UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

MARIANA OLIVEIRA NASCIMENTO

**Produção e caracterização funcional de uma nova evasina putativa
de carrapatos *Rhipicephalus microplus***

Ribeirão Preto

2019

MARIANA OLIVEIRA NASCIMENTO

**Produção e caracterização funcional de uma nova evasina putativa
de carrapatos *Rhipicephalus microplus***

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica
e Aplicada.

Orientadora: Beatriz Rossetti Ferreira

Ribeirão Preto
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Nascimento, Mariana Oliveira

Produção e caracterização funcional de uma nova evasina putativa de carrapatos *Rhipicephalus microplus*. Ribeirão Preto, 2019. 78 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Ferreira, Beatriz Rossetti.

1. *Rhipicephalus microplus*. 2. Evasina. 3. Psoríase.

Nascimento, M. O. **Produção e caracterização funcional de uma nova evasina putativa de carrapatos *Rhipicephalus microplus***. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser fundamental em minha jornada, aos meus pais Antonio e Angela, que sempre me deram forças e suporte para continuar a trilhar meu caminho e realizar os meus sonhos, e ao meu irmão, meu conselheiro nos momentos mais cruciais da minha vida.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora, professora Dra. Beatriz Rossetti Ferreira, pela oportunidade, orientação e confiança.

À aluna de doutorado Andressa Fisch pela ajuda e suporte dados durante a realização desse trabalho.

Aos amigos do laboratório, Isabela Daher, Luiz Gustavo Nogueira de Almeida, Maria Amélia Pupin, Alexsander de Moraes, Bogar Omar Araujo, Tânia Petta, pelo incentivo e auxílio durante esses anos.

Agradeço também a minha família e aos meus amigos pelo apoio incondicional.

Ao Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho por aceitar colaborar conosco e ao Me. Bruno Marcel pelos ensinamentos e auxílio nos experimentos de psoríase.

À Ana Cristine, sempre preparada para ajudar.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Bayer®, Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa (Fundep) e ao *Center for Research in Inflammatory Diseases* (CRID) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento dos trabalhos de pesquisa realizados pelo nosso grupo.

Resumo

Nascimento, M. O. **Produção e caracterização funcional de uma nova evasina putativa de carrapatos *Rhipicephalus microplus*** 2019. 78 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo, 2019.

Carrapatos são parasitas hematófagos que secretam, em sua saliva, componentes imunomoduladores capazes de promover sua alimentação e suprimir as respostas imunológicas do hospedeiro. Dentre as classes de imunomoduladores presentes na saliva, encontram-se as evasinas, proteínas com capacidade de ligarem-se a quimiocinas, inibindo sua atividade relacionada ao recrutamento de células imunes. Neste trabalho, nós descrevemos a produção recombinante e caracterização estrutural e funcional de uma nova evasina putativa, a proteína Bm-nr-264079, identificada no sialotranscriptoma do carrapato bovino *R. microplus*. Observamos que a proteína Bm-nr-264079 apresenta similaridade estrutural com outras evasinas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* já caracterizadas. A proteína foi produzida na forma recombinante com sucesso a partir da expressão em *Escherichia coli* Rosetta e purificação em condição desnaturante por cromatografia de afinidade a metais. Esta proteína apresentou atividade inibitória sobre o desenvolvimento de psoríase em modelo animal, limitando o desenvolvimento de lesão local nos animais tratados após a indução da doença por aplicação de imiquimode. A proteína Bm-nr-264079 não apresentou efeito inibidor do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis*, bactérias que comumente colonizam a pele de bovinos suscetíveis à infestação por *R. microplus*. Os resultados aqui apresentados demonstram que a proteína Bm-nr-264079, em sua forma recombinante, apresenta atividade inibidora da inflamação, com potencial atividade de evasina. Novos estudos são necessários para uma caracterização mais específica das possíveis atividades farmacológicas desta proteína.

Palavras chave: *Rhipicephalus microplus*, evasina, psoríase.

Abstract

Nascimento, M. O. **Production and functional characterization of a novel putative evasin from *Rhipicephalus microplus* ticks**. 2019. 78 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo, 2019.

Ticks are hematophagous parasites that secrete, in their saliva, immunomodulatory components capable of promoting their feeding and suppressing the immune responses of the host. Among the classes of immunomodulators present in saliva, we have the evasins, proteins capable of binding to chemokines, inhibiting the recruitment of immune cells. In this work, we describe the recombinant production and structural and functional characterization of a novel putative evasin, the protein Bm-nr-264079, identified in the sialotranscriptome of the *R. microplus* cattle tick. We have found that the protein Bm-nr-264079 shows structural similarity to other already characterized *Rhipicephalus sanguineus* tick evasins. The protein was successfully produced with expression in *Escherichia coli* Rosetta and purification in denaturing condition by metal affinity chromatography. This protein showed inhibitory activity on the development of psoriasis in the animal model, limiting the development of local lesion in the treated animals after the induction of the disease by the application of imiquimod. The protein Bm-nr-264079 showed no inhibitory effect on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis*, bacteria that commonly colonize the skin of cattle susceptible to *R. microplus* infestations. The results presented herein demonstrate that Bm-nr-264079, in its recombinant form, exhibits antiinflammatory activity with potential evasin activity. Further studies are needed to characterize more specifically the pharmacological activities of this protein.

Key words: *Rhipicephalus microplus*, evasin, psoriasis.

Sumário

1	Introdução.....	11
1.1	Carrapatos: relevância médico-veterinária e econômica	11
1.2	O papel da saliva na interface carrapato-hospedeiro.....	13
1.3	Proteínas evasinas de carrapatos.....	14
1.4	Psoríase: características gerais, imunopatogênese e tratamento.....	17
1.5	Evasina de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em modelo experimental de psoríase.....	20
2	Objetivos	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	Material e métodos.....	23
3.1	Avaliação dos transcriptomas de glândulas salivares de carrapatos <i>R. microplus</i> para seleção de uma evasina putativa.....	23
3.1.1	Base de dados de transcriptomas de carrapatos <i>R. microplus</i> e critérios de seleção dos antígenos de interesse.....	23
3.1.2	Análise filogenética.....	23
3.2	Caracterização in silico da proteína Bm-nr-264079 de <i>R. microplus</i>	23
3.2.1	Alinhamento amplo de sequências proteicas.....	23
3.2.2	Alinhamentos múltiplos de sequências proteicas.....	24
3.2.3	Modelamento da estrutura tridimensional.....	24
3.3	Produção recombinante da proteína Bm-nr-264079 de <i>R. microplus</i>	24
3.3.1	Produção do plasmídeo recombinante para expressão.....	24
3.3.1.1	Animais e estrutura experimental	24
3.3.1.2	Sequenciamento.....	24
3.3.1.3	Amplificação do plasmídeo recombinante.....	25
3.3.2	Expressão e purificação da proteína recombinante Bm-nr-264079 em <i>E. coli</i>	25
3.3.2.1	Predição dos parâmetros físico-químicos.....	25
3.3.2.2	Cultivo de <i>E. coli</i> em pequena escala para teste de expressão recombinante.....	26
3.3.2.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western blot com anticorpo anti-histidina.....	26
3.3.2.4	Cultivo de <i>E. coli</i> em larga escala para expressão recombinante.....	27

3.3.2.5	Solubilização proteica em condição não desnaturante.....	27
3.3.2.6	Solubilização proteica em condição desnaturante.....	27
3.3.2.7	Cromatografia de afinidade ao níquel.....	28
3.3.2.8	Diálise e concentração.....	28
3.3.3	Remoção do LPS da proteína recombinante Bm-nr-264079 produzida em <i>E. coli</i>	29
3.3.4	Espectrometria de massas.....	29
3.4	Produção da proteína Bm-nr-264079 de carrapatos <i>R. microplus</i> em <i>Pichia pastoris</i>	30
3.4.1	Delineamento e síntese dos plasmídeos de expressão.....	30
3.4.2	Expressão em pequena escala.....	31
3.4.3	Expressão em larga escala.....	32
3.4.4	Purificação.....	33
3.5	Atividade da proteína Bm-nr-264079 sobre o desenvolvimento de psoríase experimental em camundongos.....	33
3.5.1	Animais e condições de alojamento.....	33
3.5.2	Modelo experimental de psoríase.....	34
3.5.3	Avaliação do espessamento da pele.....	35
3.5.4	Coleta e processamento dos linfonodos drenantes.....	36
3.5.5	Coleta e processamento da pele.....	36
3.5.6	Citometria de fluxo.....	36
3.6	Atividade antimicrobiana da proteína Bm-nr-264079.....	37
3.6.1	Bactérias	37
3.6.2	Determinação do perfil de sensibilidade a antimicrobiano pelo método de microdiluição.....	37
3.6.3	Determinação do perfil de sensibilidade a antimicrobiano pelo método de disco-difusão.....	38
3.7	Análise estatística.....	38
4	Resultados e discussão.....	39
4.1	Avaliação dos transcriptomas de glândulas salivares de carrapatos <i>R. microplus</i> para seleção de uma evasina putativa.....	39
4.2	Caracterização in silico da proteína Bm-nr-264079 de <i>R. microplus</i>	41
4.3	Produção recombinante da proteína Bm-nr-264079 de <i>R. microplus</i> em <i>E. coli</i>	48
4.3.1	Delineamento, síntese e sequenciamento do plasmídeo recombinante.....	49
4.3.2	Expressão e purificação da proteína recombinante Bm-nr-264079 em <i>E. coli</i>	50

4.3.3	Remoção do LPS da proteína recombinante Bm-nr-264079 produzida em <i>E. coli</i>	57
4.3.4	Caracterização da proteína Bm-nr-264079 recombinante por espectrometria de massas.....	58
4.4	Produção da proteína Bm-nr-264079 de carrapatos <i>R. microplus</i> em <i>Pichia pastoris</i>	58
4.5	Atividade da proteína Bm-nr-264079 sobre o desenvolvimento de psoríase experimental em camundongos.....	61
4.6	Efeito antimicrobiano da proteína Bm-nr-264079.....	66
5	Conclusão.....	69
	Referências	70

1 Introdução

1.1 Carrapatos: relevância médico-veterinária e econômica

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas hematófagos obrigatórios adaptados a ingerir linfa, sangue e substratos teciduais de mamíferos, répteis, aves e anfíbios, e estão distribuídos em quase todas as regiões do planeta (ESTRADA-PEÑA et al, 2006). São transmissores de uma grande variedade de patógenos, incluindo vírus, bactérias, riquetsias e protozoários, e, embora tenham como hospedeiros preferenciais espécies animais, humanos servem como hospedeiros acidentais, podendo sofrer doenças letais decorrentes do parasitismo (de la FUENTE et al, 2008). Ainda, carrapatos podem provocar condições tóxicas severas decorrente de sua infestação, como toxicose, paralisia, irritação e alergias, tanto em humanos quanto em animais (JONGEJAN e UILENBERG, 2004). Esses fatores fazem com que as infestações por carrapatos tenham grande impacto econômico e médico, justificando os esforços para o desenvolvimento de métodos efetivos de controle do mesmo.

