA “naked” para transfectar células de mamíferos *in vivo*. Contudo, o potencial uso do DNA como vacina não tinha sido relatado até mais recentemente. A descoberta de que o DNA viral “puro” quando injetado em camundongo poderia produzir níveis significantes de proteínas virais foi um fortuito (COHEN, 1993). Esse princípio foi confirmado por WOFF *et al.* (1990), que demonstraram que a injeção intramuscular de DNA plasmidial contendo um gene “reporter” levou a expressão de proteínas “repórter” ativas, no músculo esquelético de camundongos, por mais de 60 dias após a imunização. A habilidade de proteínas expressadas por DNA plasmidial *in vivo* para elicitar uma resposta imune protetora no hospedeiro foi subsequentemente estabelecida usando um modelo de influenza em camundongos

(ULMER *et al.*, 1993). A partir de então, muito se tem pesquisado por vacinas de DNA para diversos patógenos tanto na medicina humana como na veterinária. Na medicina veterinária, são vários os trabalhos em: aves, suínos, bovinos; ovelhas, patos, peixes e animais de companhia (BABIUK *et al.*, 1999; CRAMPTON e VANNIASINKAM, 2007; DUNHAM, 2002; KRISHMAN, 2000; LITTEL-van den HURK *et al.*, 2000). Em 2005, duas vacinas de DNA foram licenciadas com aplicações na saúde animal, uma contra West Nile vírus (WNV) em cavalos e outra contra vírus de infecções hematopoiéticas necróticas (IHNV) em salmão (ULMER *et al.*, 2006).

#### **2.4.1. Vantagens e desvantagens do uso de vacinas de DNA**

A base para o mercado de vacinas é o desenvolvimento de respostas imunes a imunógenos presentes em uma vacina, mas não a outros antígenos do patógeno. Essa é uma das vantagens das vacinas de DNA, é direcionada contra uma única proteína. Desde que ela contenha um único gene, não há oportunidade para indução de uma infecção ou doença subclínica pela vacinação, porque há a produção de uma única proteína imunogênica. Dessa forma, é possível o desenvolvimento de testes de diagnósticos que diferenciem animais vacinados daqueles que foram, apenas, expostos ao patógeno (van OIRSCHOT *et al.*, 1996).

Outra vantagem é que a produção do imunógeno é endógena, desde que o animal atue como um bioreator não há necessidade de processamento da vacina após a purificação do plasmídeo. E como, as tecnologias de purificação são conhecidas (FERREIRA *et al.*, 2000) e estão disponíveis, o processo de produção torna-se muito mais econômico, além de diminuir, drasticamente, o risco de agentes contaminantes, que é um dos grandes problemas para as vacinas vivas convencionais (BABIUK *et al.*, 2003).

Possivelmente, uma das maiores vantagens do uso dessas vacinas é que elas parecem estimular ambas, imunidade celular e humoral (BABIUK *et al.*, 1999). Embora, em muitos casos a imunização com DNA induza a uma forte resposta tipo Th1, se a resposta Th2 for requerida pode ser induzida alterando a rota ou método de administração, modificando a forma do antígeno, ou por co-administração de várias citocinas ou moléculas co-estimulatórias (LEWIS *et al.*, 1997).

Segundo Babiuk, *et al.* (1999), em vacinas convencionais, o uso de adjuvantes é uma das grandes causas de efeitos adversos. Os locais de injeção da vacina são focos de granulomas simples até osteosarcoma em animais de companhia. No entanto, com o uso de vacinas de DNA, essas reações podem ser reduzidas ou até eliminadas, pois não há a necessidade de adjuvantes convencionais.

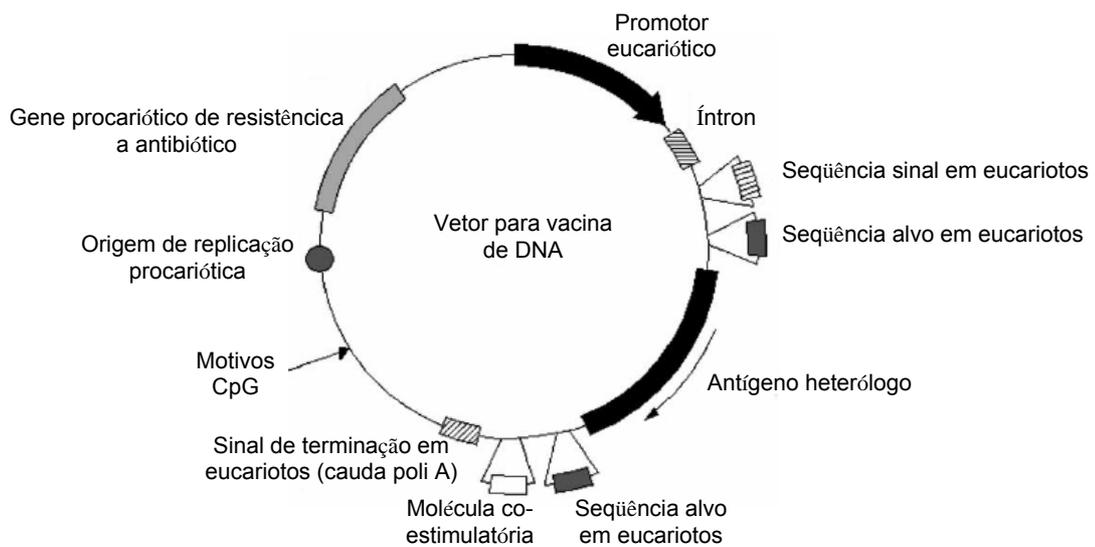
Um outro problema na vacinologia é a inabilidade de elicitar uma imunidade ativa em neonatos, devido, principalmente, a presença de anticorpos maternos. Fortuitamente, imunizações com DNA tem provado induzir resposta imune em neonatos mesmo na presença de anticorpos maternos (LITTEL-van den HURK *et al.*, 2000; SIEGRIST e LAMBERT, 1997) e uma forte imunidade em fetos in útero (GERDTS *et al.*, 2004).

Apesar de todas essas vantagens, ainda paira certa incerteza sobre a segurança das vacinas de DNA. Uma das questões que se levanta é a da possibilidade de integração do DNA plasmidial no genoma das células hospedeiras. Integração é por definição uma mutagenese insertiva que pode causar ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumores (LEDWITH *et al.*, 2000). HENKE (2002) questiona que se a integração ocorresse seria de 1 a 8 integrações para 150000 células diplóides, e teria 3 ordens de magnitude menores que as raras mutações espontâneas que ocorrem nas células. Segundo LEDWITH *et al.* (2000) uma integração para 150000 células diplóides daria  $6,7 \times 10^{-6}$  integrações por células. Dividindo esse valor por 50 000 genes/ célula daria uma frequência de  $1,3 \times 10^{-10}$  integrações por gene.

Outros riscos teóricos incluem: a indução de tolerância devido a longo tempo de apresentação do antígeno; reações auto imunes; reações adversas devido ao uso de citocinas co-estimulatórias (HENKE, 2002). No entanto, na maioria dos sistemas já testados para indução de tolerância percebe-se grande influência das condições de saúde e idade dos indivíduos. Por exemplo, foi observada tolerância apenas quando vacinas foram administradas em camundongos com menos de 8 dias de idade (GURUNATHAN *et al.*, 2000). Quanto a produção de anticorpos patogênicos anti DNA ainda precisa ser avaliado com cautela. O DNA dupla fita purificado, por exemplo, não induz anticorpos anti DNA, isso tem ocorrido, apenas, em camundongos inoculados com DNA degradado metilado com soro albumina bovina e co-administração de adjuvante de Freud (DONNELLY *et al.*, 1997).

#### 2.4.2. Classificação e Composição de uma vacina de DNA

Vacinas de vetores recombinantes são classificadas como vacinas de vetores vivos e vacinas de DNA puro. Clássicos vetores vivos são bactérias ou vírus atenuados que ao lado de induzir sua imunidade natural, também, podem ser usados para expressão de imunógenos de outros patógenos. São bons exemplos desses vetores: *Salmonella*, Poxvirus, adenovirus, herpesvirus, canarypox vírus, entre outros (SHAMS, 2005). Tipicamente, uma vacina de DNA puro consiste de um gene estranho de interesse clonado dentro de um plasmídeo bacteriano (DUNHAM, 2002). Segundo RODRÍGUEZ (2004), plasmídeos bacterianos são moléculas, extracromossomais, de DNA dupla fita, circulares, que carregam a maioria das seqüências requeridas para sua replicação. Um plasmídeo, usado como vacina de DNA, é desenhado para uma ótima expressão em células de mamíferos. Ele deve conter alguns requisitos básicos, como: (A) uma origem de replicação para permitir o crescimento em bactéria; (B) um gene de resistência bacteriana a antibiótico permitindo a seleção do plasmídeo durante a cultura bacteriana; (C) um promotor forte para a expressão em células de mamíferos; (D) seqüências de poliadenilação para estabilização dos transcritos de RNAm (GURUNATHAN *et al.*, 2000). GARMORY, *et al.*(2005) cita, ainda, a presença de uma seqüência sinal de eucariotos, denominada seqüência Kozak - criando um ambiente 5'-ACCAUGG-3' para o códon de iniciação. O mesmo autor, também, relata o uso de promotores/enhancers tecidos específicos, variando de acordo com a via de imunização. A presença de um íntron dentro do vetor plasmidial, também, tem sido bastante utilizada, principalmente, para imunizações com genes de bactérias e alguns vírus de RNA, que não são normalmente transcritos no núcleo (BABIUK *et al.*, 2003). Essas moléculas de DNA plasmidial são as mais compactas possíveis, variando seu tamanho entre 3 a 12 Kb, sem o inserto de expressão. Além disso, elas aparecem em três isoformas topológicas: linear, circular aberta e superenovelada, sendo, esta última, a forma que denota integridade para uso em biofarmacêutica (RODRÍGUEZ, 2004).



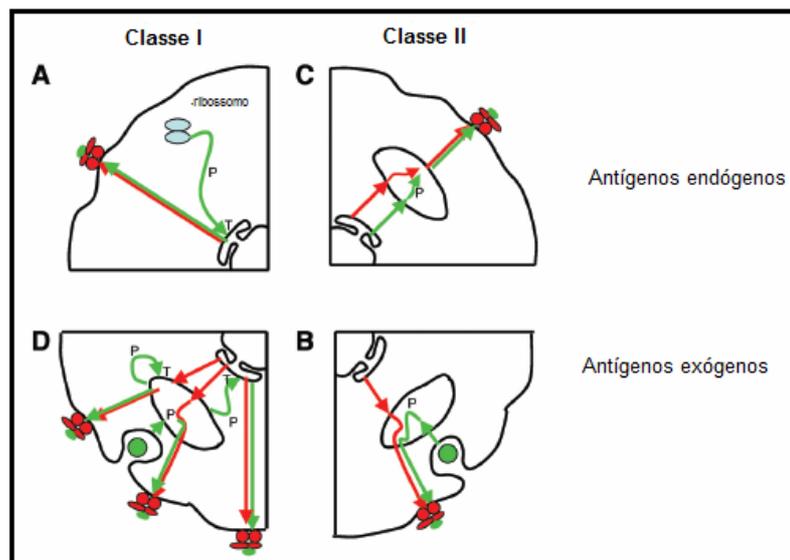
**Figura 1.** Diagrama mostrando os típicos fatores de um vetor plasmidial para uso como vacina de DNA. A unidade transcricional consiste de um promotor, o gene codificando o imunógeno da vacina e um sinal de poliadenização. A origem de replicação bacteriana e o gene de resistência a antibiótico permitem o crescimento e seleção do plasmídeo na bactéria. O vetor pode ser manipulado para conter um sinal eucariótico ou seqüências alvo, motivos CpG ou moléculas co-estimulatória para modular ou aumentar a resposta imune induzida pelo antígeno heterólogo. (Fonte: GARMORY, *et al.*, 2005).

### 2.4.3. Mecanismo de Ação

O exato mecanismo pelo qual as vacinas de DNA induzem a resposta imune ainda não está totalmente entendido (SHEDLOCK e WEINER, 2000). Os alvos potenciais para transfecção dos plasmídeos de uma vacina de DNA incluem células somáticas e células apresentadoras de antígeno (APC) (DUHAM, 2002). As APCs podem ser transfectadas diretamente com o DNA plasmidial ou ativadas, indiretamente, por proteínas produzidas por células somáticas transfectadas. No último caso, proteínas podem ser secretadas ou liberadas das células que morreram por apoptose. As células dendríticas ativadas são capazes de estimular tanto respostas de MHC classe I como classe II elicitando linfócitos T helper e linfócitos T citotóxicos (CTL), como, também, respostas de linfócitos B.

O processamento dos antígenos dentro das células dendríticas é bem explicado por HOWARTH & ELLIOTT (2001), que, didaticamente, dividem em 4 as

possíveis vias de processamento. Os antígenos endógenamente sintetizados são degradados no citosol por proteases. Os peptídeos gerados são transportados para o retículo endoplasmático (RE) por “transportadores cassetes ligantes de adenosina trifosfato” (TAP), onde são carregados para dentro de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade classe I (MHC I) e migram para a superfície celular (Figura 2A). Antígenos que entram nos fagolisossomos são degradados por proteases e carregados para dentro de moléculas MHC classe II antes de migrarem para a superfície celular (Figura 2B). Aqueles antígenos sintetizados dentro de uma célula, que contenha um endossoma/lisossoma marcado, serão transportados para dentro destes e ali degradados por proteases. Os peptídeos gerados são levados por moléculas MHC II antes do complexo chegar à superfície celular (Figura 2C). E, por último, antígenos que entram em endossomas ou fagolisossomas têm 3 caminhos (Figura 2 D). O primeiro caminho é que antígenos são translocados dentro do citosol, onde entram na via clássica de processamento endógena, com peptídeos transportados para o RE pela TAP, onde se ligam ao MHC I. O segundo é que eles são degradados em compartimentos de baixo pH, e os peptídeos gerados se ligam à MHC I resultado da fusão RE/ fagossoma. Também é possível, que antígenos sejam translocados para fora do fagolisossoma, degradado proteases associadas a fagolisossomos, tal com proteassoma. Depois, eles são transportados de volta para o mesmo fagolisossoma pela TAP, onde eles podem a moléculas MHC classe I.



**Figura 2.** Esquema de 4 possíveis vias de processamento do antígeno em células dendríticas. Em verde são visto as via intracelular do antígeno e em vermelho são as vias das moléculas de MHC. P se refere a processamento e T a transporte. (Fonte: HOWARTH & ELLIOTT, 2001)

#### 2.4.4. Fatores que determinam a imunogenicidade de uma vacina de DNA

Um dos requerimentos para o sucesso da vacinação usando DNA é a forma de liberação eficiente do DNA nas células do hospedeiro. Diversas rotas de inoculação têm sido pesquisadas: intravenosa, intraperitoneal, epidermal com escarificação, oral, intranasal, vaginal, eletroporação *in vivo*, entre outras. No entanto, as rotas mais comumente utilizadas são: inoculação intramuscular (IM), intradermal (ID) ou um método balístico, conhecido como “gene gun”.

O “gene gun” consiste de um processo de aceleração de partículas de ouro com DNA, codificando a proteína de interesse, dentro da pele, utilizando um gás inerte em alta pressão (HUANG *et al.*, 2007). A administração de vacinas de DNA via “gene gun” serve como um método eficiente para liberação de DNA, diretamente, dentro das APCs profissionais, potencializando, assim, o efeito da vacina. O uso dessa técnica tem dado bons resultados utilizando apenas de 0,1 à 1 µg de DNA, em camundongos (DUNHAM, 2002). Métodos de imunizações com DNA na pele são bem comentadas por PEACHMAN, *et al.* (2003).

As quantidades de DNA requeridas para imunizações de sucesso diferem, significativamente, de acordo com a rota de imunização. Diferentemente do “gene gun”, imunizações IM requerem quantidades bem maiores de DNA. Resultados demonstrados por CHENG, *et al.* (2007) sinalizam que uma boa dose para induzir imunidade celular, em camundongos, varia de 50 à 200 µg de DNA. Ainda, segundo ele, se for usado pouco DNA a expressão do gene pode ser incompleta, e em doses excessivas a proteína expressa pode não refletir um caráter dose dependente. Apesar disto, a musculatura esquelética apresenta grandes vantagens como via de imunização. Os músculos são facilmente acessíveis, bem vascularizados e a expressão de transgene é mais prolongada em músculos estriados do que em outros tecidos (PRUD'HOMME *et al.*, 2001).

As vias de imunização, contudo, estão diretamente relacionadas com a espécie animal a ser imunizada. Em camundongos o método mais eficiente parece ser o bio-balístico (gene gun). Gatos, suínos e bovinos a liberação intradermal tem sido mais eficiente do que a injeção intramuscular (LITTEL-van den HURK *et al.*, 2000). Em ovelhas, porém, a via IM apresentou resultados muito melhores do que o “gene gun” e via subcutânea (DE ROSE *et al.*, 2002).

O DNA pode ser administrado em uma variedade de diluentes, incluindo água destilada, solução salina e sacarose (GURUNATHAN *et al.*, 2000). Para imunizações IM, pesquisadores têm utilizado agentes como a cardiotoxina, bupivacaína ou soluções hipertônicas para penetrar no tecido muscular e melhorar a resposta, apesar de estudos adicionais sugerirem um benefício mínimo (LEITNER *et al.*, 2000). A aplicação de corrente elétrica após injeção IM do DNA em salina tem mostrado grande eficiência, tanto na transfecção de células musculares *in vivo* como na resposta imune ao antígeno codificado (DONNELLY *et al.*, 2003; TJELLE *et al.*, 2006). Além disso, o número e intervalos das vacinações não podem ser esquecidos (BERGMANN-LEITNER e LEITNER, 2004).

O uso de adjuvantes associado à vacinas de DNA pode melhorar muito a resposta imune do animal vacinado. Um adjuvante ideal deve ser estável, com longa vida de prateleira; biodegradável; barato para se produzir; não ter efeitos adversos, não induzir resposta imune contra si mesmo e sim melhorar a resposta contra determinado antígeno (PETROVSKY e AGUILAR, 2004). Para uso com vacinas de DNA, muitas pesquisas têm sido feitas com diversos tipos de adjuvantes: citocinas, lipossomas, toxinas (toxina colérica), polímeros, nano e micropartículas (BAROUCH *et al.*, 2001; GREENLAND e LETVIN, 2007; O'HAGAN *et al.*, 2001; SCHEERLINCK, 2001).

Contudo, não há dúvida, que um dos adjuvantes mais comentados para uso conjunto com imunizações de DNA são motivos CpG de DNA. Esses são seqüências palindrômicas específicas composta de citosina seguida de guanina (CpG dinucleotídeos) (MANDERS e THOMAS, 2000). A fórmula básica para um motivo CpG é: 5'- X<sub>1</sub> X<sub>2</sub> CG Y<sub>1</sub> Y<sub>2</sub> - 3', onde X<sub>1</sub> é uma purina, X<sub>2</sub> é uma purina ou uma timina, Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub> são pimidinas (MUTWIRI *et al.*, 2003). Seqüências de procariotos, ricas em CpG, possuem 80% menos citosina metilada que suas correspondentes em mamíferos, o que suporta seu efeito imunoestimulatório em mamíferos (MANDERS e THOMAS, 2000). O mecanismo de ação está diretamente relacionado com o seu reconhecimento por Toll Like Receptors (TLR), mais especificamente TLR9, presentes em células da imunidade inata (HEEG *et al.*, 2008; ISHII e AKIRA, 2007). E logo depois, ocorre ativação da imunidade adaptativa, além de, uma potencial modulação local do microambiente no sítio de injeção da vacina com adjuvante (ZIMMERMANN *et al.*, 2008).

A seqüência codificadora de um antígeno dentro de um plasmídeo é sem dúvida um dos fatores mais determinantes da eficiência em uma vacina de DNA. A otimização do antígeno é crítica para imunogenicidade de uma vacina de DNA (WANG *et al.*, 2006), já que a alta expressão de genes derivados de microrganismos em células de mamíferos é necessária para o sucesso da vacinação usando DNA. É sabido que um dos obstáculos da expressão de genes derivados de microrganismos em mamíferos pode ser devido a diferença interespecífica de códons usados. Uma das características do código genético é que cada aminoácido é codificado por vários códons sinônimos, exceto a metionina e o triptofano (ZAHA *et al.*, 2003). A freqüência desses códons sinônimos é diretamente dependente da espécie. Em geral, organismos evolutivamente próximos utilizam códons similares para sua síntese protéica. Organismos, porém, distantes taxonomicamente utilizam códons muito diferentes. Recentemente, muitas pesquisas tem sido feitas na busca de códons otimizados para melhor expressão de proteínas de diferentes organismos em células de mamíferos (NAGATA *et al.*, 1999).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

- Desenvolver de um candidato à vacina de DNA utilizando genes sintéticos derivados do peptídeo SBm7462 contra o carrapato *R. (B.) microplus* e avaliar a resposta imune humoral em camundongos Balb/C inoculados com o mesmo.

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- Construir de cassetes de expressão para genes sintéticos, objetivando a construção de vacinas de DNA;
- Avaliar da expressão do peptídeo SEQ1 *in vitro* e *in vivo*;
- Imunizar camundongos Balb/c com o candidato à vacina de DNA;
- Avaliar a via de inoculação da vacina sintética do peptídeo SBm 7462;
- Estudo da resposta humoral, em camundongos, inoculados com o candidato vacinal de DNA recombinante e com o peptídeo SBm7462.

## 4. MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1. Local do Estudo.

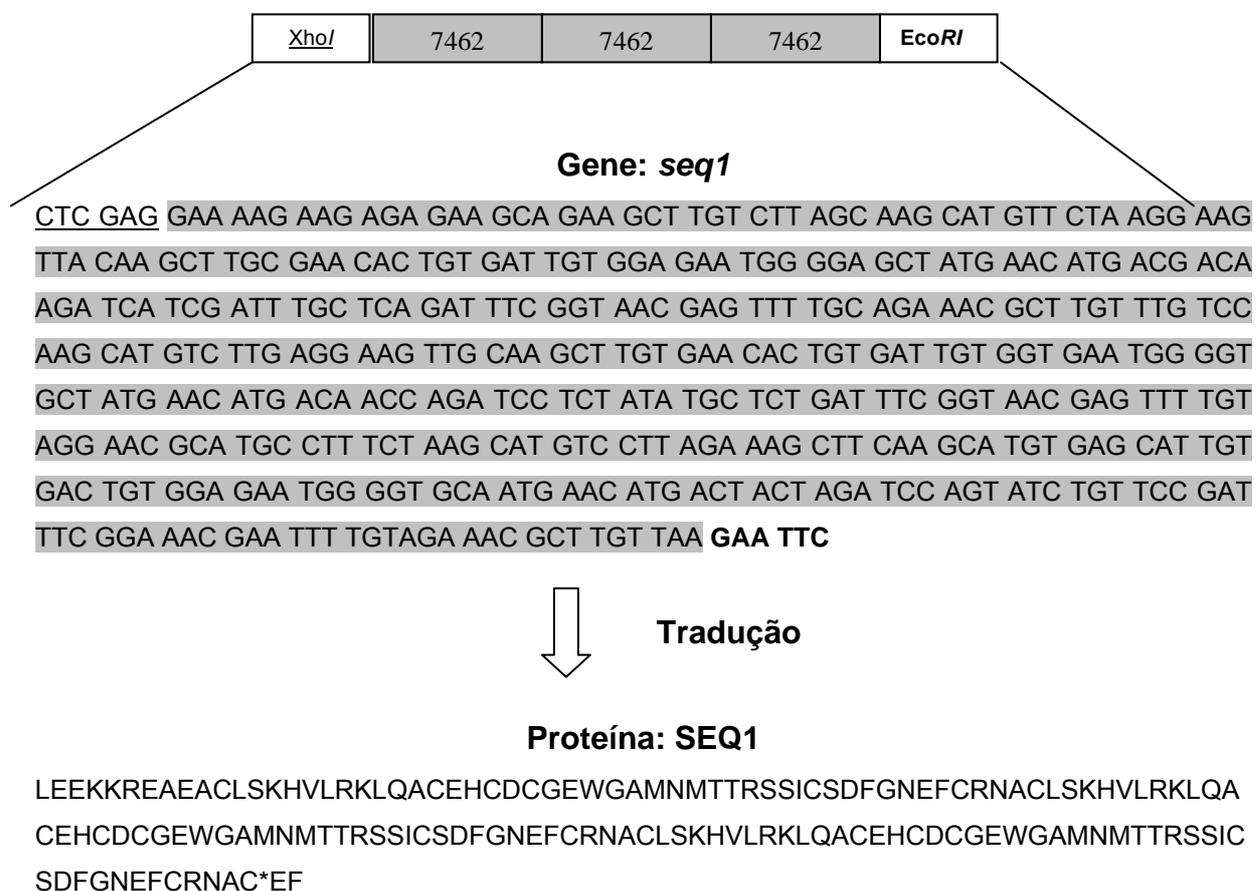
Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) - BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa - MG. Os camundongos permaneceram no Laboratório de Biofármacos – Vila Gianette - Universidade Federal de Viçosa – MG. As amostras foram sequenciadas no Laboratório de Genética Molecular, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de Leite e no Laboratório de Genômica, localizado no BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa.

### 4.2. Animais

Foram utilizadas 25 fêmeas de camundongos BALB/c, como modelo experimental, com oito a dez semanas de idade, pesando em torno de 20 gramas. Estes receberam água *ad libitum* e ração comercial peletizada com composição nutricional adequada para esta espécie animal durante o decorrer do estudo. Os animais permaneceram durante todo o experimento em sala climatizada de forma a proporcionar maior conforto térmico com temperatura variando entre 20 a 24°C e 45 a 75% de umidade relativa, com um regime diário de luz artificial de 12 horas.

### 4.3. Desenho e Síntese do Gene

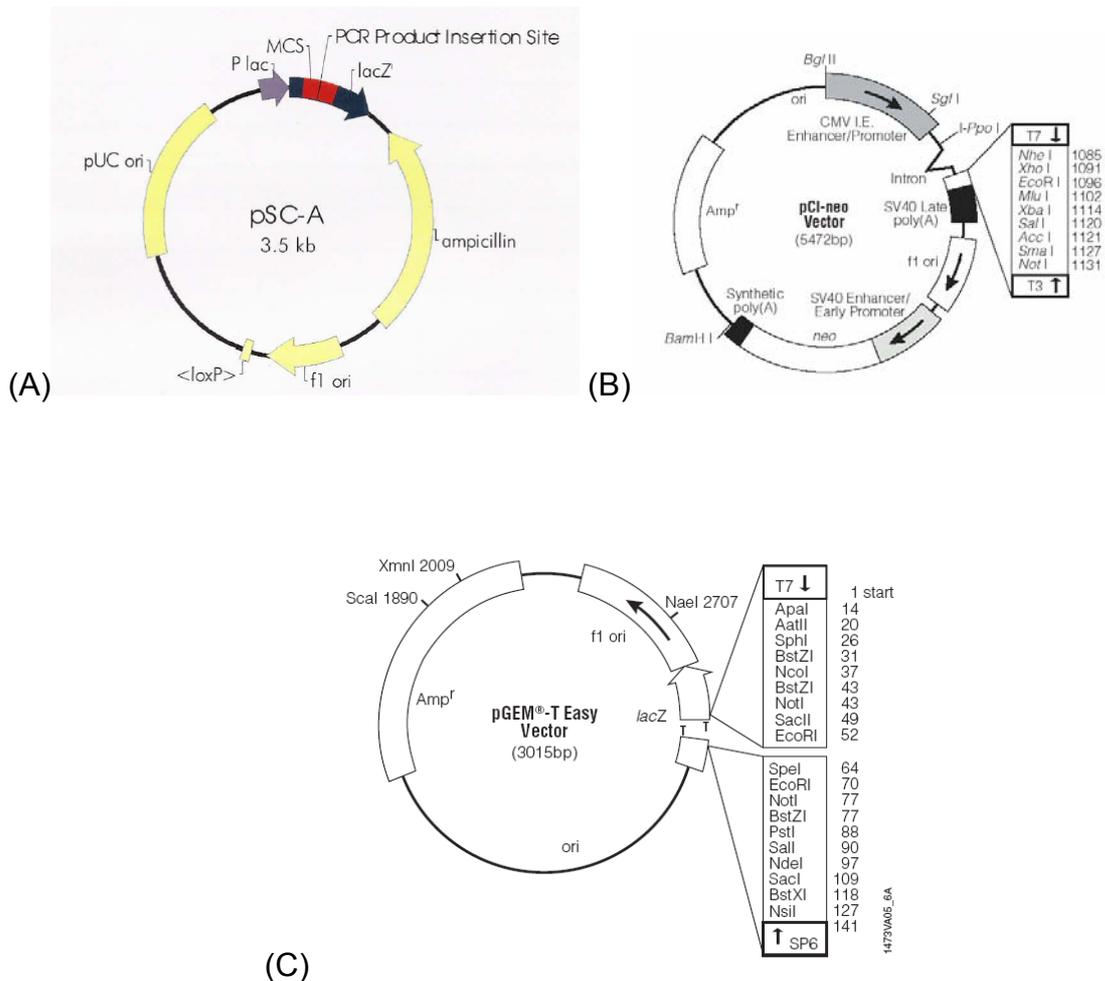
Foi utilizado um gene sintético derivado do peptídeo SBm7462 desenhado no LBCHV e sintetizado pela Entelechon (Alemanha). O gene, denominado *seq1*, consta da seqüência nucleotídica que codifica o peptídeo SBm 7462, ordenados repetidamente três vezes. O *seq 1* possui, no entanto, códons preferenciais para expressão em *Pichia pastoris*, porque foi desenhado para síntese de proteínas por fermentação. Apresenta, ainda, em suas extremidades 5' e 3' sítios de restrição para enzimas específicas do vetor plasmidial pCIneo, no caso, *XhoI* e *EcoRI*, respectivamente (Esquema na figura 3).



**Figura 3.** Estrutura do gene proposto e sua respectiva proteína (denominada SEQ1). *XhoI* e *EcoRI* representam os sítios de restrição nas extremidades 5' e 3' respectivamente para formação de finais coesivos necessários para a incorporação no vetor plasmidial de expressão.

#### 4.4. Esquema dos Vetores utilizados

Foram utilizados ao todo 3 vetores. O plasmídeo pCS-A (3,5kb) foi o vetor que veio da Entelechon (Alemanha) com o seq1 inserido e suas características estão mostradas na figura 4 (A). O vetor de expressão em mamíferos, pCIneo (5472pb), Promega-USA, carrega um promotor de citomegalovirus humano (CMV) para promover uma expressão constitutiva dos insertos de DNA clonados em células de mamíferos. O pCIneo contem o gene para neomicina fosfotransferase, uma marca de seleção para células de mamíferos. Esse vetor pode ser usado tanto para expressão estável como transitória. Sua seqüência completa está disponível on line em: [www.promega.com/vectors/](http://www.promega.com/vectors/) e também no GenBank® database. Na figura 4 (B) é possível visualizar seu mapa resumido. O terceiro e último vetor, pGEM® - T Easy Vector (3015pb), Promega-USA, e é um dos sistemas mais utilizados para clonagem de produtos de PCR. Esse vetor é preparado pelo corte do pGEM®-T Easy Vector com a enzima de restrição EcoR V e adição nas extremidades 3' de uma timina. Isso aumenta a eficiência de ligação do produto de PCR dentro do plasmídeo, pois as polimerases termoestáveis freqüentemente adicionam uma desoxiadenosina no final 3' do fragmento amplificado e que impede a sua circularização (figura 4C).



**Figura 4.** Mapa dos vetores. (A) Vetor de clonagem (pSCA), no qual o gene veio inserido (Fonte: Entelechon -Alemanha), (B) Vetor de expressão em mamíferos, pCI-neo, com pontos das seqüências de referencia – à direita. Neo = neomicina phosphotransferase; CMV I.E. = citomegalovirus (Fonte: Promega-USA) e (C) Mapa circular do pGem®-T Easy Vector e seus pontos de referência (Fonte: Promega-USA).

#### 4.5. Produção do vetor pSC-A com o inserto e extração do DNA plasmidial

O gene de interesse estava inserido no vetor pSC-A (3,5kb) clonado (no LBCHV) em células ultra-competentes de *Escherichia coli*, linhagem DH5α e estocado à -70°C com glicerol (25%). Das células estoque, 10μL foram colocadas em 50mL meio Luria-Bertani (LB) líquido e crescidas em agitador à 200 g , à 37°C, durante à noite. No dia seguinte, foi realizada a extração do DNA plasmidial, seguindo, o protocolo: para a sedimentação das células, foi centrifugado todo o conteúdo em tubos de 50mL à 16000g por 10minutos. Em seguida, foram

adicionados 6,6 mL de solução I (Tris-Cl 25mM, pH 8; EDTA 10mM, HCl 25mM, pH8; Glicose 50mM) agitando até dissolver o precipitado e deixando incubar por 5 minutos à temperatura ambiente. Depois, foi adicionado 6,6 mL da solução II (NaOH 0,2M e SDS 1%), homogeneizando e deixado em gelo por mais 5 minutos. Logo após, foi acrescentado 5mL da solução III (acetato de potássio 3M e ácido acético 2M), invertendo os tubos e mantendo-os em gelo por mais 5 minutos. Todo o conteúdo dos tubos foi centrifugado à 16000g por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos tubos, adicionou-se 182  $\mu$ L de RNase A (10 $\mu$ g/ $\mu$ L) e os tubos foram mantidos à 37°C por 30 minutos. Posteriormente, acrescentou-se 17,5mL de solução fenol clorofórmio (1:1) invertendo levemente os tubos por 5 minutos e procedeu-se a centrifugação à 16000g por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para novos tubos e repetiu-se o passo anterior. A seguir, adicionou-se 30mL de etanol absoluto gelado e 1/10 do volume de acetato de potássio 5M, e os tubos foram deixados à -20°C por 12 horas. No dia seguinte centrifugou-se os tubos à 16000g por 5 minutos, descartando o etanol 100% e adicionando 5 mL de etanol 70%. Por fim, descartou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado, à temperatura ambiente, suspendendo-o, posteriormente, em 50 $\mu$ L de água deionizada autoclavada.

#### **4.6. Isolamento do seq 1 do vetor pSC-A**

O gene foi isolado do vetor pSC-A por uma reação de clivagem utilizando 5  $\mu$ L de Buffer React 2 - 10X (Invitrogen); 0,5 $\mu$ L de Soro Albumina Bovina Acetilada (10mg/mL - Promega); 20U de enzima *Xho*I (Invitrogen); 12,5 $\mu$ L de água livre de nucleases, 15 $\mu$ g de DNA plasmidial; deixando clivar por 12 horas à 37°C. No dia seguinte, foi acrescentado 20U de *Eco*RI e 8,25 $\mu$ L de NaCl (500mM) e a mistura permaneceu por mais duas horas à 37°C em banho maria. A seguir, a todos os volumes da reação de clivagem (cerca de 50 $\mu$ L por reação) foram acrescentados 8  $\mu$ L de corante tipo IV 6X (0,25% azul de bromofenol e 40% sacarose) e aplicados em gel de agarose de alta resolução 1%. A corrida eletroforética procedeu-se à 100 volts em cuba de eletroforese horizontal, em TBE (Tris-borato 0,09M e EDTA 0,002M). Logo após, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 $\mu$ L/ mL) durante 15 minutos a temperatura ambiente e analisado em transiluminador Eagle Eye II (Statagene) de

luz ultravioleta. Com o auxílio de padrão de peso molecular DNA Ladder 100pb (Promega – USA), identificou-se as bandas de interesse.

#### **4.7. Purificação dos fragmentos de DNA em gel de agarose**

Após verificado a clivagem, a banda no gel foi excisada sob luz ultravioleta, com auxílio de uma lâmina de bisturi e condicionada em tubos de 1,8 mL identificados com o nome da amostra e pesados. Depois de cortados os insertos foram purificados utilizando o kit Wizard® SV and PCR Clean-up System (Promega-USA). Para cada 1 mg de gel extraído, 1 µL de *Membran Binding Solution*, fornecida pelo kit, foi adicionada. As amostras foram incubadas em banho-maria a 60°C até completa dissolução do gel, nunca ultrapassando 15 minutos. As soluções foram transferidas para mini-colunas e incubadas por 1 minuto em temperatura ambiente. Os conjuntos formados pelos tubos coletores e mini-colunas foram centrifugados por 1 minuto a 10.000g, descartando-se os líquidos residuais.