O carrapato *R. microplus*, que parasita bovinos, é responsável por grandes perdas econômicas para a pecuária de regiões tropicais e subtropicais. De acordo com Nuñez e colaboradores (1982), este parasita encontra-se distribuído nos rebanhos bovinos das regiões da Ásia, África, Oceania e Américas Central e do Sul entre os paralelos 32°N e 35°S, sendo um dos mais importantes parasitas que afetam a pecuária nessas zonas. No Brasil, o carrapato *R. microplus* se encontra distribuído em todo território nacional, variando sua concentração de acordo com o tipo de bovino prevalente em cada região e com as condições climáticas (GONZÁLES, 1995). Tendo em vista que a pecuária bovina é umas das atividades mais lucrativas do agronegócio, o carrapato dos bovinos tem significativo impacto econômico na indústria agropecuária mundial, com destaque para o Brasil, que possui o maior rebanho bovino comercial do mundo (JONSSON, 2006; de la FUENTE et al, 2008; PARIZI et al, 2012; LEW-TABOR et al, 2014; GRISI et al, 2002; GRISI et al, 2014). As perdas econômicas globais causadas por carrapatos e doenças transmitidas por carrapatos foram estimados entre US\$ 13,9 a 18,7 bilhões em 1997 (REHAV, 1992; DE CASTRO, 1997). Já no Brasil, o carrapato *R. microplus* foi apontado como o responsável por uma perda anual estimada em 3,2

bilhões de dólares e por uma redução de 90,24 litros na produção de leite por vaca (GRISI et al, 2014; RODRIGUES e LEITE, 2013).

Os carrapatos apresentam, ainda, grande relevância médico-veterinária, já que são os principais vetores de patógenos para animais selvagens e domésticos, e o segundo principal vetor de patógenos para humanos (de la FUENTE, 2008). Em humanos, encontra destaque a borreliose de Lyme, a doença mais comum transmitida por carrapatos na Europa e América do Norte, que pode provocar sintomatologia severa e debilitante. Diversas espécies de carrapatos transmitem patógenos causadores de encefalites e febres hemorrágicas, algumas das quais altamente letais (JONGEJAN e UILENBERG, 2004). Em animais de companhia, especialmente cães, as infestações por carrapatos *R. sanguineus* também estão associadas à transmissão de doenças como erliquiose e toxicoses (JONGEJAN e UILENBERG, 2004). As infestações em bovinos por *R. microplus* estão associadas à transmissão de patógenos como a riquetsia *Anaplasma marginale* e protozoários *Babesia bovis* e/ou *Babesia bigemina*, agentes causadores da Tristeza Parasitária Bovina (DANTAS-TORRES, CHOMEL e OTRANTO, 2012). Além da transmissão de doenças, as infestações por carrapatos provocam danos diretos aos hospedeiros decorrentes da hematofagia como inflamação, hipersensibilidade no local de inoculação do aparato bucal, perda de sangue e irritabilidade (GRISI, 2014). Devido ao impacto na agropecuária, a contenção das infestações pelo carrapato é uma contínua prioridade global.

O controle de carrapatos atualmente é realizado por meio da utilização de animais com fenótipo de resistência a carrapatos para composição dos rebanhos e, principalmente, por meio do uso de acaricidas químicos (WILLADSEN, 2004; HABECK, 2002; JONGEJAN e UILENBERG, 2004). Porém, o uso de acaricidas apresenta importantes desvantagens: seleção dos carrapatos resistentes, efeito limitado sobre a redução da infestação por carrapatos, toxicidade, contaminação da carne e leite com os resíduos químicos e contaminação do meio ambiente (JONGEJAN e UILENBERG, 2004; HENRIOUD, 2011; ABBAS et al, 2014).

O desenvolvimento de vacinas é uma importante opção no controle de carrapatos, já que é uma tecnologia sustentável e não contaminante, apresenta administração mais simples e menor probabilidade de desenvolvimento de resistência (WILLADSEN, 2004; de la FUENTE, 2015). Uma abordagem vacinal atualmente utilizada consiste na estimulação do sistema imunológico por meio de

antígenos “ocultos”, como proteínas localizadas no intestino ou em outros tecidos do carrapato, que em circunstâncias normais não são apresentados ao sistema imune e, portanto, não promovem uma reação imunológica no hospedeiro (WILLADSEN E JONGEJAN, 1999, WILLADSEN, 2004; HABECK, 2002). Vacinas recombinantes utilizando esses antígenos ocultos foram desenvolvidas em países como Cuba (Gavac™; Heber Biotec, Havana, Cuba) e Austrália (TickGard Plus™; Intervet, Bendigo, Victoria, Austrália) e têm sido comercializadas em diversos países. Estas vacinas possuem como base o antígeno Bm86, uma glicoproteína ligante de membrana derivada da superfície de células do intestino de carrapatos da espécie *R. microplus*, e induzem a produção de anticorpos pelo hospedeiro contra essa proteína intestinal do parasita (WILLADSEN, 2004; HABECK, 2002; WILLADSEN E KEMP, 1988). A administração da vacina contendo o antígeno intestinal Bm86 conferiu proteção contra infestações de *R. microplus* na Austrália, Cuba e em algumas regiões da Argentina, México, Brasil e outros países (RODRIGUEZ et al, 1995a; RODRÍGUEZ et al, 1995b; DE LA FUENTE et al, 1999; de la FUENTE et al, 1998; JONSSON et al, 2000; PARIZI et al, 2009). Entretanto, a eficiência dessa vacina ainda é controversa, sendo muito variável e pouco duradora, o que exige a manutenção do uso de acaricidas e necessidade de reforços vacinais (MASSARD et al, 1995).

Outra abordagem possível para o desenvolvimento de vacinas anticarrapatos é a utilização de antígenos “expostos”, como os antígenos salivares. Respostas eficientes contra o carrapato já foram associadas à produção de anticorpos capazes de bloquear a atividade de proteínas salivares, e em virtude disso estudos vêm sendo desenvolvidos na busca por antígenos salivares que possam ser utilizados como vacina (PETERKOVÁ, 2008).

Nosso grupo, e outros, têm investido em plataformas “ômicas” para encontrar antígenos novos para produção de novas vacinas anti-carrapatos (VALLE e GUERRERO, 2018).

1.2 O papel da saliva na interface carrapato-hospedeiro

Para realizar a hematofagia, o carrapato primeiramente realiza uma varredura na pele do hospedeiro buscando o sítio propício para sua fixação. A seguir, o parasita realiza o rompimento mecânico na epiderme do hospedeiro utilizando as quelíceras, e, em seguida, insere o hipostômio na derme do animal (MOORHOUSE,

1969; KEMP et al, 1982). Por sua vez, o hipostômio dilacera os tecidos adjacentes, promovendo a formação da cavidade de alimentação, na qual será inoculada a saliva (MOORHOUSE, 1969). Ao decorrer do repasto sanguíneo, certas espécies de hospedeiros montam respostas imunes que se sobrepõem ou anulam as moléculas presentes na saliva do carrapato, culminando na interrupção da hematofagia e da fixação do parasita à pele, com comprometimento do sucesso biológico e reprodutivo desses. Respostas eficazes contra carrapatos já foram descritas para diferentes hospedeiros e estão relacionadas à produção de citocinas de perfil Th1, produção de anticorpos e proteínas de fase aguda e desenvolvimento de resposta de hipersensibilidade cutânea tardia (BROSSARD, 1997; SCHOELER et al, 1999; BECHARA et al, 2000; PETERKOVÁ, 2008; CARVALHO et al 2008).

Em contrapartida, os carrapatos desenvolveram, ao longo da evolução, componentes salivares que são fundamentais para evasão da resposta homeostática e imunológica do hospedeiro, permitindo que sua alimentação prolongada seja bem sucedida. A saliva dos carrapatos contém várias moléculas que modulam a resposta imune do hospedeiro, favorecendo a sua alimentação, como componentes anticoagulantes e vasodilatadores (CHMELAR et al, 2012), anti-inflamatórios (DÉRUAZ et al, 2008), ligantes de histamina e de imunoglobulinas (PAESEN et al, 1999, 2000), inibidores de trombina e da agregação plaquetária (MARITZ-OLIVIER et al, 2007), ligantes de quimiocinas (FRAUENSCHUH et al, 2007), inibidores do sistema complemento (KAZIMÍROVÁ e ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013), inativadores de bradicinina e anafilotoxina (RIBEIRO e MATHER, 1998), moléculas de fixação, metaloproteases (ALI et al, 2014), dentre outros. Devido a ação inibidora da resposta imunológica do hospedeiro, as moléculas presentes na saliva do carrapato também podem favorecer a transmissão de microrganismos aos hospedeiros vertebrados (*saliva-assisted transmission* - SAT) (KAZIMÍROVÁ e ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013), porém os mecanismos moleculares desse processo são em grande parte desconhecidos (NUTTALL e LABUDA, 2008).

1.3 Proteínas evasinas de carrapatos

Conforme anteriormente descrito, os carrapatos são parasitas hematófagos que secretam na saliva várias moléculas imunomoduladoras que suprimem as defesas do hospedeiro e permitem a alimentação por longos períodos de tempo (MACHADO et al, 2010; NETO et al, 2011). Dentre os componentes

imunomoduladores descritos na saliva, encontram-se as evasinas, proteínas que se ligam seletivamente às quimiocinas e neutralizam sua atividade (HAJNICKÁ et al, 2001; FRAUENSCHUH et al, 2007). As quimiocinas pertencem a uma família de citocinas de baixo peso molecular, variando entre 7 e 15 kDa, cuja principal função está relacionada ao recrutamento de células do sistema imune inato e adquirido para o local da infecção ou inflamação. Há duas famílias principais de quimiocinas: CC ou beta-quimiocinas e CXC ou alfa-quimiocinas. Ambas são diferenciadas de acordo com a sequência de aminoácidos, sendo que a família CC apresenta dois resíduos contíguos de cisteína e a família CXC apresenta dois resíduos de cisteína separados por um aminoácido (X). De modo geral, as quimiocinas CC atuam principalmente na quimiotaxia de monócitos, basófilos, eosinófilos, linfócitos T e as células *natural killer* (NK). Por sua vez, as quimiocinas CXC estimulam principalmente a quimiotaxia de neutrófilos e possuem uma sequência Glu-Leu-Arg na região N-terminal que é fundamental para a ligação em seus receptores (PALOMINO e MARTI, 2015). Adicionalmente, encontram-se descritas quimiocinas das famílias XC e CX3C, que tem sido relacionadas a quimiotaxia de linfócitos, porém pouco ainda se sabe sobre elas (TIZARD, 2008; PALOMINO e MARTI, 2015). Na Tabela 1 estão correlacionadas algumas quimiocinas, seus receptores e interação com evasinas de carrapatos já descritas.

Tabela 1. Exemplos de quimiocinas, seus receptores e células que os expressam, e evasinas ligantes de quimiocinas já descritas

Quimiocina	Receptor	Expressão celular predominante dos receptores	Evasinas ligantes de quimiocinas já descritas
CCL3	CCR1, CCR5	Monócitos, CD imaturas e NK, linfócitos T	Evasin-1
CCL4	CCR5	Linfócitos T, monócitos, CD imaturas	Evasin-1
CCL5	CCR1, CCR2, CCR5	Monócitos, eosinófilos, linfócitos e CD imaturas	Evasin-4
CCL11	CCR3	Eosinófilos, basófilos e linfócitos	Evasin-4
CCL18	CCR8	Linfócitos T e monócitos	Evasin-1
CXCL1	CXCR2	Neutrófilos e monócitos	Evasin-3
CXCL8	CXCR1, CXCR2	Neutrófilos	Evasin-3

CD: células dendríticas, NK: *natural killer* (PALOMINO e MARTI, 2015; DÉRUAZ, 2008)

A saliva isolada de diferentes espécies de carrapatos recentemente demonstrou conter atividade neutralizadora de quimiocinas (HAJNICKA, 2001). Para caracterizar esta atividade, Frauenschuh e colaboradores (2007) construíram bibliotecas de cDNA a partir de glândulas salivares de carrapatos *R. sanguineus* conhecido como carrapato do cachorro. Os clones de cDNA foram transfectados em células de mamífero e testados quanto à ligação às quimiocinas. Por meio dessa abordagem foi possível a identificação de distintos cDNAs que codificavam novas proteínas ligantes de quimiocinas, que foram denominadas evasinas. Após a identificação das sequências responsáveis por codificar as proteínas ligantes de quimiocinas, as evasinas foram produzidas de forma recombinante em células de mamíferos e de insetos para posteriormente serem avaliadas quanto a ligação à quimiocinas por meio da Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) (FRAUENSCHUH et al, 2007). Foi observado que a Evasin-1 de carrapatos *R. sanguineus* era capaz de se ligar com alta especificidade às quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL18 (FRAUENSCHUH et al, 2007). Em posteriores experimentos, utilizando-se essa mesma abordagem, foi possível observar que a Evasin-3 de *R. sanguineus* se ligava às quimiocinas CXCL1 e CXCL8 (DÉRUAZ et al, 2008), enquanto Evasin-4 de *R. sanguineus* se ligava às quimiocinas CCL5 e CCL11 (DÉRUAZ et al, 2013). Além da identificação das quimiocinas as quais interagem, também já foram elucidadas as estruturas cristalizadas da Evasin-1 e Evasin-3 (DÉRUAZ et al, 2008) (Figura 1) e do complexo formado entre Evasin-1 e CCL3 (DIAS et al, 2009)

Figura 1. Estrutura cristalizada da Evasin-1 e Evasin-3 de carrapatos *R. sanguineus*.

Diagrama da Evasin-1 (A) e Evasin-3 (B) com a sequência de aminoácidos representando resíduos em *loops* (em verde), alfa-hélice (em vermelho) ou folha-beta (em azul) (DÉRUZ et al, 2008).

Devido a sua função inibidora da atividade de quimiocinas, evasinas de carrapatos tem sido analisadas como possíveis moléculas anti-inflamatórias utilizando modelos animais de doenças inflamatórias crônicas como fibrose pulmonar, artrite e psoríase. Estudos *in vitro* caracterizaram a Evasin-1 de *R. sanguineus* como um potente inibidor da quimiotaxia induzida por CCL3 e CCL4 em células L1.2/CCR5, que expressavam o receptor CCR5 (DÉRUZ et al, 2008).

A fim de corroborar esse achado em modelos *in vivo*, a quimiocina CCL3/MIP-1 α murino foi administrada na cavidade intraperitoneal de camundongos para avaliar a habilidade da Evasin-1 administrada sistemicamente bloquear o recrutamento de leucócitos desses animais. Nesse caso, a Evasin-1 inibiu o recrutamento de neutrófilos de maneira dose-dependente, ou seja, a inibição máxima foi observada na dose em que a proteína estava mais concentrada (DÉRUZ et al, 2008). De forma semelhante, a administração de Evasin-1 promoveu a redução no recrutamento de neutrófilos e linfócitos CD3+ em modelo murino de inflamação Th1 induzida por BSA metilado (DÉRUZ, 2008), enquanto que o recrutamento de eosinófilos ficou prejudicado em modelo de inflamação Th2 induzido por desafio antigênico nos pulmões de camundongos imunizados com ovos de *Schistosoma mansoni* (DÉRUZ, 2008). Além disso, Evasin-1 mostrou-se uma potente bloqueadora do recrutamento de células do sistema imunológico em modelos

experimentais de isquemia-reperfusão, psoríase e artrite (DÉRUAZ, 2008), e também foi capaz de inibir a letalidade e desenvolvimento de fibrose em modelo de lesão pulmonar induzida por bleomicina (RUSSO et al, 2011).

Assim como Evasin-1, Evasin-3 de *R. sanguineus* também foi um potente inibidor da inflamação mediada por neutrófilos em modelo de artrite induzida por antígeno (BSA) e evitou lesões no miocárdio por isquemia-reperfusão (MONTECUCCO et al, 2010). Por sua vez, Evasin-4 de *R. sanguineus* foi eficaz na redução da lesão miocárdica pós-infarto (BRAUNERSREUTHER et al, 2013) e da colite induzida por DSS (VIEIRA, 2009). Estes resultados indicam que as evasinas apresentam potencial terapêutico em patologias nas quais diversas quimiocinas estejam envolvidas.

1.4 Psoríase: características gerais, imunopatogênese e tratamento

Entre as inflamações cuja fisiopatologia está relacionada com o recrutamento de células imunológicas e que pode ser modulada com o uso de evasinas, encontra-se a psoríase. A psoríase é uma doença crônica mediada pelo sistema imunológico que afeta principalmente a pele e as articulações, e sofre influência de fatores genéticos acometendo aproximadamente mais de 125 milhões de pessoas no mundo, sendo que homens e mulheres são afetados igualmente. Ela pode se manifestar em qualquer idade, mas os primeiros sintomas surgem entre 18 a 39 anos ou entre 50 a 69 anos, dependendo de fatores ambientais e genéticos (GREB et al, 2016).

A psoríase pode se manifestar de diversas formas e possui gravidade variável, podendo apresentar desde formas leves e facilmente tratáveis até casos muito graves, podendo levar à incapacidade física. A Fundação Nacional Americana de Psoríase considera a doença na forma branda quando afeta menos de 3% do corpo, moderada de 3 a 10% e grave mais de 10%. Outros índices são usados para avaliar a gravidade da psoríase como *Psoriasis Area Severity Index* (PASI) e *Physician Global Assessment* (PGA), sendo o PASI mais comumente utilizado para ensaios clínicos. O Índice da Gravidade da Psoríase por Área (PASI) estabelece critérios para avaliação da gravidade e extensão da psoríase, a gravidade das lesões é avaliada de acordo com a vermelhidão, espessura das placas e descamação da pele que são classificadas por intensidade (ausente, leve, moderada e grave). Para avaliar a extensão das lesões são analisadas as seguintes áreas:

cabeça, tronco, braços e pernas, e o percentual de acometimento de cada área. O resultado das medidas combinadas gera uma pontuação que varia de 0 a 72, sendo 0 quando não há psoríase e 72 nos casos mais graves da doença (RAUT et al, 2013; GREB et al, 2016).