Em cada mini-coluna foram adicionados 700 µL de *Membran Wash Solution* e submetida à centrifugação por mais 1 minuto a 10.000g. Os líquidos residuais foram descartados. Realizou-se nova lavagem, agora, com 500 µL da mesma solução. Centrifugou-se por 5 minutos a 10.000g.

As mini-colunas foram transferidas para tubos novos de 1,8 mL e foram adicionados 20 µL de água milliQ livre de nuclease. Após incubação por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugação à 10.000g por, mais, 1 minuto, os líquidos residuais com os fragmentos de DNA que foram separados do gel de agarose. Os fragmentos de DNA foram estocados a -20°C até o momento do uso para reação de ligação em vetor plasmidial.

#### **4.8. Abertura do vetor pCIneo com as enzimas de restrição XhoI e EcoRI**

O vetor pCIneo, já clonado em *Escherichia coli*, linhagem DH5α se encontrava estocado à -70°C com glicerol 25%, no Laboratório de Biologia de Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV). Assim, da mesma forma que foi feito para o vetor pSCA procedeu-se com o pCIneo, ou seja, ele também foi crescido em

meio LB líquido e o DNA plasmidial foi extraído como descrito, anteriormente, para o pSC-A. Posteriormente, o pCIneo foi aberto utilizando-se a mesma reação de clivagem feita para os insertos e, igualmente, foi purificado utilizando o kit Wizard® SV and PCR Clean-up system (Promega-USA).

#### **4.9. Construção do cassete de expressão**

O cassete de expressão foi construído utilizando-se o inserto e o vetor pCIneo tratados com as enzimas de restrição *XhoI* e *EcoRI*. As reações de ligação foram realizadas em tubos de 0,6 mL com 1 µL de 10X Ligation Buffer, 1 µL (25 ng) de vetor pCIneo clivado, 3 µL (75 ng) do inserto clivado, 1 µL de T4 DNA ligase e 4 µL de água milliQ autoclavada. As reações depois de homogeneizadas por pipetagem foram mantidas a 4°C durante 12 horas .

Para a reação de transformação, retiraram-se os tubos com as células competentes do freezer -70°C e as mesmas foram descongeladas em banho de gelo. Cada tubo recebeu 10 µL da reação de ligação, foi homogeneizado lentamente e mantido no gelo por trinta minutos. Em seguida, as células foram submetidas a choque térmico, primeiro colocadas a 42°C por 45 segundos e, em seguida, a 4°C por 2 minutos. Adicionou-se 800 µL de meio SOC e permaneceu por 1 hora a 37°C, por 180g em agitador.

Placas de Petri com meio LB sólido, com 100 µg/mL de ampicilina, foram semeadas com 100 µL de células transformadas. As placas foram fechadas, vedadas com filme plástico, invertidas e mantidas em estufa, a 37°C durante 17 horas.

#### **4.10. Triagem bacteriana por PCR para pCIneo1 transformante**

Para que as colônias recombinantes, aqui denominadas pCIneo1R, fossem isoladas mais rapidamente, foi feita a triagem bacteriana, uma vez que o vetor pCIneo não possui nenhum marcador de recombinação.

Utilizando ponteiros estéreis, colônias individuais foram coletadas da placa de transformação para outra placa seletiva LB/ ampicilina, com posição numerada e a

mesma ponteira foi colocada em contato com uma solução da PCR que consistia de tampão de reação 10x (Tris-HCl 10mM, pH9,0 e KCl 50 mM); MgCl<sub>2</sub> 1,5mM; 0,25mM de dNTPs, 1 µL de cada oligonucleotídeo à 5µM e 1,2U de Go Taq DNA polimerase (Promega, Madison, Wisconsin) em solução final de 25 µL. Para esta reação foram empregados os oligonucleotídeos recomendados no manual do vetor pCI-neo (Promega, Madison, Wisconsin), denominados T3 e T7EEV . A Tabela1 descreve a seqüência dos oligonucleotídeos descritos acima.

**Tabela1.** Oligonucleotídeos utilizados nas PCR para verificar pCIneo 1 transformantes

| DESIGNAÇÃO | SEQÜÊNCIA                               | COORDENADAS |
|------------|---|-------------|
| T3         | 5´ - ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA - 3´    | “Reverse”   |
| T7EEV      | 5´ - AAG GCT AGA GTA CTT AAT ACG A - 3´ | “Forward”   |

A reação de amplificação foi processada em um termociclador “MJ Research, Inc. modelo PTC -100 – Watertown, USA”. O programa utilizado foi de 94°C por 10 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C 30 segundos, 50°C por 1 minuto, 72° por 1minuto. A etapa final de extensão foi de 7 minutos à 72°C. Após o término das reações, os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (GibcoBRL, New York, USA), evidenciado por brometo de etídeo 0,5 µg/ mL (Sigma , Munich, Germany) e visializado sob luz ultravioleta.

#### 4.11. Crescimento bacteriano em meio líquido e estoque dos clones

Após a realização da PCR, todas as colônias que tiveram o fragmento inserido foram denominadas de positivas. Essas foram crescidas em meio LB líquido (10 g de Triptona; 10 g de NaCl; 5 g de Extrato de Levedura e água milliQ q.s.p 1000 ml) com 100 µg/ml de ampicilina). Com o auxílio de uma alça de platina, em capela de fluxo laminar horizontal e bico de Bunsen, as colônias positivas foram transferidas para tubos devidamente identificados. Em seguida colocadas no agitador com rotação de 180g a 37°C por 18 horas, em média.

Para cada amostra, quatro clones de *E. coli* DH5α contendo o fragmento de interesse foram estocados em alíquotas com 10% de glicerol (Sigma®). Após homogeneização, foram congelados em nitrogênio líquido (-196°C) e transferidos para o freezer – 70°C.

#### **4.12. Extração de DNA plasmidial para posterior seqüenciamento das amostras**

O Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega®) foi utilizado na extração do DNA plasmidial.

Os tubos com 15mL de meio LB mais as culturas de *E. coli* DH5α transformadas foram centrifugados a 10.000g por 5 minutos e o sobrenadante resultante foi descartado. Adicionaram-se 250 µL de solução de ressuspensão celular e o precipitado foi dissolvido delicadamente até alcançar completa homogeneização da solução. Esse conteúdo foi transferido para tubo de polipropileno de 1,8 mL e acrescidos de 250 µL da solução de lise celular. Inverteram-se os tubos, delicadamente, por quatro vezes e incubou-se até clarear a suspensão (por no máximo cinco minutos).

Cada tubo recebeu, em seguida, 10 µL de solução de Protease Alcalina, homogeneizando-se por quatro inversões suaves e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos. Após adição de 350 µL da solução de neutralização por tubo e nova inversão de quatro tempos, finalizou com centrifugação a 14.000g durante 10 minutos à temperatura ambiente.

O sobrenadante com o DNA foi transferido para mini-colunas associadas a tubos coletores. Centrifugou-se por 1 minuto a 14000g. Descartou-se o produto dos tubos coletores e lavaram-se as mini-colunas com 750 µL da solução de lavagem. Após nova centrifugação por mais um minuto, repetiu-se o último passo com 250 µL da solução de lavagem e mais 2 minutos de centrifugação.

Os DNAs foram ressuspendidos em 50 µL de água livre de nuclease, em tubos novos e centrifugados por 1 minuto a 14000g. As amostras foram quantificadas por meio de espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose. As mesmas foram estocadas em caixas crio- protetoras a -20°C até o sequenciamento.

#### **4.13. Seqüenciamento das amostras**

As amostras foram seqüenciadas no sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) pelo método enzimático descrito por SANGER *et al.* (1977). Utilizando-se o *Dynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* e instruções do mesmo, como referência no preparo das amostras.

Foram seqüenciadas quatro amostras com o cassete de expressão (pCIneo + seq 1) e quatro amostras com o o seq 1 “teóricamente” mutado dentro do pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector, dando um total de 16 amostras (8 reações *forward* e 8 *reverse*). Para a primeira reação utilizou-se os primers T7EEV(*forward*) e T3 (*reverse*), já para as reações com o pGem foram utilizados os oligonucleotídeos M13 *forward* (5'-GGTGTAACGACGGCCAGT - 3') e M13 *reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGACC - 3').

As reações de sequenciamento foram realizadas em placas de 96 “wells”. Cada reação de sequenciamento foi constituída de 4µL de *sequencing reagent premix*; 1µL de primer (5 pmoles); de 200ng de DNA, sendo o máximo de 5 µL; e água para completar o volume de 10µL. As reações de amplificação foram conduzidas pela amplificação linear por PCR, usando o termociclador Perkin Elmer 9600, programado com 4 minutos a 94°C; 25 ciclos de 94°C por 0,2 minuto, 50°C por 0,15 minuto e 60°C por 1 minuto; finalizando a 4°, *overnight*.

As reações foram precipitadas com isopropanol, cada reação foi acrescida de 20 µL de isopropanol 80%. Após bem misturadas, foram centrifugadas por 30 minutos a 2500g. O sobrenadante foi removido, invertendo-se a placa e centrifugando a mesma por 1 minuto, 300g. Lavou-se o *pellet* com 45µL de etanol 70% e centrifugou-se brevemente. O sobrenadante foi novamente removido e o *pellet* seco por 5 minutos a 20°C.

Para ressuspender os *pellets*, cada amostra recebeu 10µL de MegaBACE *Loading Solution* e foi completamente dissolvido quando vigorosamente agitado em *vortex*, por 10 a 20 segundos. Centrifugaram-se brevemente as amostras para coletá-las no fundo do tubo e retirar as bolhas. As amostras foram aquecidas a 96°C antes da injeção para a corrida no MegaBACE1000.

A análise das reações de seqüenciamento foram realizadas com os programas: Seqman do pacote DNASTAR (DNASTAR Inc.), Chromas (versão 2.31) utilizados para comparar os esferogramas com as seqüências nucleotídica; e Genius (versão 3.6.2) para alinhamento das seqüências nucleotídicas e aminoácidas.

#### **4.14. Transfecção de células VERO**

A transfecção com cassetes de expressão (pCIneo1) em células VERO foi realizada com Transfectam® Transfection Reagent (Promega, Madison, Wisconsin). Foram preparadas duas soluções. Para a solução A colocou-se 5µg do cassete de expressão (pCIneo + seq 1) e 250µL de meio DMEM (Sigma- Aldrich®) sem soro fetal bovino, para evitar qualquer interferência nos reagentes da transfecção. À solução B foi acrescentado 5 µL de Transfectam® Reagent para cada 1 µg de DNA colocado na solução A, ou seja, um total de 25 µL de Transfectam® Reagent e mais 250 µL de meio DMEM, também, sem soro fetal bovino. Imediatamente, após o preparo, as duas soluções foram misturadas e adicionadas diretamente na monocamada de células VERO (com aproximadamente 50% de confluência). As células com a mistura foram incubadas por 2h em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação foi acrescentado às células 2 mL de meio DMEM com soro fetal bovino, e houve incubação em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por mais 48h.

#### **4.15. DOT- ELISA para avaliação de células VERO transfectadas**

Membranas de filtro tipo PVDF com poros de 0,45 micras (Immunobilon-P – Milipore®), devidamente cortadas em tiras, foram colocadas em metanol PA –ACS (Qeel®) por 15 minutos e depois lavadas em água destilada. Quarenta e oito horas após a transfecção, as células VERO foram retiradas do meio DMEM e resuspendidas em 1mL de PBS. Uma alíquota de 400 µL dessas células foi sonicada em sonicador (LAB-LINE ULTRATIP LABSONIC SYSTEM) à 50W e o restante permaneceu em solução com PBS. Em seguida foi feita a sensibilização das membranas com 200µL de células VERO transfectadas sonicadas e não sonicadas, por aproximadamente 2 horas (até a completa absorção da suspensão celular). Uma membrana, no entanto, foi sensibilizada com água destilada, no lugar de células, para servir de controle negativo do DOT-ELISA. Para o bloqueio das membranas foi utilizada uma solução de PBS-T (4,25g de NaCl; 0,64g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,08g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O; 500µL de Tween 20 e 500mL de água destilada – pH 7,6) por 20 minutos. Logo depois, foi adicionado o anticorpo primário (IgG de coelho anti

peptídeo) diluído 1:20 em PBS-T, e incubado por 14 horas. No dia seguinte, foram feitas 3 lavagens de 5 minutos cada, com PBS-T, e aplicado o conjugado ( IgG de cabra anti coelho marcada com peroxidase), diluído 1:5000 em PBS-T, incubando por 45 minutos sob agitação. Depois, foram realizadas mais 2 lavagens com PBS-T de 5 minutos cada. O substrato (10mg de DAB; 10mL de Tris 0,05 m e pH 7,6; 1mL de NiCl<sub>2</sub> 0,3% e 10mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) foi, então, adicionado, e a reação foi parada com água destilada após 15 minutos.

#### **4.16. Ensaio de Peroxidase-anti-peroxidase (PAP)**

A verificação da expressão do peptídeo SEQ1 foi avaliada pela detecção das proteínas em células transfectadas em ensaios de PAP.

Após a fixação das células nas lâminas, foi utilizada água oxigenada 6% em PBS (1,48g defosfato de sódio dibásica anidro; 0,43g de fosfato de sódio monobásico anidro; 7,2g de cloreto de sódio; 1L de água destilada - pH 7,4) para bloqueio da peroxidase endógena (foi acrescentado 200 µL por lâmina). Lavou-se as lâminas com PBS (pH 7,4) e secou-se ao redor dos cortes. A seguir, os poços foram cobertos com soro normal de cabra diluído 1:20 em PBS (pH 7,4) e incubados em câmara úmida por 1h à temperatura ambiente. Depois de incubadas, as lâminas foram enxugadas ao redor dos poços (sem deixar secar) e foi colocado 200 µL de anticorpo primário específico ( IgG de coelho anti – SBm 7462) diluído 1:20 em PBS (pH 7,4) incubando em câmara úmida por mais 18horas à 4° C. Em seguida, lavou-se 3x com PBS pH (7,2) por 5 minutos, sob agitação. Após as lavagens, cobriu-se os poços com 200 µL de anticorpo secundário ( IgG cabra anti- coelho) diluído 1:20 em PBS (pH 7,4), incubando por mais 1hora em câmara úmida. Posteriormente, lavou-se 3x com PBS pH (7,2) por 5 minutos, sob agitação, enxugou-se ao redor dos poços e cobriu-se os cortes com o complexo PAP (Sigma- Aldrich ®), diluído 1: 200 em PBS pH (7,2), de acordo com especificação do fabricante. Incubou-se por mais 1h à 37°C em câmara úmida, lavando-se, em seguida, com PBS pH 7,4 por 2 vezes durante 2min, sob agitação. Logo depois, colocou-se a solução reveladora recém preparada (25 mg de DAB+ 200µL de água oxigenada 30V em 100 mL de PBS pH 7,4) durante 8-10 min, lavando-se as lâminas por 2 vezes durante 2min. A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris diluída 1:10 em PBS pH 7,4 durante

20seg. Por último, foram montadas as lâminas com entellan entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio óptico (Nikon Elipse E600).

#### **4.17. Produção de DNA plasmidial**

A produção de DNA plasmidial para a realização das vacinações foi feita utilizando o kit “Pureyield™ Plasmid Maxiprep System” (Promega, USA). Este procedimento foi utilizado para purificar DNA plasmidiais do pCIneo 1, livres de endotoxinas, em quantidade suficiente (100µg por animal/ vacinação) para todas as imunizações. Depois de deixar *E. coli* (DH5α) transformadas com o pCIneo 1, crescendo em 250mL de meio LB à 200rpm por 18h, estas foram sedimentadas por centrifugação à 14000g por 11minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 12mL de *Cell Resuspension Solution*, depois, foi acrescentado 12mL de *Cell Lysis Solution* incubado por 3 minutos e, finalmente, adicionado 12 mL de *Neutralization Solution*. Toda a mistura foi centrifugada à 14000g por 20 minutos e o sobrenadante límpido foi colocado na *PureYield™ Clearing Column* (coluna azul), que estava devidamente acoplada na *PureYield™ Maxi Binding Column* (coluna branca), no *vacuum manifold* e em uma bomba de vácuo, onde foi aplicado vácuo. Após a passagem de todo o líquido pelas 2 colunas, a coluna azul foi retirada e foi colocado 5 mL de *Endotoxin Removal Wash* na coluna branca, e, então, aplicado vácuo, novamente, até todo o líquido ser sugado. Em seguida, foi adicionado 20mL de *Collum Wash*, aplicado vácuo até sair completamente o cheiro de álcool. Finalmente, o DNA foi eluído da coluna branca com 1,5mL de água livre de nuclease.

#### **4.18. Esquema de vacinação**

Foram utilizados cinco grupos de 5 animais. Os animais foram inoculados vias subcutânea (SC) e intramuscular (IM) a cada quinze dias, sob anestesia inalatória com éter. O número total de doses foi igual a três, de acordo com os seguintes tratamentos (Tabela 2):

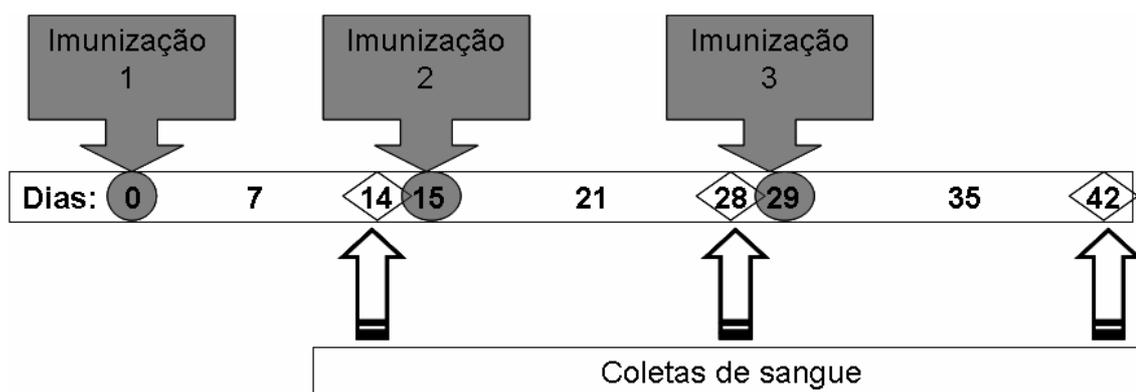
**Tabela 2.** Esquema de inoculação nos camundongos. O volume final inoculado por animal para cada grupo por via IM e SC foi de 100µL.

| <b>Grupos</b><br><b>Vias</b><br><b>Inoculação</b> | <b>I</b>   | <b>II</b>                     | <b>III</b>   | <b>IV</b>   | <b>V</b>  |
|---|--|-------------------------------|--|---|---|
| <b>Intramuscular</b><br><b>(IM)</b>               | <b>100 µg de</b><br><b>pCIneo não</b><br><b>recombinante</b> | <b>100µL de</b><br><b>PBS</b> | <b>100µg de</b><br><b>pCI neo/</b><br><b>gene1</b> | <b>75µg de</b><br><b>saponina</b><br><b>+ 100µg de</b><br><b>peptídeo</b><br><b>SBm7462</b> |   |
| <b>Subcutânea</b><br><b>(SC)</b>                  |  |                               |  |   | <b>75µg de</b><br><b>saponina</b><br><b>+ 100µg de</b><br><b>peptídeo</b><br><b>SBm7462</b> |

Todos os procedimentos que envolveram animais foram realizados de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética do DVT/UFV no processo n. 60/2007.

#### **4.19. Coletas de Sangue**

Os camundongos foram sangrados através do plexo retro-orbital, sob anestesia com éter. O esquema de coleta foi o seguinte (Figura 5): quatorze dias após cada uma das imunizações. As amostras de sangue foram coletadas com capilares sem uso de anticoagulante e armazenadas em tubos de polipropileno de 2 mL, na geladeira, à 4°C “overnight”. No dia seguinte as amostras foram centrifugadas à 10000g por 5 minutos para a separação do soro, que foi armazenado a -20°C até a realização de ELISA indireto para detecção de IgGs expressadas.



**Figura 5.** Esquema cronológico de imunizações e coletas de sangue

#### 4.20. Mensuração de Anticorpos totais por ELISA

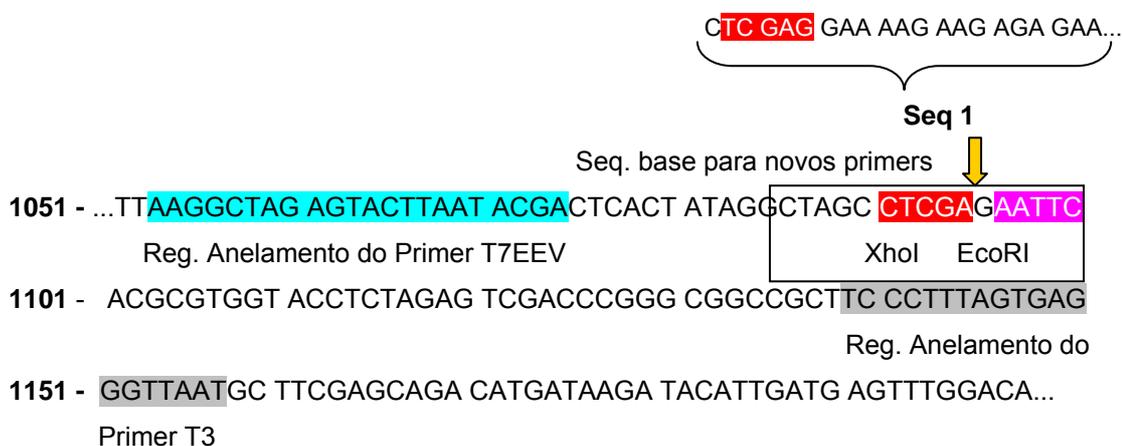
Anticorpos da classe IgG anti-proteínas expressadas foram detectados pelo ELISA adaptado para esse tipo de proteína. Placas de ELISA (Nuclon®) foram sensibilizadas com uma solução de tampão carbonato pH 9,6 (0,159g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,293g NaHCO<sub>3</sub>; H<sub>2</sub>O milli Q q.s.p. 100mL), na qual o peptídeo SBm7462 foi diluído na quantidade de 1µg/ poço, deixando-se adsorver na geladeira à 4°C por um tempo médio de 12 h. Decorrido este período, as placas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem (9,0g de NaCl; 0,5mL Tween 20, H<sub>2</sub>O dd q.s.p. 1000mL), sendo em seguida adicionada a solução de bloqueio – caseína 2% em PBS pH 7,6 (4,25g NaCl; 0,64g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,068g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; H<sub>2</sub>O milli Q q.s.p. 500mL) por uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas duas vezes, novamente, com tampão de lavagem e, posteriormente, adicionadas 200µL/well dos soros dos animais do experimento diluídos 1:100 em tampão de incubação (87,5 mL de PBS pH 7,6; 12,5 mL de caseína 2% em PBS pH 7,6; 50µL de Tween 20). Incubando por duas horas à temperatura ambiente. As placas foram, então, lavadas seis vezes com tampão de lavagem. Procedeu-se a incubação, por mais duas horas, à temperatura ambiente, do anticorpo secundário – IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (Sigma®), diluída 1:40.000 em tampão de incubação, no volume de 100µL/well. As placas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem e adicionou-se a solução reveladora no volume de 100µL/well, composta de 20mL de tampão substrato (7,19g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,19g ácido cítrico e H<sub>2</sub>O milli Q q.s.p. 1000mL), 4mg de O.P.D. (θ- fenildiaminobenzeno) e 2,5µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por um período

de 20 minutos em local escuro. A reação foi parada com 30µL/well de solução de ácido sulfúrico diluída 1:20 em água destilada. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 492nm.

Para discriminar o ponto de corte entre positivo e negativo para a resposta sorológica mensurada no teste de ELISA, foi utilizada a adição de dois desvios padrões aos controles negativos. Os resultados foram expressos com as média das absorbâncias para cada grupo de camundongos.

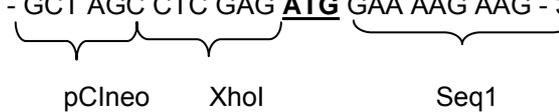
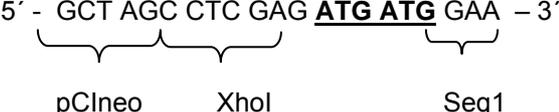
#### 4.21. Inserção do códon de iniciação

A síntese de novos primers desenhados especificamente para inserção de uma mutação pontual no início de nosso inserto foi feita baseado no seq 1 e no vetor pCIneo: como já estávamos com seq1 inserida em nosso vetor de expressão decidimos desenhar 4 primers diferentes (ver figura 6 e tabela 3). Dois primers anelariam no pCIneo e na seq 1 e outros dois anelariam apenas no início da seq1. Assim, tentamos colocar um ATG, criando um grampo nos primeiros ciclos da PCR e inserindo a mutação logo depois no início da seq 1.



**Figura 6.** Esquema da construção dos primers para inserção da mutação. Legenda: Parte da seqüência do vetor pCIneo é apresentada entre os números 1051 a 1151. Esses números correspondem a região em pb que está esta seqüência. Região em azul claro (1053 a 1074pb) é a região de anelamento do primer T7EEV; Região em cinza (1138 a 1158pb) é a região de anelamento do primer T3; seta em amarelo representa o ponto de inserção onde a seq 1 foi colocada; Região vermelha é o sítio de restrição para enzima XhoI; Região rosa é o sítio de restrição para enzima EcoRI.

**Tabela 3.** Primers criados para a inserção da mutação. Em negrito e sublinhado são as mutações que deveriam ser inseridas. Amplif. corresponde ao tamanho das amplificações que deveriam ser produzidas pelo primer em questão em conjunto com o T3.

| Designação | Sequência  | Coordenadas | Amplif. |
|------------|--|-------------|---------|
| T3         | 5' - ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA - 3'   | "Reverse"   |         |
| Primer 1   | 5' - CTC GAG <u>ATG ATG</u> GAA AAG AAG - 3'<br>     | "Forward"   | 502pb   |
| Primer 2   | 5' - CTC GAG <u>ATG ATG</u> GAA AAG AAG AGA - 3'<br> | "Forward"   | 502pb   |
| Primer 3   | 5' - GCT AGC CTC GAG <u>ATG</u> GAA AAG AAG - 3'<br> | "Forward"   | 505pb   |
| Primer 4   | 5' - GCT AGC CTC GAG <u>ATG ATG</u> GAA - 3'<br>     | "Forward"   | 508pb   |

A PCR continha 2,5 µL de Buffer 10X (Promega - USA); 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 3 µL de dNTPs (0,25mM); 1 µL de cada primer à 5mM; 1 µL do DNA plasmidial (pCneo1); 14,95 µL de água miliQ autoclavada; 0,3 µL (1,2U) de Go Taq DNA Polimerase (Promega – USA), com volume final igual a 25 µL por reação. Essa reação foi realizada em termociclador de gradiente de temperatura (Techne TC – 512) para testarmos a melhor temperatura de anelamento. O programa utilizado foi: 94°C à 2 minutos, 35 ciclos de (94°C por 30 segundos, variação de 49,6 à 61,2°C por noventa segundos e 72°C à 1 minuto; depois 72°C à sete minutos para a extensão final e 4°C “overnight”.

#### 4.22. Clonagem de Fragmentos no pGEM® - T Easy Vector

A clonagem do DNA extraído do gel foi realizado por meio do kit comercial pGEM® - T Easy Vector Systems (Promega®). O processo é dividido em etapas. Na primeira, processa-se a reação de ligação. E em seguida, a reação de transformação, a partir da qual os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar vertical.

As reações de ligação foram realizadas em tubos de 0,6 ml com 5µl de 2X *Rapid Ligation Buffer*, 1 µl (25 ng) de pGEM® - T Easy Vector, 2 µl (50 ng) do produto de PCR, 1 µl de T4 DNA ligase e 1 µl de água milliQ autoclavada. As reações depois de homogeneizadas por pipetagem foram mantidas a 4°C durante 12 horas com o objetivo de se alcançar maior eficiência de ligação.

Para a reação de transformação, retiraram-se os tubos com as células competentes do freezer -70°C e as mesmas foram descongeladas em banho de gelo. Cada tubo recebeu 10 µl da reação de ligação, foi homogeneizado lentamente e mantido no gelo por trinta minutos. Em seguida, as células foram submetidas a choque térmico, primeiro colocadas a 42°C por 45 segundos e, em seguida, a 4°C por 2 minutos. Adicionou-se 800 µl de meio SOC e permaneceu por 1 hora a 37°C, por 180xg em agitador.

Placas de Petri com meio LB sólido com 100µg/ml de ampicilina, 100 µl de IPTG (100mM) e 20 µl de X-gal (50 mg/ml) foram semeadas com 100 µl de células transformadas. As placas foram fechadas, vedadas com filme plástico, invertidas e mantidas em estufa, a 37°C durante 17 horas.

As colônias portadoras do fragmento de interesse foram identificadas pela coloração da colônia e pela técnica de PCR de colônias. A cor branca que a colônia positiva adquire está relacionada à possibilidade ou não da *E. coli* degradar a galactosidase. As colônias brancas contêm o inserto adicionado ao plasmídeo, interrompendo o gene responsável pela síntese de β-galactosidase, enzima capaz de degradar o açúcar X-gal e dar cor azul às colônias negativas.

#### **4.23. Triagem bacteriana por PCR para transformantes pGEM® - T Easy Vector + seq1**

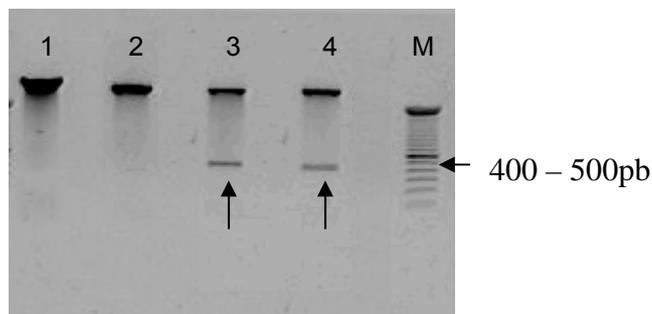
O teste de PCR de colônia foi constituído por 1X de PCR buffer 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl); 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,3 mM de dNTPs; 1,5 U de Taq DNA Polimerase e 0,4 µM dos primers M13 *forward* e *reverse*, e água milliQ autoclavada para completar um volume final de 25 µl. As reações foram submetidas a 94°C por 10 minutos, para rompimento das células e desnaturação inicial do molde; 35 ciclos sucessivos a 94°C por 30 segundos; 55°C por 60 segundos e 72°C

por 60 segundos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Em gel de agarose 1%, selecionou-se as amplificações do tamanho de acordo com o esperado.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Digestão dos plasmídeos por endonucleases de restrição

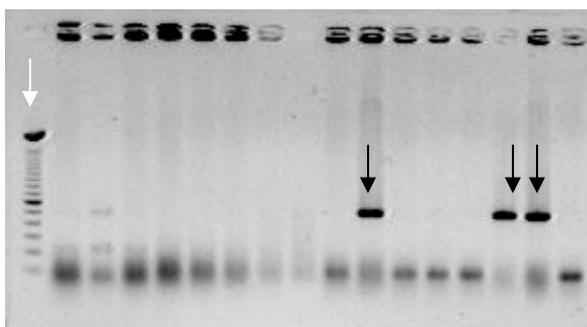
O gel de agarose 1% (figura 7) mostrou a correta clivagem do pCIneo (figurae da *seq1* (438pb) de dentro do vetor pSC-A, devido a presença de uma banda entre 400 e 500pb. Assim, estando tanto o DNA da *seq 1* como o do vetor pCIneo clivados, eles estão aptos para serem extraídos do gel de agarose, purificados e, posteriormente, ligados com T4 DNA ligase.



**Figura 7.** Gel de agarose 1%, mostrando a clivagem da seqüência 1 (fragmento de 438pb) e do vetor de expressão pCI-neo. M: representa o marcador de 100pb; 1: vetor pCI-neo íntegro (sem clivar); 2: vetor pCIneo clivado ; 3 e 4: seqüências 1 clivadas do vetor de clonagem pSCA (as setas pretas em 3 e 4 mostram exatamente o *seq1* clivado).

## 5.2. Triagem de colônias positivas por PCR

Uma reação considerada positiva na PCR de colônia deveria amplificar 544pb, dos quais, 438pb, corresponderiam ao inserto e 106pb referente a região entre os primers T3 e T7EEV. Desta forma, apenas 3 das 16 colônias foram positivas, ou seja, amplificaram bandas entre 500 - 600pb , como visualizado na figura 8.



**Figura 8.** Gel de agarose 0,8% da PCR de 16 colônias transformadas. As setas em preto representam as bandas de 547pb (438pb + 106pb) amplificadas, ou seja, colônias positivas. A seta branca mostra o marcador DNA ladder 100pb (Promega-USA).

## 5.3. Seqüenciamento do cassete de expressão (pCIneo 1)

O seqüenciamento do cassete de expressão foi feito para verificar possíveis erros durante a ligação da seq 1 no pCIneo. De acordo com os resultados obtidos (figura 9) o inserto estava com orientação e nucleotídeos, exatamente, como desenhado. Assim, a seq 1 estava corretamente inserida no vetor pCIneo, sem nenhum erro, pronta para codificar a expressão do peptídeo. A tradução da seqüência nucleotídica para a seqüência aminoacídica e a comparação desta com a seqüência desenhada por nós é mostrada na figura 10.

```

1           10           20           30           40           50
|           |           |           |           |           |
CTCGAGGAAAAAGAAGAGAGAAGCAGAAGCTTGTCTTAGCAAGCATGTTCT
AAGGAAGTTACAAGCTTGCGAACACTGTGATTGTGGAGAATGGGGAGCTA
TGAACATGACGACAAGATCATCGATTTGCTCAGATTTTCGGTAACGAGTTT
TGCAGAAACGCTTGTGGTCCAAGCATGTCTTGAGGAAGTTGCAAGCTTG
TGAACACTGTGATTGTGGTGAATGGGGTGCTATGAACATGACAACCAGAT
CCTCTATATGCTCTGATTTTCGGTAACGAGTTTGTAGGAACGCATGCCTT
TCTAAGCATGTCCTTAGAAAAGCTTCAAGCATGTGAGCATTGTGACTGTGG
AGAATGGGGTGCAATGAACATGACTACTAGATCCAGTATCTGTTCCGATT
TCGAAACGAATTTGTAGAAACGCTTGTAAGAATTC

```

**Figura 9.** Seqüência nucleotídica resultante do seqüenciamento do cassete de expressão (pCIneo 1). A região sublinhada representa o sítio de restrição XhoI e em negrito o sítio de restrição EcoRI. A região cinza são os nucleotídeos que compõem a seqüência nucleotídica que codificam o peptídeo SBm 7462 em repetição de 3x.

```

LEEKKREAEACLKSHVLRKLQACEHCDCGEWGAMNMTTRSSICSDFGNEFCRNACLKSHV seq1des
LEEKKREAEACLKSHVLRKLQACEHCDCGEWGAMNMTTRSSICSDFGNEFCRNACLKSHV seq1s

LRKLQACEHCDCGEWGAMNMTTRSSICSDFGNEFCRNACLKSHVLRKLQACEHCDCGEWG seq1des
LRKLQACEHCDCGEWGAMNMTTRSSICSDFGNEFCRNACLKSHVLRKLQACEHCDCGEWG seq1s

AMNMTTRSSICSDFGNEFCRNAC*EF seq1des
AMNMTTRSSICSDFGNEFCRNAC*EF seq1s

```

**Figura 10.** Comparação das seqüências aminoacídicas desenhada (seq1des) e da seq 1 seqüenciada (seq1s). Mostrando 100% de similaridade entre as duas seqüências (Genius Basic 3.5.6).