A psoríase pode ser desencadeada por vários fatores em indivíduos geneticamente suscetíveis como trauma, infecção (como infecção estreptocócica) e medicação (como beta-bloqueador, interferon-alfa e lítio) que possibilitam a liberação de auto-nucleotídeos que, por sua vez, podem formar complexos com peptídeos antimicrobianos liberados de queratinócitos que se ligam a receptores de células apresentadoras de antígenos, incluindo TLR7 e TLR9, tais como células dendríticas plasmocitoides. Essa ligação desencadeia a apresentação de antígenos pelas células dendríticas plasmocitoides que promove ativação e expansão clonal de células T CD8+ na derme no caso de células T de memória residentes ou nos linfonodos no caso de células T *naïve*. Em seguida, as células T CD8+ ativadas migram para a epiderme onde entram em contato com moléculas MHC classe I da superfície de queratinócitos e iniciam a liberação de fatores solúveis como citocinas, quimiocinas e mediadores da imunidade inata, que impulsionam a inflamação local e a proliferação de queratinócitos (GREB et al, 2016).

Além disso, as células dendríticas plasmocitoides possuem um papel importante na ativação de células T auxiliares, pois liberam mediadores inflamatórios (IFN- α e IFN- β) que estimulam células dendríticas mieloides a secretarem outros tipos de mediadores pró-inflamatórios como IL-12, IL-23 e TNF. Esses mediadores estimulam células T auxiliares dos subtipos Th1, Th17 e Th22, que liberam citocinas e quimiocinas. Dentre estas células, a população Th17 se destaca no desenvolvimento da psoríase, produzindo citocina IL-17 que estimula a produção de defensinas e quimiocinas, que promovem a defesa do hospedeiro e recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão, além disso, a IL-17 atua nos queratinócitos, estimulando-os a produzir TNF e CCL20, sendo este último quimiotático para células T e células dendríticas. Tanto as células Th17 e as Th22 produzem IL-22, que contribuem para o fenótipo histológico característico da psoríase como hiperplasia epidérmica, acantose e paraceratose (GREB, 2016).

Terapias tópicas envolvendo o uso de glicocorticoides e/ou derivados da vitamina D têm sido utilizadas para o controle de formas leves da doença, porém em locais de difícil tratamento pode ser usado inibidores de calcineurina. Na forma

moderada a grave da doença, a terapia sistêmica e a fototerapia podem ser utilizadas, mas apesar da fototerapia e fotoquimioterapia serem tratamentos muito eficazes, elas consomem tempo e geralmente controlam a doença apenas a curto prazo (BOEHNCKE e SCHÖN, 2015). Mais recentemente, diversos imunobiológicos tem sido aprovados para o tratamento da psoríase, principalmente anticorpos monoclonais. Esses anticorpos podem se destinar à neutralização de citocinas TNF- α , IL-12, IL-23, IL-17A e à interferência no desenvolvimento de linfócitos Th17 (PERERA et al, 2012).

Apesar das terapias reduzirem os sintomas da doença, a psoríase não tem cura conhecida, e tratamentos individualizados e testes confiáveis que possam prever respostas de cada paciente ainda não estão disponíveis. Portanto, o desenvolvimento de fármacos e/ou terapias mais eficazes é necessário (BOEHNCKE e SCHÖN, 2015). Nesse sentido, a caracterização de moléculas imunossupressoras, como evasinas de carrapatos *R. microplus*, pode ser útil para o desenvolvimento futuro de fármacos que busquem imunossupressão específica.

1.5 Evasina de *Rhipicephalus sanguineus* em modelo experimental de psoríase

A eficácia de proteínas ligantes de quimiocinais tais como evasinas de carrapatos foi investigada em modelo animal de psoríase, demonstrando que as evasinas de carrapatos possuíam potente atividade anti-inflamatória. Para esse estudo, Deruáz e colaboradores (2008) induziram a inflamação da pele em camundongos nocaute para o receptor D6 (receptor de quimiocinas envolvido apenas com a remoção e a degradação das quimiocinas da subfamília CC em diferentes condições inflamatórias) utilizando TPA (do inglês *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*), simulando um fenótipo semelhante a doença inflamatória da pele humana, psoríase, cujo processo patológico é dependente de quimiocinas como CCL3 e CCL4, que são ligantes de alta afinidade para os receptores D6. Após o desenvolvimento da inflamação cutânea induzida por TPA, doses contendo PBS (utilizado como controle negativo no experimento), anticorpo anti-TNF (utilizado como controle positivo no experimento) ou Evasin-1 foram administradas via intraperitoneal nos animais. Quatro dias após o tratamento com TPA, os animais foram anestesiados e eutanasiados e a pele foi coletada para avaliação histológica.

Desse modo, observou-se que a administração da Evasin-1 de carrapatos *R. sanguineus*, que se liga seletivamente às quimiocinas CCL3 e CCL4, reduziu significativamente os sintomas em modelo animal de inflamação da pele que se assemelha à psoríase humana no qual essas e outras quimiocinas estão implicadas na imunopatogênese. Porém, essa redução da inflamação cutânea promovida pela Evasin-1 não foi tão eficaz quanto à proporcionada pelo tratamento com anticorpo anti-TNF (DÉRUAZ et al 2008).

Tendo em vista os resultados apresentados anteriormente, elaboramos a hipótese de que evasinas putativas de carrapatos *R. microplus* poderiam apresentar atividade inibidora do sistema imunológico, em especial sobre o recrutamento de células imunes, podendo ter efeito terapêutico sobre modelos de inflamação, como a psoríase. Nesse contexto, nós propusemos a seleção, caracterização estrutural, produção recombinante e avaliação da atividade moduladora do sistema imune de uma evasina putativa presente na saliva de carrapatos *R. microplus* utilizando o modelo de psoríase experimental. Os resultados deste trabalho podem indicar a utilidade da evasina putativa como agente terapêutico em quadros inflamatórios, e também contribuir para a compreensão das estratégias de modulação do hospedeiro praticadas pelo carrapato, colaborando no desenvolvimento de melhores métodos de controle deste parasita.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar funcionalmente uma nova evasina putativa de carrapatos *R. microplus*.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e selecionar evasina putativa de carrapatos *R. microplus* para caracterização através de análises comparativas *in silico* com outras evasinas descritas.
- Produzir a evasina putativa de forma recombinante a partir de sistema heterólogo de expressão.
- Caracterizar a atividade moduladora da evasina putativa sobre o modelo de psoríase murina induzida por imiquimode.
- Caracterizar outras atividades funcionais da evasina putativa escolhida.

3 Material e métodos

3.1 Avaliação dos transcriptomas de glândulas salivares de carrapatos *R. microplus* para seleção de uma evasina putativa

3.1.1 Base de dados de transcriptomas de carrapatos *R. microplus* e critérios de seleção dos antígenos de interesse

As sequências de proteínas de carrapatos *R. microplus* Bm-nr-264079, Bm-nr-173149, Bm-tb2-103665, Bm-nr-103664 e Bm-nr-2129 foram identificadas por Garcia (2013), cujo trabalho descreve o método de obtenção das mesmas, bem como sua sequência completa. Os seguintes critérios foram avaliados para a seleção do antígeno a ser explorado neste trabalho: 1) sequência proteica completa, contendo metionina inicial e códon de terminação; 2) presença de peptídeo sinal; 3) apresentar no mínimo 50 *reads* totais no transcriptoma de *R. microplus*; 4) expressão gênica identificada nos diferentes estágios de vida do carrapato; 5) maior proximidade evolutiva com outras evasinas já descritas.

3.1.2 Análise filogenética

A construção da árvore filogenética para comparação evolutiva entre as sequências Bm-nr-173149, Bm-tb2-103665, Bm-nr-103664, Bm-nr-264079 e Bm-nr-2129 de *R. microplus* e Evasin-1 (sp|P0C8E7|) e Evasin-4 (sp|P0C8E9) de *R. sanguineus* foi realizada através da plataforma MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 5.05 (TAMURA et al, 2011) utilizando-se o método *neighbor joining* com *bootstrap* de 1000 repetições, e cálculo das distâncias evolutivas pelo método de Jones-Taylor-Thornton (JTT).

3.2 Caracterização *in silico* da proteína Bm-nr-264079 de *R. microplus*

3.2.1 Alinhamento amplo de sequências proteicas

Para a análise comparativa entre a sequência da proteína Bm-nr-264079 e evasinas de outros carrapatos ixodídeos, foi utilizada a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) associada à plataforma UniProt (PUNDIR et al, 2016). Os seguintes parâmetros foram selecionados: 1) *target database*: UniProt; 2) *E-threshold*: 10; 3) *matrix*: Auto; 4) *filtering*: none; 5) *gapped*: yes; 6) *hits*: 250.

3.2.2 Alinhamentos múltiplos de sequências proteicas

Para o alinhamento da sequência de Bm-nr-264079 com as sequências das proteínas Evasin-1, Evasin-3 e Evasin-4, foi utilizada a plataforma ClustalW (MCWILLIAM et al, 2013). Os alinhamentos foram analisados utilizando-se a ferramenta GeneDoc (NICHOLAS e HUGH, 1997).

3.2.3 Modelamento da estrutura tridimensional

Para o modelamento de sua estrutura tridimensional, a sequência de aminoácidos da proteína Bm-nr-264079 foi submetida às plataformas Swiss Model (WATERHOUSE et al, 2018), Phyre2 (KELLEY et al, 2015) e I-Tasser (ZHANG, 2008).

3.3 Produção recombinante da proteína Bm-nr-264079 de *R. microplus*

3.3.1 Produção do plasmídeo recombinante para expressão

3.3.1.1 Delineamento e produção do plasmídeo recombinante

A identificação da sequência do peptídeo sinal foi realizada através da ferramenta SignalP 4.1 (NIELSEN, 2017). A construção e síntese do gene sintético, com otimização dos códons de expressão em *E. coli*, e clonagem do mesmo em vetor de expressão pET28a(+) foi realizada por serviço terceirizado pela empresa GenScript Biotech Corp, Nova Jersey, Estados Unidos da América. A clonagem do gene codificante da proteína Bm-nr-264079 foi realizada entre os sítios das enzimas de restrição BamHI e NdeI, promovendo a expressão de 6xHisTag ligada à porção n-terminal da proteína.