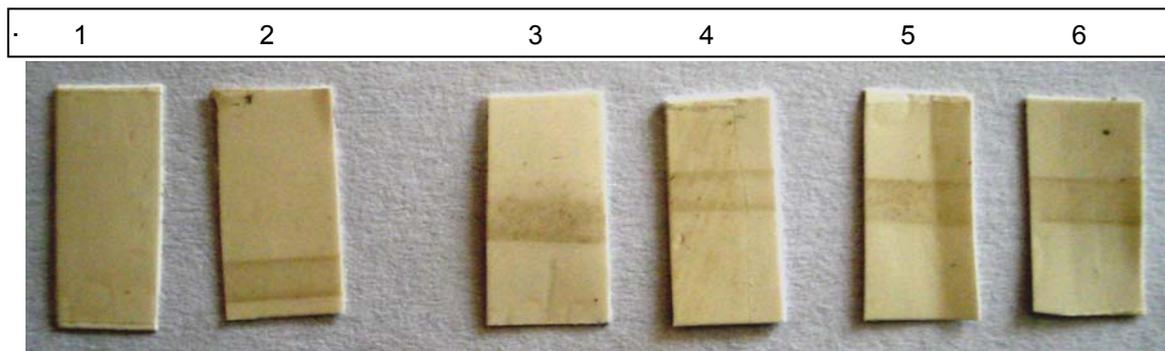
#### 5.4. Verificação da expressão do peptídeo SEQ1 *in vitro*

Para verificar se o cassete de expressão construído codificava a expressão do peptídeo SEQ1 foi realizado ensaios de PAP e DOT- ELISA, após a transfecção do pCIneo 1 em células VERO.

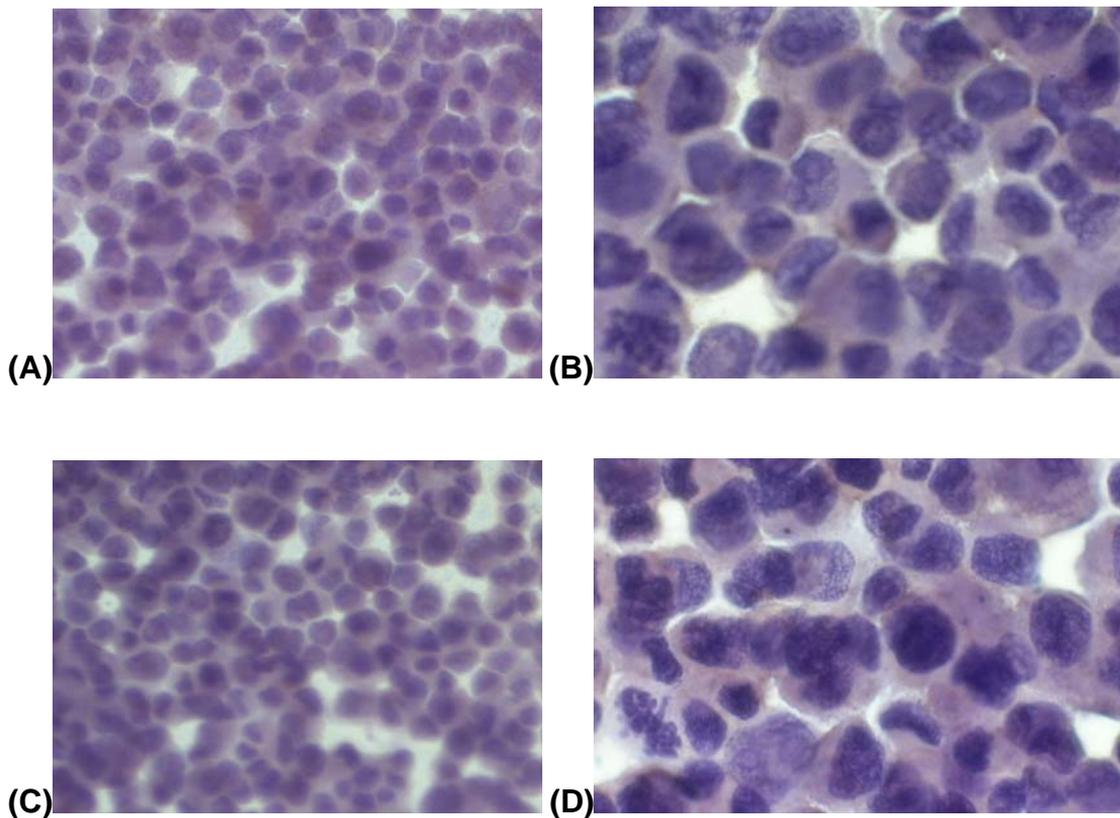
De acordo com os resultados observados no DOT-ELISA (figura 11) verificamos que não houve diferença entre o controle negativo da transfecção e os testes com o pCIneo1. Todos apresentaram “background”, exceto o controle do DOT feito com água, o que sugere reações inespecíficas. Tendo em conta que este teste

é qualitativo não poderíamos ter a certeza se as células não estavam expressando o peptídeo de forma suficiente, ou se não estavam expressando o peptídeo. Assim, resolvemos fazer um outro ensaio de transfecção, só que agora utilizando a PAP para avaliar o expressão da SEQ1 pelas células VERO. De acordo com MACEIRA & MARQUES (1985) das técnicas imuno-histoquímicas a PAP é a técnica mais sensível. O sistema PAP contém apenas anticorpos de alta afinidade para peroxidase, o que aumenta, em muito, sua eficiência.

As fotografias da reação de PAP (figura 12), como no DOT-ELISA, não demonstraram diferenças entre o controle negativo e as células transfectadas com o pCIneo 1. As lâminas positivas na reação de PAP não apresentaram regiões amarronzadas nos locais onde há ligação antígeno anticorpo (MACEIRA e MARQUES, 1985). Baseado nos resultados do PAP tivemos a informação de que as células não estavam expressando peptídeo.



**Figura 11.** Resultado do DOT- ELISA 48h após a transfecção da células VERO com 25 µg do pCIneo1 e do pCIneo vazio. Da esquerda para à direita a primeira tira (1) mostra o controle negativo do DOT, feito com água destilada autoclavada, a segunda (2) representa o controle negativo da transfecção (pCIneo vazio), em seguida (3 e 4) células transfectadas com pCIneo1 sonicadas, e em 5 e 6 células transfectadas com pCIneo1 não sonicadas.



**Figura 12.** Resultado do teste de PAP, para verificar a produção do peptídeo SEQ1, *in vitro*, 48h após a transfecção das células VERO com 25 µg do pCIneo1 e do pCIneo vazio, tiradas no microscópico (Nikon Eclipse E600) com câmera adaptada. (A) Conrole negativo: células VERO transfectadas com o vetor pCIneo vazio, sem inserto, em aumento de 40x. (B) Controle negativo em aumeto de 100x. (C) Células VERO transfectadas com o vetor pCIneo1, em aumento de 40x. (D) Células VERO em aumento de 100X. Os núcleos das células VERO apresentam-se corados em azul e o citoplasma em róseo. Todas as lâminas mostraram-se negativas no teste.

### 5.5. Avaliação dos títulos de anticorpos anti SEQ1 e anti o peptídeo sintético SBm7462

Simultaneamente aos testes *in vitro* foram realizados testes *in vivo*, inoculando o pCIneo 1 em camundongos, para verificar a produção de anticorpos anti o peptídeo SEQ1. Como observado na tabela 4 e na figura 13 não houve diferença significativa entre grupos vacinados com: PBS, pCIneo vazio e pCIneo 1, descordando de outros trabalhos com vacinas de DNA contra o *R. (B.) microplus* (DE ROSE *et al.*, 1999; RUIZ *et al.*, 2007) .

Se levarmos em consideração que o ponto de corte entre positivos e negativos é o valor da absorvância do controle negativo (no caso, a média dos animais vacinados com PBS) mais duas vezes seu desvio padrão, podemos dizer, que apenas os grupos vacinados com o peptídeo apresentaram títulos positivos no ELISA (Tabela 4).

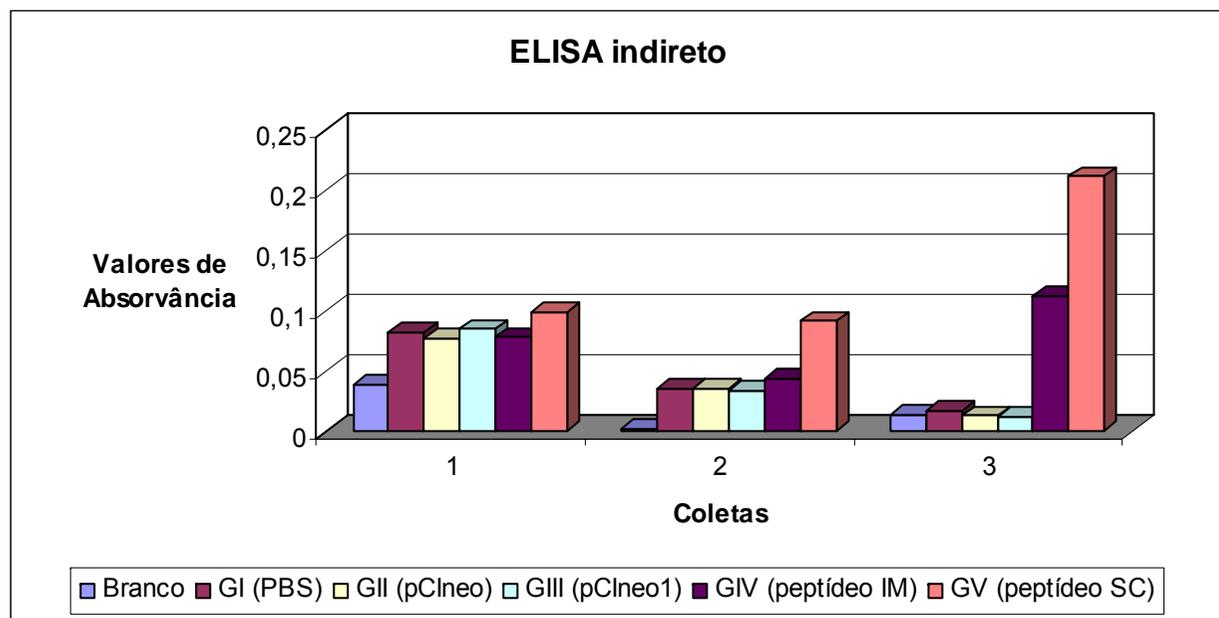
Além disso, avaliando cada coleta, pode-se construir dois gráficos. O primeiro gráfico (figura 13) plotando todos os valores das médias das absorvâncias de cada coleta em cada grupo, inclusive o grupo branco. O branco, no caso, refere-se ao controle de reagentes do ELISA. A partir disto, dois outros gráficos (figura 14 e 15) foram criados eliminando a variação dos brancos, oferecendo uma comparação mais precisa da evolução do processo.

Baseado no terceiro gráfico (figura 15) pode-se verificar que ocorreu um aumento gradual dos títulos de anticorpos anti o peptídeo SBm7462 nos dois grupos (IV e V) vacinados com o peptídeo SBm7462. O maior pico de IgG, para estes dois grupos, ocorreu após a terceira imunização com o peptídeo sintético SBm7462, concordando com trabalhos anteriores (PIMENTEL, 2002; PORTELA, 2000; SALES-JUNIOR, 2003). Contudo, houve maior aumento dos títulos no grupo V (vacinado subcutaneamente) do que no grupo IV (vacinado intramuscularmente). Como visto em outros trabalhos (RAO *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2008) a resposta imune é fortemente influenciada pela via de inoculação. De acordo com LEITNER, *et al.* (2000) em contraste com a musculatura, a pele tem importantes funções imunológicas, como sendo a “primeira linha de defesa” para o sistema imune. A não detecção de níveis significativos de imunoglobulinas da classe IgG, em nenhum dos grupos, até a segunda imunização, deve-se ao fato de que a resposta, após a primeira inoculação, corresponde a uma resposta imune primária. Nela se tem a estimulação dos clones de linfócitos B reativos aos epítomos dos peptídeos pela primeira vez, com produção mínima destas imunoglobulinas (PORTELA, 2000). Pode-se notar que nos grupos I, II e III houve uma pequena diminuição dos títulos de anticorpos durante o decorrer das três coletas, concordando com os trabalhos de WANG *et al.* (2008) que demonstraram esse tipo de resposta em coelhos quando inoculados com vetores plasmidiais vazios, ou seja, quando não há expressão de proteínas.

**Tabela 4.** Comparação das médias de absorvância óptica (492nm) obtidas no ELISA indireto para os grupos I, II, III, IV e V vacinados. Branco representa os valores em que foi zerada a absorvância.

|                 | Branco | GI (PBS) | GII (pCIneo) | GIII (pCIneo1) | GIV (peptídeo IM) | GV (peptídeo SC) | Desvio Padrão | Corte p/ Positivo |
|-----------------|--------|----------|--------------|----------------|-------------------|------------------|---------------|-------------------|
| <b>Coleta 1</b> | 0,039  | 0,083    | 0,077        | 0,085          | 0,078             | 0,100*           | 0,008         | 0,099             |
| <b>Coleta 2</b> | 0,002  | 0,035    | 0,036        | 0,034          | 0,044*            | 0,091*           | 0,003         | 0,041             |
| <b>Coleta 3</b> | 0,014  | 0,017    | 0,013        | 0,012          | 0,113*            | 0,212*           | 0,005         | 0,027             |

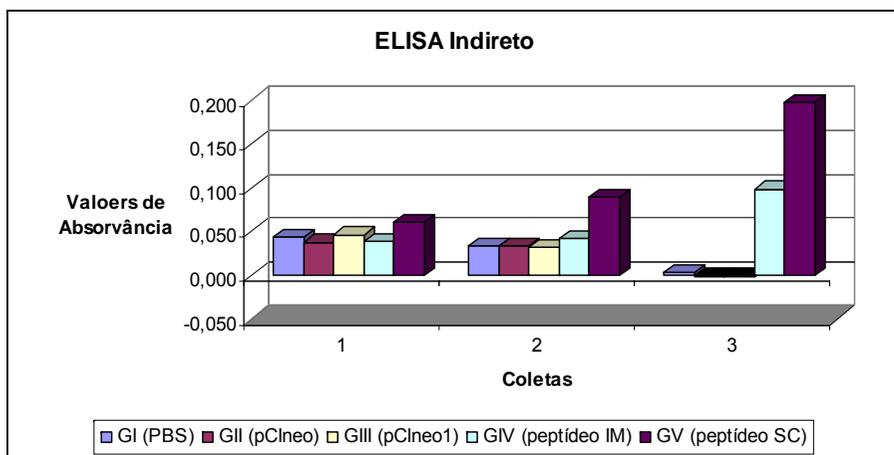
\* Representa os títulos positivos se levarmos em consideração o controle negativo mais duas vezes seu desvio padrão



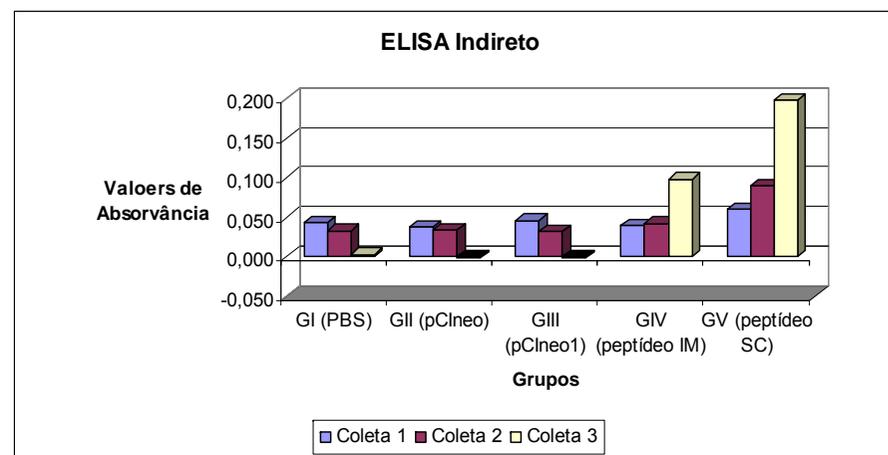
**Figura 13.** Comparação dos valores de absorvância nas três coletas realizadas em cada um dos grupos vacinados

**Tabela 5.** Comparação das médias de absorvância óptica (492nm) obtidas no ELISA indireto descontando o valor do branco de cada coleta para todos os grupos vacinados. Para descontar o branco foi usada a fórmula: (média da absorvância de cada grupo em cada coleta) – (média da absorvância do branco em cada coleta).

|                          | Coleta 1 | Coleta 2 | Coleta 3 |
|--------------------------|----------|----------|----------|
| <b>GI (PBS)</b>          | 0,044    | 0,033    | 0,003    |
| <b>GII (pCIneo)</b>      | 0,038    | 0,034    | -0,001   |
| <b>GIII (pCIneo1)</b>    | 0,046    | 0,032    | -0,002   |
| <b>GIV (peptídeo IM)</b> | 0,039    | 0,042    | 0,099    |
| <b>GV (peptídeo SC)</b>  | 0,061    | 0,089    | 0,198    |



**Figura 14.** Comparação dos valores de absorvância entre coletas descontando o valor da absorvância branca.

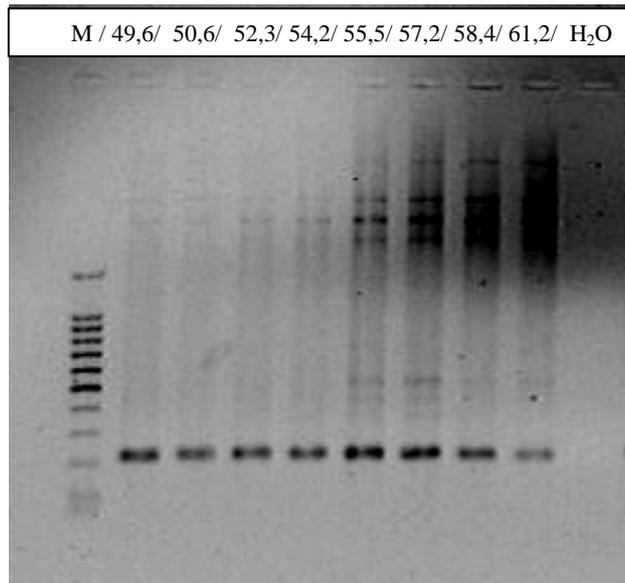


**Figura 15.** Comparação dos valores de absorvância entre grupos descontando o valor da absorvância branca.

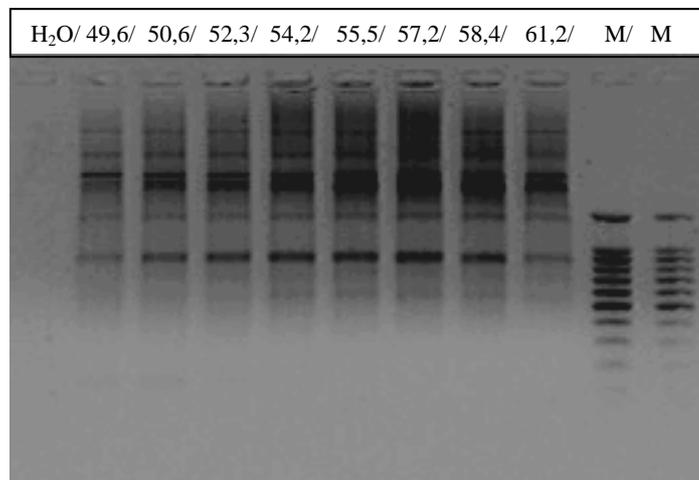
Várias pesquisas na área, demonstram que sempre há diferença nos títulos de anticorpos entre animais inoculados com uma vacina de DNA e animais do controle negativo (DE ROSE *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2005), o que não condizia com nossos resultados. Isto nos levou a examinar nosso cassete de expressão, em partes. Primeiro, o vetor pClneo: ele não apresenta códons de iniciação em nenhuma região de clonagem múltipla ou entre o sítio de início da tradução e a região de clonagem múltipla, por isso, a iniciação para a tradução deveria estar no inserto. Depois, o inserto, *seq1*: era imprescindível que ele contivesse, em seu início, três nucleotídeos (uma adenina, uma timina e uma guanina - ATG), que codificam para o aminoácido metionina. Dentro da universalidade do código genético há um aspecto restrito que se refere aos códons de iniciação. O códon AUG no RNA mensageiro é um dos sinais que determina o início da síntese de proteína, sendo, portanto, a metionina o primeiro aminoácido a ser incorporado em todas as proteínas de procariotos e eucariotos. Dessa maneira, chegou-se a conclusão que o cassete de expressão, pClneo 1, não expressava o peptídeo codificado pelo inserto (*seq1*), o motivo, era a falta de um códon de iniciação para a tradução de proteína.