3.3.1.2 Sequenciamento

Após a síntese, o plasmídeo teve a região de inserto sequenciada para confirmação da identidade do mesmo e verificação da orientação e quadro de leitura (frame) do gene clonado. Para isso, foram utilizados o primer T7 promoter/forward (Amersham Biosciences, Waukesha, WI, USA) e o kit de sequenciamento de DNA Big Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), segundo instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado pelo Centro de Pesquisas

Sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

3.3.1.3 Amplificação do plasmídeo recombinante

A amplificação do plasmídeo recombinante foi realizada em *E. coli* TOP10 (Thermo Fisher). Para isso, *E. coli* TOP10 foi semeada através de esgotamento em placa de Petri com meio de cultura Luria Bertani (LB) ágar e cultivada à 37°C durante 16 horas, a fim de se obter colônias isoladas. Para a transformação bacteriana por choque térmico, uma colônia isolada da bactéria foi introduzida em 100 µL de solução de 0,1 M de CaCl₂ a 4°C contendo 2 µL do plasmídeo de expressão reconstituído (sem prévia quantificação). O choque térmico foi realizado por incubação em gelo por 15 minutos, seguida de incubação em banho-maria a 42°C por um minuto e então novamente em gelo por dois minutos. Em seguida, foi adicionado 500 µL de meio de cultivo LB caldo e o material foi submetido à incubação a 37°C em agitador orbital a velocidade constante de 200 rotações por minuto (rpm). Após uma hora, o material foi utilizado como pré-inóculo para cultivo em 10 mL de meio LB caldo contendo o antibiótico marcador de seleção do plasmídeo, canamicina (pET28a(+), 50 µg/mL), em agitação orbital de 200 rpm por 16 horas a 37 °C. Após as 16 horas, o cultivo foi utilizado para extração do plasmídeo propagado utilizando-se o kit Illustra plasmidPrep Spin (GE Life Sciences) seguindo as recomendações do fabricante. O plasmídeo obtido foi armazenado à -20°C até seu uso.

3.3.2 Expressão e purificação da proteína recombinante Bm-nr-264079 em *E. coli*

3.3.2.1 Predição dos parâmetros físico-químicos

A predição dos parâmetros físico-químicos da proteína a ser expressa foi realizada pela ferramenta ProtParam Expasy (GASTEIGER et al, 2005). A solubilidade da proteína foi predita pela ferramenta PROSO (SMIALOWSKI et al, 2006).

3.3.2.2 Cultivo de *E. coli* em pequena escala para teste de expressão recombinante

As cepas de *E. coli* BL21 (DE3) PLysS (Thermo Fisher), Rosetta (DE3) (Novagen), BL21 (DE3) (Thermo Fischer), STAR (DE3) (Thermo Fisher) e Arctic Express (Agilent) foram utilizadas nesta etapa. Isolamento e transformação bacteriana foram realizados conforme anteriormente descrito (item 3.3.1.3), com adição do antibiótico de seleção da cepa, quando indicado pelo fabricante. O material expandido foi utilizado como pré-inóculo do teste de expressão. Para a fase efetiva de indução, 0,1 mL do pré-inóculo foi adicionado em 10 mL de meio LB caldo contendo o antibiótico de seleção da bactéria (cloranfenicol 50 µg/mL para *E. coli* Rosetta e *E. coli* PLysS, gentamicina 50 µg/mL para *E. coli* Arctic Express, sem antibiótico para as demais) e do plasmídeo (canamicina, 50 µg/mL). O material foi incubado em tubo cônico de 50 mL, em agitação orbital de 200 rpm a 37°C, sendo que o crescimento bacteriano foi acompanhado por espectrofotometria (A600nm) (Ultrospec™ 10 Cell Density Meter, Amersham Biosciences) até que atingisse densidade óptica entre 0,6 e 0,8, momento em que se iniciou a indução da expressão de proteína com isopropil-β-1-D-tiogalactosídeo (IPTG) a 0,5 mM. O cultivo foi mantido em indução por quatro horas e depois foi centrifugado a 4°C a uma velocidade de 16.000xg durante cinco minutos. Especificamente para *E. coli* Arctic Express, a temperatura de cultivo utilizada foi 13°C, e o tempo de indução total foi de 16 horas. A biomassa obtida foi ressuspensa em 1 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4).

3.3.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blot* com anticorpo anti-histidina

A biomassa dos cultivos foi diluída em tampão de amostra 5x (Tris-HCl pH 6,8, SDS, azul de bromofenol, glicerol, β-mercaptoetanol), e as amostras foram desnaturadas por fervura a 100°C por cinco minutos. Uma alíquota de 10 µl foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% desnaturante (250 V, 0,15 A por gel por aproximadamente 35 minutos). O gel foi corado com *Coomassie blue* e descorado com solução descorante (45% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético glacial) ou submetido à transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose nas condições de 25 V, 0,25 A por gel, durante 35 minutos. Em seguida foi realizado *Western blot* para identificação da proteína recombinante no cultivo total observando

a reatividade da mesma com anticorpo anti-histidina. Para isso, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado 5% diluído em PBS por uma hora à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-T (PBS + 0,01% Tween 20), a membrana foi incubada com anticorpo anti-histidina (Sigma Aldrich, A7058) diluído 1:50.000 (v/v) em PBS por duas horas à 37°C. Após três lavagens com PBS-T, a reação foi revelada utilizando-se solução colorimétrica de tetrametilbenzidina (TMB).

3.3.2.4 Cultivo de *E. coli* em larga escala para expressão recombinante

Para a expressão em larga escala, o cultivo bacteriano foi realizado conforme anteriormente descrito (item 3.3.2.2), com algumas modificações que serão aqui descritas. Para o cultivo em larga escala, 5 mL do pré-inóculo foi adicionado à 500 mL de meio LB caldo em frasco Erlenmeyer de 2 L nas condições de cultivo e indução já descritas para cada cepa. Ao final do cultivo, o material foi centrifugado a 10.000xg a 4°C durante 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e a biomassa foi congelada a -20°C para posterior solubilização. Uma amostra do material foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida, transferida para membrana de nitrocelulose e submetida à técnica de *Western blot* utilizando anticorpo anti-histidina, conforme anteriormente descrito (item 3.3.2.3).

3.3.2.5 Solubilização proteica em condição não desnaturante

A biomassa obtida pós-expressão foi submetida à solubilização em 5 volumes de solução tampão NaH_2PO_4 20 mM, pH 8,0, e à lise enzimática através da adição de lisozima (100 µg/mL) na solução. O material foi homogeneizado a 25°C por 30 minutos, sob agitação constante de 200 rpm. Em seguida, foi realizada lise mecânica por sonicação (permeação física) nas seguintes condições: amplitude de 60% em 15 ciclos de sonicação de 10 segundos com intervalo de 50 segundos entre cada ciclo. Após a sonicação, o sobrenadante foi separado da biomassa insolúvel por centrifugação a 10.000xg por 1 hora a 4°C e a solubilidade da proteína recombinante foi avaliada após eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blot*, conforme já descrito.

3.3.2.6 Solubilização proteica em condição desnaturante

Para a solubilização desnaturante, os mesmos procedimentos de lise enzimática e mecânica descritos no item anterior foram aplicados, porém o material

solúvel obtido após a centrifugação foi descartado e os corpos de inclusão resultantes foram homogeneizados em tampão de lavagem (PBS + 0,1% Triton x-100) e submetidos à centrifugação a 10.000xg por 30 minutos a 4°C, sendo esse procedimento repetido 3 vezes. Para a desnaturação, o material foi ressuspensionado em tampão de lise desnaturante (NaH₂PO₄ 9,5 mM, Na₂HPO₄ 40,5 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, ureia 6 M, pH 7,4) e mantido sob agitação a 4°C por 16 horas. O material solubilizado foi centrifugado a 10.000xg por 1,5 hora a 4°C, e o sobrenadante obtido foi clarificado utilizando primeiramente uma membrana filtrante de náilon com poro de diâmetro de 0,8 µm e posteriormente uma de 0,45 µm. A solubilidade da proteína foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida seguida por *Western blot* utilizando anticorpo anti-histidina.

3.3.2.7 Cromatografia de afinidade ao níquel

Uma vez que a proteína recombinante foi expressa ligada a uma cauda de seis histidinas em sua porção n-terminal, a proteína foi purificada utilizando-se coluna de afinidade ao níquel (Ni-Sepharose His-Trap HP, Amersham Biosciences – GE) operada por sistema de cromatografia líquida (Äkta™). Para tal, previamente à purificação, a coluna foi equilibrada com tampão de lise desnaturante (NaH₂PO₄ 9,5 mM, Na₂HPO₄ 40,5 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, ureia 6 M, pH 7,4), e em seguida a solução contendo a proteína desnaturada no mesmo tampão foi submetida à cromatografia. Após a ligação da proteína recombinante à coluna, a mesma foi lavada com 20 volumes de tampão de lise desnaturante. A proteína foi eluída utilizando-se tampão de eluição contendo alta concentração de imidazol (Na₂HPO₄ 0,02 M, NaCl 0,5 M, imidazol 0,5 M, ureia 6 M, pH 7,4) e as frações eluídas foram avaliadas quanto a sua qualidade através de eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blot*.