## **5.6. Inserção do códon de iniciação**

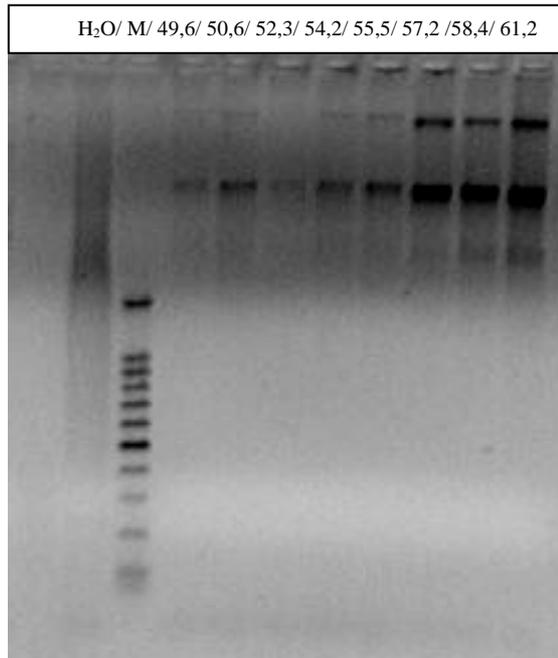
Mutação, segundo BORÉM E VIEIRA (2005), significa uma mudança na seqüência de bases de DNA por substituição, deleção ou inserção de nucleotídeos. Neste trabalho foram feitas diversas tentativas de se mutar o *seq1* por inserção de nucleotídeos. Para tentar corrigir a falta dos nucleotídeos ATG, foram construídos novos primers e através de PCRs tentou-se inserir uma mutação pontual (ATG) no início do *seq1*, logo após, os nucleotídeos que compõem o sítio de restrição da enzima XhoI (figuras de 16 à 19).



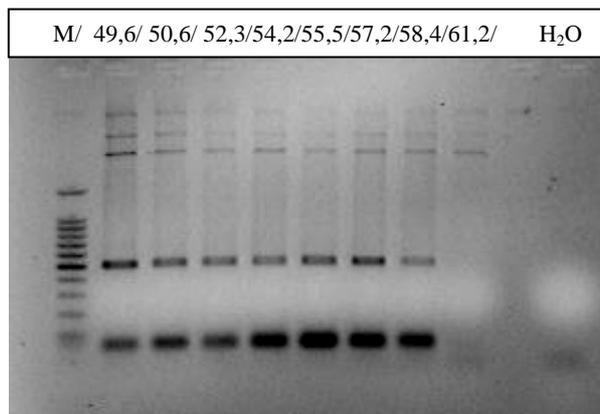
**Figura 16.** Gel de agarose 0,8% aplicado com as PCRs feitas com os primers 1 e T3, com temperatura de anelamento variando de 49,6° à 61,2°C. **M** corresponde ao marcador DNA ladder 100pb e **H<sub>2</sub>O** corresponde mix da PCR com água no lugar de DNA



**Figura 17.** Gel de agarose 0,8% aplicado com as PCRs feitas com os primers 2 e T3, com temperatura de anelamento variando de 49,6° à 61,2°C. **M** corresponde ao marcador DNA ladder 100pb e **H<sub>2</sub>O** corresponde mix da PCR com água no lugar de DNA

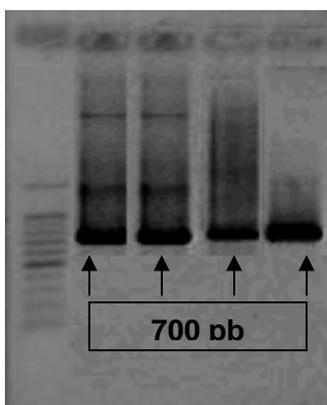


**Figura 18.** Gel de agarose 0,8% aplicado com as PCRs feitas com os primers 3 e T3, com temperatura de anelamento variando de 49,6° à 61,2°C. **M** corresponde ao marcador DNA ladder 100pb; **H<sub>2</sub>O** corresponde mix da PCR com água no lugar de DNA



**Figura 19.** Gel de agarose 0,8% aplicado com as PCRs feitas com os primers 4 e T3, com temperatura de anelamento variando de 49,6° à 61,2°C. **M** corresponde ao marcador DNA ladder 100pb; **H<sub>2</sub>O** corresponde mix da PCR com água no lugar de DNA

Como o intuito de construir esses oligonucleotídeos foi inserir pelo menos uma ATG no *seq 1*, era necessário que a PCR apresentasse ampliações em torno de 500pb. Seriam 438pb correspondentes a *seq 1*; 58 - 64pb do vetor pCIneo (dependendo do conjunto de primers utilizado) e de 3 - 6 pb de 1 ou 2 ATGs inseridos. O amplificado podia variar de 502 à 508 pb. Pelo resultado demonstrado nas fotografias dos géis de agarose (figuras 16 à 19), apenas, o primer 4 em conjunto com o T3 foi capaz de amplificar o nosso fragmento desejado de, aproximadamente, 500pb (figura 19). Então, foi a partir da extração desta banda do gel que clonou-se no pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector. Durante a realização da PCR das colônias brancas, para verificar o tamanho correto do inserto mutado, obteve-se uma banda amplificada em torno de 700pb (figura 20). Como o esperado seria 705pb, sendo 264pb correspondentes a região entre os oligonucleotídeos M13 do pGem<sup>®</sup>-T Easy Vector e mais 441pb da *seq1* com um ATG inserido, extraiu-se este DNA plasmidial (pGem + *seq 1* “mutado”) e enviou-se para seqüenciar e averiguar a correta inserção do ATG dentro do *seq 1*.



**Figura 20.** Gel de agarose 1% demonstrando a PCR de 4 colônias brancas transformadas com pGem+*seq1* teoricamente mutada. A primeira coluna demonstra um marcador de 100pb.

No resultado do seqüenciamento o ATG não estava inserido dentro do *seq1*, como prevíamos. Na figura 21 pode-se observar em (A) o resultado do seqüenciamento e em (B) o que se esperava encontrar no seqüenciamento.

1                    10                    20                    30                    40                    50

|                    |                    |                    |                    |                    |

**CTCGAG**GAAAAGAAGAGAGAAGCAGAAGCTTGTCTTAGCAAGCATGTTCT

AAGGAAGTTACAAGCTTGCGAACACTGTGATTGTGGAGAATGGGGAGCTA

TGAACATGACGACAAGATCATCGATTTGCTCAGATTTTCGGTAACGAGTTT

TGCAGAAACGCTTGTGTTGTCCAAGCATGTCTTGAGGAAGTTGCAAGCTTG

TGAACACTGTGATTGTGGTGAATGGGGTGCTATGAACATGACAACCAGAT

CCTCTATATGCTCTGATTTTCGGTAACGAGTTTTGTAGGAACGCATGCCTT

TCTAAGCATGTCCTTAGAAAAGCTTCAAGCATGTGAGCATTGTGACTGTGG

AGAATGGGGTGCAATGAACATGACTACTAGATCCAGTATCTGTTCCGATT

TCGGAAACGAATTTTGTAGAAACGCTTGTAA**GAATTC**

**(A)**

1                    10                    20                    30                    40                    50

|                    |                    |                    |                    |                    |

**CTGGAG**ATGGAGAAGAAGAGGGAGGCCGAGGCTGCCTGAGCAAGCACGT

GCTGCGGAAGCTGCAGGCCCTGCGAGCACTGCGACTGCGGCGAGTGGGGCG

CCATGAACATGACCACCAGGTCTCCATCTGCTCCGACTTCGGCAACGAG

TTCTGCCGGAACGCCTGCCTGAGCAAGCACGTGCTGCGGAAGCTGCAGGC

CTGCGAGCACTGCGACTGCGGCGAGTGGGGCGCCATGAACATGACCACCC

GGAGCAGCATCTGCAGCGACTTCGGCAACGAGTTCTGCCGGAACGCCTGC

CTGAGCAAGCACGTGCTGCGGAAGCTGCAGGCCCTGCGAGCACTGCGACTG

CGGCGAGTGGGGCGCCATGAACATGACCACCCGGAGCAGCATCTGCAGCG

ACTTCGGCAACGAGTTCUGCCGGAACGCCTGCTGA**GAATTC**

**(B)**

**Figura 21.** Resultado da reação de seqüenciamento do pGem com a seq1 mutada (A) e seqüência 1 esperada, com ATG inserido corretamente (B). Sublinhado: sítio de restrição *XhoI*, em cinza: seq1 sem nenhuma base mutada, em negro: sítio de restrição *EcoRI*.

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar a não inserção do ATG no início do seq 1. A falha na síntese dos primers é uma delas. Para descartar esta suspeita deveríamos seqüenciar os primers para conferir seus nucleotídeos componentes. Uma segunda hipótese seria a um erro de leitura da Taq DNA polimerase. ZAHA, *et al.* (2003) relata que na presença de algum “gap” ou “nick” no DNA, a ser amplificado, pode ocorrer a remoção de blocos de nucleotídeos no sentido 5'- 3'. Como esta enzima não possui um mecanismo de “proofreading”, a polimerização das regiões que foram removidas não ocorre. Uma das maneiras propostas para diminuir erros causados pela Taq DNA polimerase seria o uso de

outros tipos de DNA polimerases, por exemplo, a *Pfu* polimerase (GINOT *et al.*, 1996). Esta DNA polimerase tem a capacidade de efetuar atividade exonuclease 3'-5', conseqüentemente, a sua taxa de erro é cerca de 7 a 10 vezes menor do que a da Taq DNA polimerase. Apesar disso, corremos o risco da *Pfu* polimerase ler a nossa alça (formada pelo ATG) como um erro e tentar corrigi-lo.

Assim, antes de propormos quaisquer mudanças em *seq1* deveríamos testar essas duas hipóteses, anteriormente, citadas. No entanto, se nenhuma das questões anteriores obtiver sucesso para inserir o ATG, tem-se que lançar mão de outras alternativas.

## 5.7. Alternativas futuras

Como visto no item 2.4.4 da revisão de literatura, existem diversos fatores que podem determinar a imunogenicidade de uma vacina de DNA. Com base em alguns desses fatores propomos mudanças no *seq1* para que ele possa ser utilizada como vacina de DNA, futuramente.

O primeiro ponto que se deve tocar é a otimização do inserto. VAJDY, *et al.* (2004) afirma que mudanças na seqüência nucleotídicas de alguns genes para melhor refletir códons preferenciais usados em mamíferos pode resultar em um aumento marcante no nível de expressão em células eucarióticas. Para isto, deve-se reconstruir o *seq1*, iniciando-o com os três nucleotídeos (ATG) responsáveis pelo início da síntese de proteína. Em seguida, é necessário otimizar nossos códons para expressão de nossa proteína em bovinos, já que esta é nossa espécie alvo da vacina. RUIZ, *et al.* (2006) propõe uma otimização de códon para o gene *bm86* em bovinos. Baseado nisto, para a seleção dos melhores códons usamos um banco de dados (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) que nos fornece a informação da freqüência das trincas mais usadas em genes codificando proteínas completas (CDS) para: *Bos taurus*, *Pichia pastoris* e *Mus musculus*. Quando se comparam as tabelas de códons de *Bos taurus*, *Pichia pastoris* e *Mus musculus* (Tabela 6) verifica-se que todos os códons mais freqüentes são comuns para *Bos taurus* e *Mus musculus* exceto para o aminoácido prolina. Já com relação à *Bos taurus* e *Mus musculus* X *Pichia pastoris* são compatíveis em apenas 3 aminoácidos (CAC, AAC E AAG), diferenciam-se em todos os outros códons.

**Tabela 6.** Frequência das trincas mais usadas em CDS para: *Pichia pastoris*, *Bos taurus* e *Mus musculus*. Em cinza estão os códons mais frequentes que são comuns em *Pichia pastoris* e *Bos taurus*. Em preto com asterisco está o único códon que diferencia sua frequência em bovinos e camundongos (Fonte: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>)

*Pichia pastoris*: 137 CDS's (81301 codons)

|                  |                 |                 |                  |
|------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| UUU 24.1 ( 1963) | UCU 24.4( 1983) | UAU 16.0( 1300) | UGU 7.7 ( 626)   |
| UUC 20.6 ( 1675) | UCC 16.5( 1344) | UAC 18.1( 1473) | UGC 4.4 ( 356)   |
| UUA 15.6 ( 1265) | UCA 15.2( 1234) | UAA 0.8( 69)    | UGA 0.3 ( 27)    |
| UUG 31.5 ( 2562) | UCG 7.4( 598)   | UAG 0.5( 40)    | UGG 10.3 ( 834)  |
| CUU 15.9 ( 1289) | CCU 15.8( 1282) | CAU 11.8( 960)  | CGU 6.9 ( 564)   |
| CUC 7.6 ( 620)   | CCC 6.8( 553)   | CAC 9.1( 737)   | CGC 2.2 ( 175)   |
| CUA 10.7 ( 873)  | CCA 18.9( 1540) | CAA 25.4( 2069) | CGA 4.2 ( 340)   |
| CUG 14.9 ( 1215) | CCG 3.9( 320)   | CAG 16.3( 1323) | CGG 1.9 ( 158)   |
| AUU 31.1 ( 2532) | ACU 22.4( 1820) | AAU 25.1( 2038) | AGU 12.5 ( 1020) |
| AUC 19.4 ( 1580) | ACC 14.5( 1175) | AAC 26.7( 2168) | AGC 7.6 ( 621)   |
| AUA 11.1 ( 906)  | ACA 13.8( 1118) | AAA 29.9( 2433) | AGA 20.1 ( 1634) |
| AUG 18.7 ( 1517) | ACG 6.0( 491)   | AAG 33.8( 2748) | AGG 6.6 ( 539)   |
| GUU 26.9 ( 2188) | GCU 28.9( 2351) | GAU 35.7( 2899) | GGU 25.5 ( 2075) |
| GUC 14.9 ( 1210) | GCC 16.6( 1348) | GAC 25.9( 2103) | GGC 8.1 ( 655)   |
| GUA 9.9 ( 804)   | GCA 15.1( 1228) | GAA 37.4( 3043) | GGA 19.1 ( 1550) |
| GUG 12.3 ( 998)  | GCG 3.9( 314)   | GAG 29.0( 2360) | GGG 5.8 ( 468)   |

*Bos taurus* [gbmam]: 13374 CDS's (5198458 codons)

|                   |                   |                  |                  |
|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| UUU 16.4 ( 85145) | UCU 13.1( 68245)  | UAU 11.4( 59332) | UGU 9.3( 48369)  |
| UUC 22.3(116108)  | UCC 17.3( 89928)  | UAC 17.5( 90785) | UGC 12.6( 65350) |
| UUA 6.3( 32964)   | UCA 9.9( 51566)   | UAA 0.7( 3625)   | UGA 1.3( 6868)   |
| UUG 12.0( 62515)  | UCG 5.0( 25856)   | UAG 0.6( 3255)   | UGG 13.5( 70151) |
| CUU 11.9( 61653)  | CCU 15.8( 82198)  | CAU 9.4( 48768)  | CGU 4.6( 24131)  |
| CUC 21.2(110054)  | *CCC 20.4(105858) | CAC 15.5( 80580) | CGC 11.1( 57520) |
| CUA 6.1( 31457)   | CCA 14.6( 76133)  | CAA 10.5( 54501) | CGA 6.4( 33382)  |
| CUG 43.5(226210)  | CCG 7.8( 40554)   | CAG 35.0(182079) | CGG 12.5( 64928) |
| AUU 14.6( 75856)  | ACU 11.5( 59690)  | AAU 14.7( 76406) | AGU 11.0( 57061) |
| AUC 23.3(121241)  | ACC 20.1(104248)  | AAC 21.4(111149) | AGC 19.3(100361) |
| AUA 6.7( 34695)   | ACA 13.0( 67675)  | AAA 22.4(116304) | AGA 10.7( 55827) |
| AUG 22.5(116815)  | ACG 7.2( 37451)   | AAG 34.7(180338) | AGG 11.4( 59080) |
| GUU 10.1( 52375)  | GCU 17.9( 92920)  | GAU 20.5(106745) | GGU 10.8( 56394) |
| GUC 15.9( 82596)  | GCC 30.5(158586)  | GAC 28.2(146380) | GGC 24.4(126773) |
| GUA 6.3( 32751)   | GCA 14.3( 74440)  | GAA 26.9(139964) | GGA 16.2( 83963) |
| GUG 30.8(160334)  | GCG 8.6( 44761)   | GAG 41.9(217903) | GGG 16.8( 87308) |