3.3.2.8 Diálise e concentração

Após a avaliação de qualidade, as frações eluídas foram unidas e a concentração proteica foi determinada pelo método do ácido bicinonínico – BCA (kit BCA Protein Assay, Pierce™), conforme protocolo do fabricante. A concentração final da proteína foi ajustada para 0,25 mg/mL para a etapa de diálise, realizada em membrana de celulose com poro de 3,5 kDa imersa em PBS na proporção 1 mL de proteína/100 mL de PBS, e mantida a 4°C em agitação. Durante sete dias, a cada 8

horas, foi realizada a troca gradual do tampão contendo ureia por PBS, com redução programada de 0,25 M de ureia a cada troca, até atingir a diluição máxima da ureia, momento que todo o volume do tampão era substituído por PBS. Precipitados observados ao final da diálise foram retirados através de centrifugação e filtração, e a solução proteica final foi novamente quantificada.

Após a determinação da concentração da proteína dialisada, o conteúdo solúvel resultante foi concentrado a 4°C em nova membrana de celulose recoberta com açúcar cristal, sendo o açúcar trocado de hora em hora, de modo que o volume fosse reduzido para que a proteína estivesse em uma concentração final aproximada de 0,5 mg/mL. Por fim, nova quantificação da proteína foi realizada e as amostras concentradas foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blot*.

3.3.3 Remoção do LPS da proteína recombinante Bm-nr-264079 produzida em *E. coli*

Colunas de 5 mL (Thermo Pierce, 89897) foram regeneradas através de lavagens com 10 mL de deoxicolato de sódio 1% e 10 mL de água ultrapura. Após a regeneração inicial da coluna, polimixina-B imobilizada em resina de agarose (Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel, Thermo Scientific) foi adicionada à coluna, que em seguida foi equilibrada com 10 mL de PBS apirogênico. A proteína concentrada foi adicionada à coluna e incubada a 4°C em agitação constante por uma hora, permitindo a homogeneização da resina com as amostras e, conseqüentemente, a interação da polimixina-B com o LPS. A proteína foi eluída utilizando 1 mL de PBS apirogênico e coletada em tubo cônico apirogênico de 15 mL para quantificação e armazenamento à -20°C. A concentração de LPS nas amostras foi determinada, antes e depois da remoção de endotoxinas, pelo método *Limulus ameobocyte lysate* (LAL) (Pharma & Biotech Lonza), seguindo instruções do fabricante.

3.3.4 Espectrometria de massas

Após desnaturação da amostra de proteína e eletroforese em gel de poliacrilamida, a banda correspondente a proteína Bm-nr-264079 foi removida do gel utilizando um bisturi estéril, transferida para um microtubo de 1mL e subdividida em pedaços de aproximadamente 1 mm³ para digestão trípica em gel. A proteína

presente no gel foi então convertida em um conjunto de peptídeos trípticos de acordo com os protocolos disponibilizados no servidor BIOMASS-CEFAP (<http://cefap.icb.usp.br/biomass-easy-nlc-ltq-orbitrap-velos/>). Após a digestão e extração dos peptídeos do gel, foi realizado o sequenciamento dos peptídeos obtidos através de espectrometria de massas por um serviço terceirizado (Laboratório Biomass do Centro de Facilidades para a Pesquisa (BIOMASS-CEFAP) da Universidade de São Paulo). As análises foram conduzidas em um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos ETD (Thermo) acoplado ao cromatógrafo Easy nanoLC II (Thermo), operando com uma coluna cromatográfica C18RP em um gradiente de 95 minutos. A análise dos peptídeos gerados incluiu a aquisição de espectros nos modos de varredura *full scan* para determinação da massa molecular, e CID para a identificação das sequências de aminoácidos peptídicos. Os espectros adquiridos no modo CID gerados a partir da fragmentação dos peptídeos trípticos foram processados no software Proteome Discoverer (ThermoFisher Scientific) para a identificação das sequências de aminoácidos. Para a caracterização da proteína, os dados obtidos da análise de CID foram correlacionados com sequências de aminoácidos de proteínas registradas nos bancos *Rhipicephalus* do NCBI e UniProt. Para verificação da relação entre as sequências de aminoácidos resultante da análise e as cadeias esperadas para a proteína Bm-nr-264079 recombinante, ambas as sequências foram alinhadas na plataforma Clustal Omega, para identificar o grau de equivalência entre as sequências. Para tanto, foram excluídos os aminoácidos provenientes do vetor de expressão em *E. coli*.

3.4 Produção da proteína Bm-nr-264079 de carrapatos *R. microplus* em *Pichia pastoris*

3.4.1 Delineamento e síntese dos plasmídeos de expressão

A sequência da proteína foi encaminhada para serviço terceirizado (AtumSM) para a construção dos genes sintéticos e clonagem em vetor de expressão. Para a construção dos genes, foi realizada a otimização dos códons de expressão em levedura *P. pastoris*. Em seguida, os genes sintéticos foram então clonados em vetores da série pD912 com 10 diferentes sequências sinais de secreção (provenientes da alfa-amilase, fator alfa, fator alfa com sítio de clivagem KEX, fator alfa contendo sítios de clivagem KEX e STE, glicoamilase, inulinase, invertase,

proteína assassina, lisozima e soroalbumina), sem a cauda de histidina. Após seu recebimento, os plasmídeos de expressão foram transformados em *E. coli* TOP10 para propagação, conforme descrito anteriormente, e extraídos utilizando-se kit comercial (PureYield™ Plasmid Midiprep System, Promega), seguindo-se as instruções do fabricante. Os plasmídeos purificados foram armazenados à -20°C até o uso.

3.4.2 Expressão em pequena escala

Nesta etapa, foram testadas as cepas de *P. pastoris* de três fenótipos diferentes: cepa selvagem (WT), Mut^(S) e PepΔ4. Para a preparação de células competentes, as cepas de *P. pastoris* foram cultivadas em 5-25 mL de meio YPD caldo por 16 horas à 30°C, em agitação constante de 200 rpm. Após, os cultivos foram diluídos de modo que a densidade óptica (DO_{600nm}) atingisse 0,15-0,2 em 50 mL de YPD caldo em um frasco com pelo menos 250 mL de capacidade, e incubado à 30°C/250 rpm. O crescimento da levedura foi acompanhado por espectrofotometria (A_{600nm}) até que atingisse densidade óptica entre 0,8 e 1,0, quando foi realizada a centrifugação em velocidade de 500xg por 15 minutos, à 24°C. As células foram ressuspensas em 9 mL de solução BEDS (Bicine-NaOH 10mM, etilenoglicol 3% (v/v), DMSO 5% (v/v), sorbitol 1 M, pH 8,3) com DTT (1 mM) e incubadas por 5 minutos à 30°C em agitação de 100 rpm. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas (500xg/15minutos/24°C), ressuspensas em BEDS sem DTT e armazenadas à -80°C até o seu uso.

Para a transformação com os plasmídeos codificadores da proteína Bm-nr-264079, 50 µL de células competentes foram adicionadas a 5-20 µg do plasmídeo linearizado com a enzima de restrição SacI (Thermo Fischer Scientific) e transferidas para uma cubeta de eletroporação. A suspensão foi submetida a um pulso de 1,5 kV em um eletroporador. Imediatamente após a aplicação do pulso, as leveduras transformadas foram ressuspensas em 1 mL de solução de sorbitol 1 M, e transferidas para tubo cônico de 15 mL com 500 µL de YPD caldo. As células eletroporadas foram incubadas por 1 hora à 30°C e agitação de 200 rpm. Posteriormente, as células foram cultivadas por espalhamento em placas com meio YPDS ágar suplementado com zeocina nas concentrações de 0,2 e 1 mg/mL. As placas foram incubadas à 30°C por 2-3 dias e avaliadas quanto ao crescimento de colônias.

Após a transformação, 12 colônias de cada construção foram selecionadas para avaliação da expressão proteica. Para tal, foi realizado o repique das 12 colônias em meio YPDS ágar suplementado com zeocina (0,2 e 1 mg/mL) por 1-2 dias a 30°C. Esse material foi utilizado em testes de expressão em pequena escala para avaliar e padronizar as condições de expressão da proteína em *P. pastoris*. Para a fase efetiva de indução, uma colônia isolada de cada clone, crescida preferencialmente em meio YPDS ágar com zeocina 1 mg/mL, foi adicionada em 300 µL/poço de BMD1% (KH₂PO₄ 0,2 M, YNB 13,4 g/L, biotina 0,4 mg/mL, glicose 1,1%). Esse processo foi realizado para 12 colônias previamente selecionadas. As placas foram vedadas com uma membrana respirável e incubadas por 60 horas à 28°C e agitação de 200 rpm. Após esse período, foi adicionado ao cultivo 250µL/poço de BMM2 (KH₂PO₄ 0,2 M, YNB 13,4 g/L, biotina 0,4 mg/mL, metanol 1%) para iniciar a indução do promotor AOX, com posterior incubação à 28°C por 12 horas. A indução foi mantida pela adição de 50 µL/poço de BMM10 (KH₂PO₄ 0,2 M, YNB 13,4 g/L, biotina 0,4 mg/mL, metanol 5%) a cada 24 horas por até 96 horas. Alíquotas foram coletadas antes de cada nova indução e foram centrifugados a 500xg por 5 minutos a 4°C para separação das células e sobrenadante. A expressão da proteína foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida seguida por *Western blot* utilizando anticorpo primário IgY anti-Bm-nr-264079 (1:5.000) e anticorpo secundário anti-IgY-HRP (1:10.000), realizados em condições similares às descritas para *E. coli*. Para a eletroforese, foi adicionada uma alíquota do sobrenadante do cultivo ou biomassa diluído em tampão de amostra 5x, que foi desnaturada por fervura a 100°C por 10 minutos. A amostra foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida posteriormente corado com *Coomassie blue* ou transferido em membrana de PVDF previamente tratada com metanol para realização de *Western blot*.