*Mus musculus* [gbrod]: 53036 CDS's (24533776 codons)

|                  |                   |                  |                  |
|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| UUU 17.2(422153) | UCU 16.2(398250)  | UAU 12.2(298518) | UGU 11.4(279729) |
| UUC 21.8(535439) | UCC 18.1(444041)  | UAC 16.1(394074) | UGC 12.3(301384) |
| UUA 6.7(165150)  | UCA 11.8(289799)  | UAA 1.0( 23403)  | UGA 1.6( 40148)  |
| UUG 13.4(329668) | UCG 4.2(103815)   | UAG 0.8( 19126)  | UGG 12.5(306619) |
| CUU 13.4(329757) | CCU 18.4(450637)  | CAU 10.6(260637) | CGU 4.7(114854)  |
| CUC 20.2(495018) | *CCC 18.2(446868) | CAC 15.3(375626) | CGC 9.4(229758)  |
| CUA 8.1(198032)  | CCA 17.3(423707)  | CAA 12.0(293318) | CGA 6.6(161412)  |
| CUG 39.5(969515) | CCG 6.2(151521)   | CAG 34.1(836320) | CGG 10.2(250836) |
| AUU 15.4(377698) | ACU 13.7(335039)  | AAU 15.6(382284) | AGU 12.7(311331) |
| AUC 22.5(552184) | ACC 19.0(465115)  | AAC 20.3(499149) | AGC 19.7(483013) |
| AUA 7.4(180467)  | ACA 16.0(391437)  | AAA 21.9(537723) | AGA 12.1(297135) |
| AUG 22.8(559953) | ACG 5.6(138180)   | AAG 33.6(825270) | AGG 12.2(299472) |
| GUU 10.7(262535) | GCU 20.0(491093)  | GAU 21.0(515049) | GGU 11.4(280522) |
| GUC 15.4(377902) | GCC 26.0(637878)  | GAC 26.0(638504) | GGC 21.2(520069) |
| GUA 7.4(182733)  | GCA 15.8(388723)  | GAA 27.0(661498) | GGA 16.8(411344) |
| GUG 28.4(696158) | GCG 6.4(157124)   | GAG 39.4(965963) | GGG 15.2(372099) |

Isto nos leva a supor que mesmo se a construção atual apresentasse a seqüência para a metionina, ela ainda poderia ter uma baixa expressão em camundongos, já que possui códons preferenciais para *Pichia pastoris*. Da mesma forma, nos indica que se, futuramente, construirmos uma nova seqüência otimizada para bovinos ela deverá ser bem expressa em camundongos, pois, só há diferença de freqüência, entre estas duas espécies, em apenas em um códon (CCC), que por sinal nem é utilizado em nosso inserto.

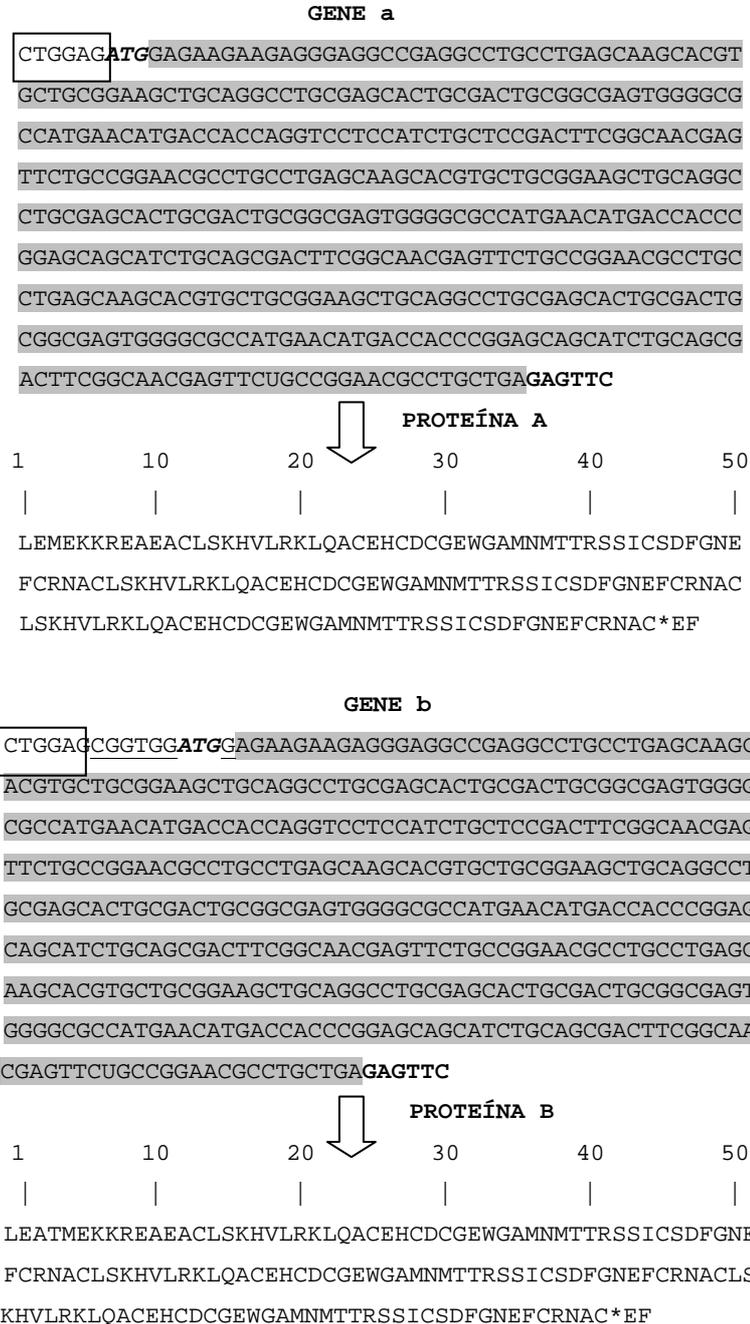
Quando defrontamos as porcentagens de CG para cada espécie em cada uma das letras dos códons utilizados (Tabela 7) vemos que: a levedura se distancia muito mais do bovino que o camundongo. As porcentagens entre *Bos taurus* e *Mus musculus*, por ambos serem mamíferos, são bem semelhantes. Isso, também, confirma nossa afirmativa que se construirmos uma seqüência otimizada para bovinos, haveria uma boa expressão em camundongos. Dessa maneira, poderíamos continuar utilizando camundongos como modelo experimental, em teste futuro, pois, estes são fáceis de lidar e requerem menos investimentos para o manejo.

**Tabela 7.** Comparação entre as porcentagens de ocorrência de CG em *Pichia pastoris*, *Bos taurus* e *Mus musculus*, no genoma e em cada posição das letras dos códons utilizados (Fonte: <http://www.kazusa.org.br>).

| <b>ESPÉCIE</b>         | <b>% DE CG</b> | <b>PRIMEIRA<br/>LETRA</b> | <b>SEGUNDA<br/>LETRA</b> | <b>TERCEIRA<br/>LETRA</b> |
|------------------------|----------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Pichia pastoris</i> | 42,73%         | 48,72%                    | 37,32%                   | 42,16%                    |
| <i>Bos taurus</i>      | 53,66%         | 56,64%                    | 41,89%                   | 62,46%                    |
| <i>Mus musculus</i>    | 52,03%         | 55,22%                    | 42,28%                   | 58,60%                    |

Além disso, assim como procariotos possuem a seqüência Shine–Dalgarno para definir o ATG do início da tradução, os eucariotos parecem ter seqüência similar. A inserção de uma seqüência Kozak (GCCa/gCCAUGG) ao redor do códon iniciador pode ser fundamental para a ótima expressão de uma proteína, em células de mamíferos (KOZAK, 1999). No entanto, de acordo com PERI & PANDEY (2001) a maioria das seqüências AUG utilizadas para início da transcrição desvia significativamente da seqüência Kozak consenso.

Com tudo isso, propomos à síntese de dois novos *seq1*, agora, denominados gene a e gene b, com códons otimizados para bovinos. O primeiro sem e o segundo com uma seqüência Kozak imediatamente anterior ao códon ATG de início da tradução (figura 25).



**Figura 22.** Estrutura dos genes A e B otimizados para bovinos com sua respectiva tradução em proteína. *XhoI* (dentro dos retângulo) e *EcoRI* (negrito) representam os sítios de restrição nas extremidades 5' e 3' respectivamente para formação de finais coesivos necessários para a incorporação no vetor plasmidial de expressão. No gene B as regiões sublinhadas representam a seqüência Kozak.

|       |  |   |    |    |    |    |    |
|-------|--|---|----|----|----|----|----|
|       | 1  | 10  | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|       |  |   |    |    |    |    |    |
| 1     | CTCGAG---  | GAAAAGAAGAGAGAAGCAGAAGCTTGTCTTAGCAAGCATGTTCTAAGGAAG |    |    |    |    |    |
| 1 atg | CTGGAGATGGAGAAGAAGAGGGAGGCCGAGGCCTGCCTGAGCAAGCACGTGCTGCGGAAG   |   |    |    |    |    |    |
| 1     | TTACAAGCTTGCGAACACTGTGATTGTGGAGAATGGGGAGCTATGAACATGACGACAAGA   |   |    |    |    |    |    |
| 1 atg | CTGCAGGCCTGCGAGCACTGCGACTGCGGCGAGTGGGGCGCCATGAACATGACCACCAGG   |   |    |    |    |    |    |
| 1     | TCATCGATTTGCTCAGATTTTCGGTAACGAGTTTTGCAGAAACGCTTGTGTTGTCCAAGCAT |   |    |    |    |    |    |
| 1 atg | TCCTCCATCTGCTCCGACTTCGGCAACGAGTTCTGCCGGAACGCCTGCCTGAGCAAGCAC   |   |    |    |    |    |    |
| 1     | GTCTTGAGGAAGTTGCAAGCTTGTGAACACTGTGATTGTGGTGAATGGGGTGCTATGAAC   |   |    |    |    |    |    |
| 1 atg | GTGCTGCGGAAGCTGCAGGCCTGCGAGCACTGCGACTGCGGCGAGTGGGGCGCCATGAAC   |   |    |    |    |    |    |
| 1     | ATGACAACCAGATCCTCTATATGCTCTGATTTTCGGTAACGAGTTTTGTAGGAACGCATGC  |   |    |    |    |    |    |
| 1 atg | ATGACCACCCGGAGCAGCATCTGCAGCGACTTCGGCAACGAGTTCTGCCGGAACGCCTGC   |   |    |    |    |    |    |
| 1     | CTTTCTAAGCATGTCCTTAGAAAGCTTCAAGCATGTGAGCATTGTGACTGTGGAGAATGG   |   |    |    |    |    |    |
| 1 atg | CTGAGCAAGCACGTGCTGCGGAAGCTGCAGGCCTGCGAGCACTGCGACTGCGGCGAGTGG   |   |    |    |    |    |    |
| 1     | GGTGCAATGAACATGACTACTAGATCCAGTATCTGTTCCGATTTTCGGAAACGAATTTTGT  |   |    |    |    |    |    |
| 1 atg | GGCGCCATGAACATGACCACCCGGAGCAGCATCTGCAGCGACTTCGGCAACGAGTTCTGC   |   |    |    |    |    |    |
| 1     | AGAAACGCTTGTTAAGAATTC  |   |    |    |    |    |    |
| 1 atg | CGGAACGCCTGCTGAGAGTTC  |   |    |    |    |    |    |

**Figura 23:** Comparação de nucleotídeos do *seq1* atual (1) e do gene A proposto (1 atg – em cinza) com códons otimizados para bovinos.

Uma outra questão que observamos em nosso trabalho foi a diferença no título de anticorpos dos camundongos vacinados com o peptídeo via IM e SC. Isto nos levou a questionar qual seria a melhor via de inoculação para essa construção, já que com relação a vacina com peptídeo sintético, SBm7462, a maior produção de anticorpos foi via SC. SHEDLOCK & WEINER *et al.* (2000) dizem que a extensão da proteção elicitada pelos vários modos de administração de uma vacina de DNA é determinada pelo “network” entre APCs/antígeno no tecido local alvo e a quantidade de plasmídeo administrado. Como as APCs são mais prevalentes na pele do que nos músculos, a via SC requer menor quantidade de plasmídeo para eliciar uma resposta no animal. Assim, a magnitude da resposta imune SC pode ser maior que a IM se compararmos uma mesma dose de DNA plasmidial pelas duas vias. Apesar disso, RUIZ, *et al.* (2007) afirmam que camundongos inoculados, intramuscularmente, com 50 µg de sua construção plasmidial apresentaram resposta imune maior do que quando imunizados via SC. Estes resultados nos levam a planejar futuras vacinações com as duas vias, IM e SC, para poder compará-las.

Além disso, BRICE, *et al.* (2007) afirmam que um aumento no intervalo das imunizações tem correlação direta com o aumento da resposta celular antígeno específica e, também, na resposta de anticorpos. Assim, propomos aumentar de 15 para 45 dias os intervalos entre as vacinações. E, fazer coletas de sangue semanais para traçar um perfil de anticorpos por ELISA indireto, além da realização de teste para averiguar a imunidade celular.

## 6. CONCLUSÕES

Nestas condições, conclui-se que o cassete de expressão, pCIneo 1, construído, para ser utilizado como vacina de DNA anti o carrapato *Ripicephalus (Boophilus) microplus*, não é capaz de expressar o peptídeo por ele codificado. Essa construção não expressou a SEQ1 *in vitro* ou *in vivo*. Desta maneira, o pCIneo 1 não deve ser utilizado como vacina de DNA.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABIUK, L.A., LITTEL-van den HURK, S.v.D., BABIUK, S., L. 1999. Immunization of animals: from DNA to dinner plate. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 72: 189-202.
- BABIUK, L.A., PONTAROLLO, R., BABIUK, S., LOEHR, B., I, LITTEL-van den HURK, S.v.D. 2003. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. **Vaccine**. 21: 649-658.
- BARKER, S., C., MURRELL, A. 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology** 129: S15–S36.
- BARKER, S.C., MURRELL, A. 2002. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. **Experimental and Applied Acarology**. 28: 55–68.
- BAROUCH, D., H, LETVIN, N., L, SEDER, R., A. 2001. The role of cytokine DNAs as vaccine adjuvants for optimization cellular immune responses. **Immunological Reviews**. 202: 266-274.
- BERGMANN-LEITNER, E., S., LEITNER, W., W. 2004. Danger, death and DNA vaccines. **Microbes and Infection**. 6: 319-327.
- BORÉM, A., VIEIRA, M., L, C. **Glossário de Biotecnologia**. Ed. Folha de Viçosa; Viçosa. 2005. 158p.
- BRICE, G., T, DOBANŐ, C., SEDEGAH, M., STEFANIAK, M., GRABER, N., L, CAMPO, J., J, CARRUCI, D., J, DOOLAN, D., L. 2007. Extended immunization intervals enhance of plasmid DNA vaccine. **Microbes and Infection**. 9: 1439-1446.
- CHENG, A., WANG, M., CHEN, X., XINI, N., DOU, W., LI, X., LIU, W., WANG, G., ZHANG, P. 2007. Cellular immune responses of BALB/c mice induced by

- intramuscular injection of PRRSV-ORF5 DNA vaccine with different doses. **Front. Agriculture China**. 1: 105-110.
- COHEN, J. 1993. Naked DNA points way to vaccines. **Science**. 259: 1691-1692.
- COUTO-PIMENTEL, J. 2002. A Vacina Sintética SBm 7462 no Controle do Carrapato R. (B.) microplus (Canestrini, 1887) em Animais Estabulados e a Campo. **Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV**, 77p.
- CRAMPTON, A., VANNIASINKAM, T. 2007. Parasite vaccines: The new generation. **Infection, Genetics and Evolution**. 7: 664-673.
- DALTON, J., P, MULCAHY, G. 2001. Parasite vaccine - a reality? . **Veterinary Parasitology**. 98: 149-167.
- DE LA FUENTE, J., KOCAN, K.M. 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. **Parasite Immunology**. 28: 275–283.
- DE LA FUENTE, J., ALMAZÁ, C., CANALES, M., DE LA LASTRA, J.M.P., KOCAN, K.M., 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.
- DE ROSE, R., TENNENT, J., McWATERS, P., CHAPLIN, P., J, WOOD, P., R, KIMPTON, W., CAHILL, R., SCHEERLINCK, J.-P., Y. 2002. Efficacy of DNA vaccination by different routes of immunisation in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 90: 55-63.
- DE ROSE, R., McKENNA, R., V, COBON, G., TENNENT, J., ZAKRZEWSKI, H., GALE, K., WOOD, P., R, SCHEERLINCK, J.-P., Y, WILLADSEN, P. 1999. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 17: 151-160.
- DOMINGUES, L., N, CUNHA, A., P, BELLO, A., C,P,P, BASTIANETTO, E., LEITE, R., C. 2008. Epidemiologia das principais parasitoses dos animais de produção. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**. 96: 36-43.
- DONNELLY, J., BERRY, K., ULMER, J., B. 2003. Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. **International Journal of Parasitology**. 33: 457-467.
- DONNELLY, J., ULMER, J., B, SHIVER, J., W, LIU, M., A. 1997. DNA VACCINES. **Annual Reviews of Immunology**. 15: 617-648.
- DUNHAM, S., P. 2002. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. **Research in Veterinary Science**. 73: 9-16.