3.4.3 Expressão em larga escala

Para os testes de expressão em larga escala, uma colônia de *P. pastoris* já transformada foi adicionada a frascos plásticos de agitação de 2 L contendo 500 mL de BMD1%, conforme descrito anteriormente. Para a indução com metanol, foi aplicado 5 mL de metanol por 1 L de meio de cultivo, sendo o reforço feito a cada 24 horas, assim como em pequena escala. Após a expressão em larga escala, a proteína foi concentrada em tubos cônicos utilizando concentradores de amostras

Vivaspin™ 20 (GE Healthcare). Para isso, o cultivo obtido em larga escala foi centrifugado à 4800xg por 2,5 horas à 21°C, recolhendo-se o sobrenadante. O sobrenadante foi concentrado aproximadamente 50 vezes por meio da realização de trocas do meio por tampão usado na primeira cromatografia (troca aniônica, Tris 20 mM, pH 7,4) e centrifugação (4800xg/ 2,5 hora/ 21 °C).

3.4.4 Purificação

Uma vez que a proteína foi expressa sem cauda de histidina, a mesma foi purificada, primeiramente, por cromatografia de troca aniônica e, posteriormente, cromatografia de gel filtração. Para tal, o conteúdo solúvel obtido a partir de cultivo em larga escala foi clarificado utilizando-se filtração sequencial em membranas de náilon 0,8 e 0,45 µm. O material clarificado foi submetido à purificação em coluna de Q-sepharose (HiTrap Q HP 5 mL, GE Healthcare Life Sciences) utilizando-se sistema de purificação Äkta Start (GE Healthcare Life Sciences). A coluna com a proteína ligada foi lavada com 25 mL de tampão de ligação (Tris 20 mM, pH 7,4), e a proteína foi eluída da coluna utilizando-se tampão de eluição (Tris 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,4). Em seguida, o material previamente purificado foi submetido à nova purificação em coluna de gel filtração (HiLoad® 16/600 Superdex® 75 pg, 120 mL, GE Healthcare), utilizando o sistema de purificação Äkta Start. A coluna com a proteína ligada foi lavada e eluída da coluna utilizando-se tampão (Fosfato de Sódio 50 mM, NaCl 150 mM). A qualidade da purificação das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.5 Atividade da proteína Bm-nr-264079 sobre o desenvolvimento de psoríase experimental em camundongos

3.5.1 Animais e condições de alojamento

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo Campus Ribeirão Preto (USP- RP), mantidos durante a experimentação no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP. As condições de alojamento consistem em: manutenção dos animais em caixas do tipo mini-isolador (dimensões: 13Ax28Cx17L cm) em estante do tipo ventilada específica para camundongos (ALESCO Research for Life) com sistema de insuflação e exaustão de ar intra-caixa (65 trocas de ar/hora); lotação máxima de

5 camundongos por caixa (área: 150 cm²/animal); cama de maravalha trocada de 2 a 3 vezes por semana; sala com ar condicionado (temperatura constante de 23°C); iluminação controlada por timer automático (12 horas de claro e 12 horas de escuro); ração e água filtrada à vontade. Todos os experimentos estão de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram realizados em concordância com o Comitê de Ética para Animais de Experimentação (número de ofício 001/2017-1).

3.5.2 Modelo experimental de psoríase

Foram utilizados no experimento três grupos de camundongos: grupo sem indução da psoríase (G1), grupo com indução da psoríase com imiquimode e sem tratamento (G2) e o grupo com indução da psoríase com imiquimode e tratamento utilizando a proteína Bm-nr-264079 recombinante (G3).

A indução das lesões de pele semelhantes às da psoríase humana foi feita em camundongos da linhagem C57BL/6, com 10 semanas de idade e peso de aproximadamente 20 gramas, pela aplicação diária de imiquimode (IMQ - Ixium[®]). Primeiramente, o dorso dos animais foi tricotomizado utilizando máquina e creme depilatório Veet. No dia seguinte, os animais do grupo G2 e G3 foram anestesiados com Isoflurano 5% e receberam uma dose diária de 60 mg de creme contendo imiquimode a 5% comercialmente disponível (Ixium[®]) por via tópica na região dorsal depilada durante seis dias consecutivos (Figura 2). Um dia antes da indução da psoríase com imiquimode, os animais do grupo G3 foram tratados com 500 µL (60 µg/animal) da proteína Bm-nr-264079 recombinante sem LPS, por via intraperitoneal, mantendo-se o tratamento durante os seis dias consecutivos para avaliação do seu potencial anti-inflamatório, enquanto nos grupos G1 e G2, foi administrado o volume de 500 µL de solução fisiológica 0,9% por via intraperitoneal durante os 7 dias de experimento (Figura 2). O escore clínico dos animais foi monitorado diariamente de forma visual para análise dos parâmetros de eritema (0-4) e descamação (0-4), e com o auxílio do paquímetro digital avaliou-se a espessura da pele (0-4), utilizando bases do PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*).

Figura 2. Delineamento experimental em modelo animal de psoríase.

Foram utilizados no experimento três grupos: grupo não induzido (G1), grupo induzido com imiquimode sem tratamento (G2) e o grupo induzido com imiquimode (IMQ) com tratamento utilizando a proteína recombinante Bm-nr-264079. No grupo G1 foi administrado o volume de 500 μ L de solução fisiológica 0,9% por via intraperitoneal durante os 7 dias de experimento (D-1 a D5). No grupo G2, esse mesmo procedimento foi realizado além da aplicação do imiquimode durante 6 dias consecutivos (D0 a D5). Um dia antes da indução da psoríase com imiquimode, o grupo G3 foi tratado com 500 μ L de Bm-nr-264079 (60 μ g/animal), por via intraperitoneal, mantendo-se o tratamento durante 6 dias consecutivos para avaliação do seu potencial anti-inflamatório, período em que também foi aplicado o imiquimode (D0 a D5). No D6, todos os animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta do material usado nos experimentos seguintes. S.F.: Solução fisiológica. D: dia.

Ao término de seis dias de indução da psoríase com imiquimode, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cetamina (100 mg/kg) e eutanasiados pelo método de deslocamento cervical. Após esse procedimento foram seccionados fragmentos da pele da região dorsal para posterior análise.

3.5.3 Avaliação do espessamento da pele

Os tecidos da pele dos camundongos foram dissecados, seccionados em cortes longitudinais, fixados em solução tamponada de formol 10% e mantidos em etanol 70% até o momento da inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram realizados de maneira que sua espessura fosse de aproximadamente 5 μ m utilizando um micrômetro e montados nas lâminas. A coloração das secções foi

realizada com Hematoxilina e Eosina (HE) para observação geral das possíveis alterações histopatológicas.

3.5.4 Coleta e processamento dos linfonodos drenantes

Após a eutanásia dos animais, os linfonodos drenantes da pele foram coletados, distribuídos em tubos cônicos de 15 mL contendo 1 mL de RPMI-1640 (RPMI incompleto) e, em seguida, divulsionados em peneira celular com poros de 100 μm (Falcon[®]) com o auxílio de êmbolo de seringa de 1 mL, formando uma suspensão celular. As hemácias foram lisadas com o tampão de lise e as células foram centrifugadas à 4°C em velocidade 450xg durante 10 minutos. Por fim, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI completo (RPMI-1640 suplementado com 2% de soro bovino fetal) e diluídas em uma proporção de 1:40 em *Trypan blue* para contagem das células em câmara de Neubauer.

3.5.5 Coleta e processamento da pele

Após a eutanásia dos animais, a pele dorsal foi coletada, distribuída em tubos cônicos de 15 mL contendo 1 mL da solução de collagenase e liberase e, em seguida, com auxílio de uma tesoura, seccionada em vários pedaços. As amostras de pele foram agitadas por 1 hora a 37°C, e divulsionadas em peneira celular (poro de 100 μm) (Falcon[®]) com o auxílio de êmbolo de seringa de 5 mL, formando uma suspensão celular. As hemácias foram lisadas e as células foram centrifugadas à 4°C em velocidade 450xg durante 10 minutos. Por fim, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI completo (RPMI-1640 suplementado com 2% de soro bovino fetal) e diluídas em uma proporção de 1:40 em *Trypan blue* para contagem das células em câmara de Neubauer.

3.5.6 Citometria de fluxo

Após a contagem das células provenientes do processamento dos linfonodos e da pele dos camundongos dos grupos G1, G2 e G3, 2×10^6 células foram adicionadas em cada poço da placa que foi centrifugada à 4°C durante 10 minutos em uma velocidade de 450xg para sedimentação das células. Em seguida, os seguintes anticorpos monoclonais específicos para antígenos murinos conjugados a fluorocromos (1:200) foram utilizados para a marcação das células: αCD4 BV510 (BD Biosciences[®]), $\alpha\text{TCR}\gamma\delta$ FITC (BD Biosciences[®]), $\alpha\text{IL-17A}$ PE (BD Biosciences[®]),

α FoxP3 PE (BD Biosciences[®]), α Ly6G FITC (BD Biosciences[®]), α CD45 APC (BD Biosciences[®]) e α Gr-1 PerCP-Cy5 (BD Biosciences[®]). Após, as células foram tratadas de acordo com instruções do fabricante (BD Biosciences[®]) para marcação intracelular e extracelular, lavadas e adquiridas no aparelho FACSVerse (BD Biosciences[®]). Os dados foram analisados por meio do *software* FlowJo versão 10.0.

3.6 Atividade antimicrobiana da proteína Bm-nr-264079

3.6.1 Bactérias

As bactérias *Staphylococcus aureus* da linhagem ATCC 33591 e *Streptococcus uberis* da linhagem NCTC 3858 foram utilizadas nos testes de sensibilidade a antimicrobianos pelos métodos de microdiluição e de disco-difusão. As cepas foram semeadas, por técnica de esgotamento, em meio TSB Ágar e incubadas em estufa à 37°C por 24 horas. Em seguida, com o auxílio de uma alça, as colônias foram retiradas para preparação de suspensões bacterianas, introduzidas em tubo cônico contendo 20 mL de meio LB caldo e incubadas à 37°C sob agitação constante de 200 rpm. O crescimento bacteriano foi acompanhado por espectrofotometria (A600 nm) (Ultrospec™ 10 Cell Density Meter, Amersham Biosciences) até que atingisse densidade óptica de 0,1.