- ESTRADA-PENÃ, A., BOUATTOUR, A., CAMICAS, J.-L., GUGLIELMONE, A., HORAK, I., JONGEJAN, F., LATIF, A., PEGRAM, R., WALKER, A., R 2006. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental and Applied Acarology** 38: 219-235.
- ESTRADA-PEÑA, A. 1999. Geostatistics and remote sensing using NOAA-AVHRR satellite imagery as predictive tools in tick distribution and habitat suitability estimations for *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology** 81: 73 - 82.
- FERREIRA, G., N, M, MONTEIRO, G., A, PRAZERES, D., M, F, CABRAL, J., M, S. 2000. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. **Tibtech**. 18: 380-387.
- GARCÍA-GARCÍA, J., C, MONTERO, C., REDONDO, M., VARGAS, M., CANALES, M., BOUÉ, O., RODRÍGUEZ, M., JOGLAR, M., MACHADO, H., GONZÁLEZ, I., L, VALDÉS, M., MÉNDEZ, L., DE LA FUENTE, J. 2000. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *R. (B.) microplus*. **Vaccine**. 18: 2275-2287.
- GARCIA-GARCIA, J.C., SOTOT, A., NIGRO, F., MAZZA, M., JOGLAR, M., HECHEVARRIA, M., LAMBERT, J., DE LA FUENTE, J. 1998. Adjuvant and immunostimulating properties of recombinant Bm86 protein expressed in *Pichia pastoris*. **Vaccine**. 16: 1053-1055.
- GARCÍA-GARCÍA, J.C., GONZÁLEZ, I., L, GONZÁLEZ, D.M., VALDÉS, M., MÉNDEZ, L., LAMBERT, J., D'AGOSTINO, B., CITRONI, D., FRAGOSO, H., ORTIZ, M., RODRIGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. 1999. Sequence variations in the *R. (B.) microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Experimental and Applied Acarology**. 23: 883-895.
- GARMORY, H.S., PERKINS, S., D, PHILLPOTTS, R., J, TITBALL, R., W. 2005. DNA vaccines for biodefence. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 57: 1343-1361.
- GenBank® DATABASE. pCI-neo Mammalian Expression Vector. No. de acesso U47120. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>. Acesso em : 15 de agosto de 2006.
- GEORGE, J.E., POUND, J.M., DAVEY, R.B. 2004. Chemical control of ticks on ttle and resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**. 129: S353-S366.

- GERDTS, V., TSANG, C., GRIEBEL, P., J, BABIUK, L.A. 2004. DNA vaccination in utero: a new approach to induce protective immunity in the newborn. **Vaccine**. 22: 1717-1727.
- GINOT, F., BORDELAIS, I., NGUYEN, S., GYAPAY, G. 1999. Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of one base overhangs. **Nucleic Acids Research**. 24: 540-541
- GONZÁLEZ LOMBANA, C. 2003. Resposta imune de bovinos vacinados com peptídeo sintético SBm7462 com vistas ao controle do *R. (B.) microplus* (CANESTRINI,1887). **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 77p.
- GRAÇA-SOUZA, A., MAYA-MONTEIRO, C., PAIVA-SILVA, G., O, BRAZ, G., R, C, PAES, M., C, SORGINE, M., H, F, OLIVEIRA, M., F, OLIVEIRA, P., L. 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. . 36: 322-335.
- GREENLAND, J., R, LETVIN, N., L. 2007. Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines. **Vaccine**. 25: 3731-3741.
- GRISI, L., MASSARD, C., L, MOYA-MONTEIRO, C., PEREIRA, J., B. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**. 21: 8-10.
- GURUNATHAN, S., KLINMAN, D., M, SEDER, R., A. 2000. DNA VACCINES: Immunology, Application, and Optimization. **Annual Reviews of Immunology**. 18: 927-974.
- HEEG, K., DALPKE, A., PETER, M., ZIMMERMANN, S. 2008. Structural requirements for uptake and recognition of CpG oligonucleotides. **International Journal of Medical Microbiology**. 298: 33-38.
- HENKE, A. 2002. DNA immunization- a new change in vaccine research? **Medical Microbiology Immunology**. 191: 187-190.
- HERNÁNDEZ, C., M, MASSARD, C., L, SOARES, C., O , FONSECA, A., H. 1997. Alterações digestivas do trato digestivo de *Boophilus microplus* pela ação de anticorpos anti - rBM86. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 6: 33-37.
- HORAK, I.G., CAMICAS, J.-L., KEIRANS, J., E. 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari:Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology** 28: 27-54.

- HOWARTH, M., ELLIOTT, T. 2001. The processing of antigens delivered as DNA vaccines. **Immunological Reviews**. 199: 27-39.
- HUANG, B., MAO, C.-P.M., PENG, S., HE, L., HUNG, C.-F., WU, T.-C. 2007. Intradermal administration of DNA vaccines combining a strategy to bypass antigen processing with a strategy to prolong dendritic cell survival enhances DNA vaccine potency. **Vaccine**. 25: 7824-7831.
- INOQUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. 1990. High efficiency of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**. 96: 23-28.
- ISHII, K., AKIRA, S. 2007. Toll or Toll-Free Adjuvant Path Toward the Optimal Vaccine Development. **Journal of Clinical Immunology**. 27: 363-371.
- ITO, Y. 1960. A tumor-producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (shope) of cottontail rabbits. **Virology**. 12: 596-601.
- IVORY, C., CHADEE, K. 2004. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. **Genetic Vaccines and Therapy**. 2: 1-8.
- JONGEJAN, F., UILENBERG, G. 2004. The global importance of ticks. **Parasitology** 129: S3–S14.
- JONSSON, N., N. 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology** 137: 1-10.
- KOZAK, M. 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. **Gene**. 234: 187-208.
- KRISHMAN, R., B. 2000. Current status of DNA vaccines veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 43: 3-11.
- LARA, F., A, LINS, U., BECHARA, G., H, OLIVEIRA, P., L. 2005. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. **The Journal of Experimental Biology**. 208: 3093-3101.
- LEDWITH, B., J, MANAN, S., TROILO, P., J, BARNUM, A., J, PAULEY, C., J, GRIFFITHS, T., G, HARPER, L., B, SHOCK, H., B, ZHANG, H., FARIS, J., E, WAY, P., A, BEARE, C., M, BAGDON, W., J, NICHOLS, W., W. 2000. Plasmid DNA Vaccines: Assay for Integration into Host Genomic DNA. **Dev. Biol. Basel**. 104: 33-43.
- LEITNER, W., W., YING, H., RESTIFO, N., P. 2000. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. **Vaccine**. 18: 765-777.

- LEWIS, P., J, COX, G., J, M, van DRUNEN LITTEL-van den HURK, S., BABIUK, L.A. 1997. Polynucleotide vaccines in animals: enhancing and modulating responses. **Vaccine**. 15: 861-864.
- LITTEL-van den HURK, S.v.D., BABIUK, S., BABIUK, L.A. 2001. Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species. **Immunological Reviews**. 199: 113-125.
- LITTEL-van den HURK, S.v.D., GERDTS, V., LOEHR, B., I, PONTAROLLO, R., RANKIN, R., UWIERA, R., BABIUK, L., A, . 2000. Recent advances in use of dna vaccines for the treatment of diseases of diseases of farmed animals. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 43: 13-28.
- MACEIRA, J., P, MARQUES, A., S. 1985. Imuno-histoquímica: Técnicas e aplicações em dermatologia. **Anais Brasileiro de dermatologia**. 60: 327-333.
- MANAM, S., LEDWITH, B., J, BARNUM, A., B, TROILO, P., J, PAULEY, C., J, HARPER, L., B, GRIFFITHS, T., G, DENISOVA, L., FOLLMER, T., T, PACCHIONE, S., J, WANG, Z., BEARE, C., M, BAGDON, W., J, NICHOLS, W., W. 2000. Plasmid DNA Vaccines: Tissue distribution and Effects of DNA Sequence, Adjuvants and Delivery Method on Intergration into Host DNA. **Intervirolgy**. 43: 273-281.
- MANDERS, P., THOMAS, R. 2000. Immunology of DNA vaccines: CpG motifs and antigen presentation. **Inflammation Reserch**. 49: 199-205.
- MAYA-MONTEIRO, C., M, ALVES, L., R, PINHAL, N., ABDALLA, D., S, P,, OLIVEIRA, P., L, . 2004. HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 34: 81-87.
- MURRELL, A., CAMPBELL, N., J.,H., BARKER, S., C. 2000. Phylogenetic Analyses of *Rhipicephalus* Ticks Indicate That the Genus *Rhipicephalus* is Paraphyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 16: 1-7.
- MURRELL, A., CAMPBELL, N., J.,H., BARKER, S., C. 2001. A Total-Evidence Phylogeny of Ticks Provides Insights into the Evolution of Life Cycles and Biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 21: 244–258.
- MUTWIRI, G., PONTAROLLO, R., BABIUK, S., GRIEBEL, P., J, LITTEL-van den HURK, S.v.D., MENA, A., TSANG, C., ALCON, V., NICHANI, A., IOANNOU, X., GOMIS, S., TOWNSEND, H., HECKER, R., POTTER, A., BABIUK, L.A. 2003. Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 91: 89-103.

- NAGATA, T., UCHIJIMA, M., YOSHIDA, A., KAWASHIMA, M., KOIDE, Y. 1999. Codon Optimization Effect on Translational Efficiency of DNA Vaccine in Mammalian Cells: Analysis of Plasmid DNA Encoding a CTL Epitope Derived from Microorganisms. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 261: 445–451.
- NAKAMURA, Y. Codon Usage Database. Disponível em: <http://www.kazusa.or.jp/codon>. Acesso em: 20 de janeiro de 2008.
- NUTTALL, P., A, TRIMNELL, A., R, ZKAZIMIROVA, M., LABUDA, M. 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**. 28: 155-163.
- O'HAGAN, D., T, SINGH, M., ULMER, J., B. 2001. Microparticles for the delivery of DNA vaccines. **Immunological Reviews**. 199: 191-200.
- OLIVEIRA, R., C. 1998. Avaliação experimental do peptídeo sintético 4912 como imunógeno para o controle de carrapato *R. (B.) microplus*. **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 72p.
- PATARROYO, J.H. 1994. Babesiose bovina: controle de vetores com vacinas a base de peptídeos sintéticos **Revista de Patologia Tropical**. 23: 145-146.
- PATARROYO, J.H., PORTELA, R.W., DE CASTRO, R.O., COUTO PIMENTEL, J., Guzman, F.Q., PATARROYO, M.E., Vargas, M.I., PRATES, A.A., DIAS MENDES, M.A. 2002. Immunization of cattle with syntetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 88: 163-172.
- PATARROYO, J.H.S., GONZÁLEZ-LOMBANA, C. 2004. Resposta immune a vacinas sintéticas anti *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 13 129-134
- pCI-neo MAMMALIAN EXPRESSION VECTOR. Boletim técnico No. 215. Disponível em: <http://www.promega.com/vectors/> . Acesso em: 15 de agosto de 2006.
- PEACHMAN, K., K. , RAO, M., ALVING, C., R. . 2003. Immunization with DNA through the skin. **Methods** 31: 232–242.
- PECONICK, A.P., SOSSAI, S., GIRÃO, F.A., RODRIGUES, M.Q.R.B., SOUZA E SILVA, C.H., GUZMAN, F.Q., PATARROYO, A.M.V., VARGAS, M.I., PATARROYO, J.H. 2008. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. **Experimental Parasitology**. 119: 37- 43.

- PERI, S., PANDEY, A. 2001. A reassessment of the translation initiation codon in vertebrates. **TRENDS in Genetics**. 17: 685-687.
- PETROVSKY, N., AGUILAR, J., CÉSAR. 2004. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. **Immunology and Cell Biology**. 82: 488-496.
- PIMENTEL, J.C. 2002. A vacina sintética SBm7462 no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em animais estabulados e a campo. **Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV, 78p.**
- PORTELA, R.W.D. 2000. Comparação experimental de três peptídeos sintéticos como imunógeno no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) **Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV, 87p.**
- PRICHARD, R., TAIT, A. 2001. The role molecular biology in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**. 98: 169-194.
- PRUD'HOMME, G., LAWSON, B., R, CHANG, Y., THEOFILOPOULOS, A., N. 2001. Immunotherapeutic gene transfer into muscle. **TRENDS in Immunology**. 22: 149-155.
- RAO, S., S, GOMEZ, P., MASCOLA, J., R, DANG, V., KRIVULKA, G., R, YU, F., LORD, C., I, SHEN, L., BAILER, R., NABEL, G., J, LETVIN, N., L 2006. Comparative evaluation of three different intramuscular delivery methods for DNA immunization in a nonhuman primate animal model. **Vaccine**. 24: 367-373.
- RODRÍGUEZ, E., G. 2004. Nonviral DNA vectors for immunization and therapy: design and methods for their obtention. **Journal of Molecular Medicine**. 82: 500-509.
- RUIZ, L., MARIA, ARMENGOL, G., HABEYCH, E., ORDUZ, S. 2006. A theoretical analysis of codon adaptation index of the *Boophilus microplus* bm86 gene directed to the optimization of DNA vaccine. **Journal of Theoretical Biology**. 239: 445-449.
- RUIZ, L., MARIA, ORDUZ, S., LÓPEZ, E., D, GUZMÁN, F., PATARROYO, M., E, ARMENGOL, G. 2007. Immune response in mice and cattle after immunization with a *Boophilus microplus* DNA vaccine containing bm 86 gene. **Veterinary Parasitology**. 144: 138-145.
- RUIZ, P., M, G, PASSOS, L., M,F, RIBEIRO, M., F, B. 2005. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. **Veterinary Parasitology**. 128: 325-331.

- SALES-JUNIOR, P., A. 2003. Utilização de microesferas biodegradáveis PLGA como sistema de liberação para a vacina sintética SBm7462 no controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): modelo experimental em camundongos. **Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV, 77p.**
- SALES-JUNIOR, P.A., GUZMAN, F., VARGAS, M.I., SOSSAI, S., PATARROYO, A.M.V., GONZÁLEZ, C.Z.L., PATARROYO, J.H. 2005. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm742. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 107: 281- 290.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A., R. 1977. DNA Sequence with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 74: 5463-5467.
- SANGSTER, N., C. 2001. Managing parasiticidae resistance. **Veterinary Parasitology**. 98: 89-109.
- SANTOS, T., R, B, GONZALES, J., C, CHIES, J., M, FARIAS, N., A, R. 1998. Transmissão transovariana de *Babesia bigemina*, (SMITH & KILBORNE, 1893) por partenógenas de *Boophilus microplus* ( CANESTRINI, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 7: 7-10.
- SCHEERLINCK, J.-P., Y. 2001. Genetics adjuvants for DNA vaccines. **Vaccine**. 19: 2647-2656.
- SHAMS, H. 2005. Recent developments in veterinary vaccinology. **The Veterinary Journal**. 170: 289-299.
- SHEDLOCK, D., J , WEINER, D., B 2000. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity **Journal of Leukocyte Biology** 68: 763-806.
- SIEGRIST, C.-A., LAMBERT, P.-H. 1997. Immunization with DNA vaccines in early life: advantages and limitation as compared to conventional vaccines. **Springer Seminars in Immunopathology**. 19: 233-243.
- SMITH, D., R, HUNGERFORD, J., WILLADSEN, P. (1995). TickGard - a commercial vaccine against the catthe tick *R. (B.) microplus*. In: Indooroopilly: Biotec Australia - CSIRO, 17p.
- SOSSAI, S. 2004. Polimorfismo do gene bm86 de *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) e análise da conservação genética dos peptídeos integrantes da vacina sintética SBm7452. **Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV, 60p.**

- SOSSAI, S., PECONICK, A.P., SALES-JÚNIOR, P.A., MARCELINO, F.C., VARGAS, M.I., NEVES, E.S., PATARROYO, J.H. 2005. Polymorphism of the bm86 in South American strains of cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**. 37: 199-214.
- TJELLE, T.E., SALTE, R., MATHIESEN, I., KJEKEN, R. 2006. A novel electroporation device for gene delivery in large animals and humans. **Vaccine** 24: 4667–4670.
- ULMER, J., B, WAHREN, B., LIU, M., A. 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. **TRENDS in Molecular Medicine**. 12: 217-222.
- ULMER, J., B, DONNELLY, J., PARKER, S., E, RHODES, G., H, FELGNER, P., L, DWARKI, V., J, GROMCOWSKI, S., H, RANDALL DECK, R., DEWITT, C., M, FRIEDMAN, A., HAWES, I., A, LEAN-DEK, K., R, MARTINEZ, D., PERRY, H., C, SHIVER, J., W, MONTGOMERY, D., L, LIU, M., A. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science**. 259: 1745-1749.
- VAJDY, M., SRIVASTAVA, I., POLO, J., DONNELLY, J., O'HAGAN, D., T, SINGH, M. 2004. Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines. **Immunology and Cell Biology**. 82: 617-627.
- van OIRSCHOT, J., T, KAASHOEK, N., J, RIJSEWIJK, F., A. 1996. Advances in development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Veterinary Microbiology**. 53: 43-54.
- WANG, S., ZHANG, C., ZHANG, L., LI, J., HUANG, Z., LU, S. 2008. The relative immunogenicity of DNA vaccines delivered by the intramuscular needle injection, electroporation and gene gun methods. **Vaccine**. in press: doi:10.1016/j.vaccine.2008.1002.1033.
- WANG, S., FARFAN-ARRIBAS, D., J, SHEN, S., CHOU, T.-H., W, HIRSCH, A., HE, F., SHAN, L. 2006. Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. **Vaccine** 24: 4531–4540.
- WANG, Z., YUAN, Z., MASTSUMOTO, M., HENGGE, U., R, CHANG, Y.-F. 2005. Immune responses with DNA vaccines encoded gene fragments of severe acute respiratory syndrome coronavirus in BALB/c mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 327: 130-135.

- WILLADSEN, P. 1997. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**. 71: 209-222.
- WILLADSEN, P. 2004. Anti-ticks vaccines. **Parasitology**. 129: S367-S387.
- WILLADSEN, P. 2006. Tick control: Thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology** 138: 161-168.
- WILLADSEN, P., JONGEJAN, F. 1999. Immunology of the Tick–Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. **Parasitology Today**. 15: 258-262.
- WILLADSEN, P., RIDING, G., A, McKENNA, R., V, KEMP, D., H, TELLAM, R., L, LANHSTEIN, J., COBON, G., S, GOUGH, J., M. 1989. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *R. (B.) microplus*. **Journal of Immunology**. 143: 1346-1351.
- WOLFF, J., A, MALONE, R., W, WILLIAMS, P., CHONG, W., ASCADI, G., JANI, A., FELGNER, P., L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**. 247: 1465-1468.
- ZAHA, A., FERREIRA, H., B, PASSAGLIA, L., M, P. **Biologia Molecular Básica**. Editora Mercado Aberto. 2003. 421p.
- ZIMMERMANN, S., DALPKE, A., HEEG, K. 2008. CpG oligonucleotídeos as adjuvant in therapeutic vaccines against parasitic infections. **International Journal of Medical Microbiology**. 298: 39-44.