3.6.2 Determinação do perfil de sensibilidade a antimicrobiano pelo método de microdiluição

Após o cultivo das cepas em meio LB caldo até que seu crescimento atingisse D.O. de 0,1 (conforme descrito no item anterior), o inóculo foi diluído na proporção de 1:10 em meio LB caldo. Para a realização do teste por microdiluição, em cada poço da microplaca, 100 μ L da suspensão bacteriana foi adicionada em 50 μ L de proteína recombinante para as concentrações finais de 100,6 μ g/mL, 50,3 μ g/mL, 25,15 μ g/mL, 12,58 μ g/mL, 6,29 μ g/mL, 3,14 μ g/mL. Nos poços correspondentes ao controle de contaminação do meio de cultivo utilizado no experimento, foi adicionado 150 μ L de meio LB caldo em cada poço. Como controle positivo, foi adicionado 50 μ L de uma solução dos antibióticos de ampicilina e penicilina (59 μ g/mL de cada) em 100 μ L da suspensão bacteriana. Como controle negativo, foi adicionado 50 μ L de meio LB caldo em 100 μ L da suspensão bacteriana. Por fim, nos poços para o branco da proteína, foi adicionado 50 μ L de proteína Bm-nr-264079 recombinante

nas concentrações já citadas acima em 100 µL de meio LB. Os testes foram feitos em duplicata para cada amostra. Posteriormente, a placa foi incubada na estufa à 37°C por 24 horas, e após esse período, a absorbância foi lida em comprimento de onda de 600 nm.

3.6.3 Determinação do perfil de sensibilidade a antimicrobiano pelo método de disco-difusão

As cepas utilizadas no experimento foram cultivadas em meio LB caldo até o crescimento bacteriano atingir a D.O. de 0,1 conforme já descrito no item anterior. Em seguida, 100 µL do inóculo foi semeado uniformemente na superfície do meio TSB Ágar com o auxílio de um espalhador de células estéril de formato T. Com uma pinça esterilizada, os discos previamente preparados a partir de papéis de cromatografia de celulose e autoclavados foram aplicados nas placas de TSB Ágar. Os discos testados continham proteína Bm-nr-264079 recombinante (30 µg), antibióticos ampicilina e penicilina em solução (30 µg/cada) (controle positivo) e água ultrapura estéril (controle negativo). As placas foram incubadas em estufa à 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação, foram aferidos os diâmetros das zonas de inibição formadas ao redor dos discos.

3.7 Análise estatística

As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., EUA), sendo os dados considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. A análise de variância ANOVA, seguida pelo pós-teste Bonferroni, foi utilizada para comparação entre múltiplos grupos nas avaliações do modelo experimental de psoríase. Teste t de Student não pareado foi utilizado para verificar diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos de absorbância para os cultivos bacterianos.

4 Resultados e discussão

4.1 Avaliação dos transcriptomas de glândulas salivares de carrapatos *R. microplus* para seleção de uma evasina putativa

Buscando identificar na saliva de carrapatos proteínas que pudessem apresentar atividade inibidora do sistema imunológico, nós exploramos o transcriptoma anteriormente publicado por Garcia (2013), que caracterizou os transcritos expressos em larvas e glândulas salivares de ninfas, machos e fêmeas de *R. microplus* alimentados em bovinos naturalmente resistentes ou suscetíveis à infestação. Neste trabalho, 278.351 *reads* alocadas em 3.600 CDS foram associadas com proteínas putativamente secretadas pelas glândulas salivares do carrapato *R. microplus*. Dentre as classes de proteínas descritas, encontra-se a classe das evasinas, composta por 36 CDS identificadas a partir de 1.114 *reads*, as quais correspondem a 0,4% do total de *reads* da categoria secretada. Ao comparar os transcritos de acordo com a origem da refeição sanguínea e por estágio de desenvolvimento do carrapato, verificamos que os transcritos para as evasinas foram mais expressos ($p < 0,05$) nas bibliotecas de ninfa, macho e fêmea alimentados em hospedeiros suscetíveis (685 *reads*) em comparação àqueles alimentados em hospedeiros resistentes (429 *reads*) (Garcia, 2013). Estes dados sugerem que proteínas da classe das evasinas podem exercer efeito modulador das respostas do hospedeiro contra a infestação e, por isso, estarem relacionadas ao sucesso da alimentação de carrapatos *R. microplus*.

Dentre as 36 sequências de evasinas putativas encontradas nos transcriptomas de glândulas salivares de carrapatos *R. microplus*, pré-selecionamos aquelas que atendiam aos critérios a seguir: 1) presença da sequência completa de aminoácidos, indicada pela presença do códon de terminação e da metionina como primeiro aminoácido; 2) ser secretada, portanto possuir peptídeo sinal; e 3) ser altamente expressa pelos carrapatos (considerando-se um número total de *reads* acima de 50). A partir desses critérios foi possível selecionar previamente cinco sequências: Bm-nr-173149, Bm-tb2-103665, Bm-nr-103664, Bm-nr-264079 e Bm-nr-2129. Para definir qual dentre essas proteínas seria utilizada para o desenvolvimento do nosso trabalho, foram considerados os seguintes fatores adicionais, em conjunto: 1) maior nível de expressão gênica, visto que proteínas mais expressas devem ser mais relevantes no processo de alimentação; 2)

expressão gênica nos diferentes estágios do carrapato (adultos, larvas e/ou ninfas); e 3) relação evolutiva com outras evasinas já descritas na literatura. Como observado na *Tabela 2*, a sequência Bm-nr-264079 foi detectada nas bibliotecas de ninfa, macho e fêmea, com transcritos diferencialmente expressos, enquanto que as sequências Bm-nr-173149, Bm-tb2-103665, Bm-nr-103664 estão presentes apenas em bibliotecas de fêmea ou macho e ninfa (dois estágios). A sequência Bm-nr-2129, por sua vez, não apresenta expressão diferencial entre os diferentes hospedeiros.

Tabela 2. Principais proteínas da classe das evasinas identificadas no transcriptoma de carrapatos *R. microplus* (Garcia, 2013).

Identificação/ Parâmetro	Bm-nr- 173149	Bm-tb2- 103665	Bm-nr- 103664	Bm-nr- 264079	Bm-nr- 2129
Peptídeo sinal	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Sequência completa	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<i>Reads</i> em L-RmR	0	0	0	0	1
<i>Reads</i> em GSM-RmR	0	111	22	0	100
<i>Reads</i> em GSF-RmR	23	0	0	0	3
<i>Reads</i> em GSN-RmR	1	1	0	0	0
<i>Reads</i> em L-RmS	0	0	0	0	0
<i>Reads</i> em GSM-RmS	0	73	71	30	82
<i>Reads</i> em GSF-RmS	23	0	0	6	0
<i>Reads</i> em GSN-RmS	25	2	1	17	5
Nº total de <i>reads</i>	72	187	94	53	191
p<0,05 (RmR x RmS)	Sim	Sim	Sim	Sim	NS

L: larva. GSM: glândula salivar de macho. GSF: glândula salivar de fêmea. GSN: glândula salivar de ninfa. RmR: *R. microplus* alimentado em hospedeiro bovino resistente. RmS: *R. microplus* alimentado em hospedeiro bovino suscetível. NS: não significativo.

A fim de guiar a seleção da proteína com maior potencial funcional, nós avaliamos a relação evolutiva entre as proteínas de interesse e as evasinas de carrapatos *R. sanguineus* Evasin-1 (sp|P0C8E7|) (FRAUENSCHUH et al, 2007) e

Evasin-4 (sp|P0C8E9|) (DÉURAZ et al, 2008), cuja atividade ligante de quimiocinas já está caracterizada. Embora a proteína Bm-nr-2129 seja evolutivamente mais próxima das proteínas já caracterizadas do que as demais sequências de *R. microplus* (Figura 3), ela não apresentou expressão diferencial entre as bibliotecas identificadas em carrapatos provenientes de hospedeiros bovinos suscetíveis ou resistentes, conforme descrito acima. A sequência Bm-nr-264079, no entanto, atende aos parâmetros de seleção anteriores, e é a segunda sequência com maior relação evolutiva com as evasinas já descritas, motivos pelos quais ela foi escolhida para os estudos de caracterização descritos nos próximos itens.

Figura 3. Árvore filogenética de sequências codificadoras para evasinas obtidas dos sialotranscriptomas de carrapatos *R. microplus* (Garcia, 2013) e sequências de evasinas de carrapatos *R. sanguineus* já caracterizadas.

O software MEGA 5.05 foi utilizado para análise empregando o método de *neighbor-joining* com 1000 repetições de *bootstrap*. Os números nos nós indicam o apoio de *bootstrap*. As sequências usadas para a filogenia são cinco sequências oriundas de sialotranscriptomas de carrapato *R. microplus* (Bm-nr-173149, Bm-tb2-103665, Bm-nr-103664, Bm-nr-264079 e Bm-nr-2129), além de duas sequências já caracterizadas e disponíveis em bases de dados públicas de carrapatos *R. sanguineus* (sp|P0C8E7| - Evasin-1 e sp|P0C8E9| - Evasin-4).

4.2 Caracterização *in silico* da proteína Bm-nr-264079 de *R. microplus*

A fim de melhor caracterizar a proteína de estudo, nós promovemos o alinhamento da sequência Bm-nr-264079 com sequências de evasinas caracterizadas ou preditas de outras espécies de carrapatos da família Ixodidae. Observa-se que a maior similaridade ocorre com evasinas preditas de carrapatos *R. appendiculatus*, *R. sanguineus* e *R. zambiensis*, todos pertencentes ao gênero *Rhipicephalus* (Tabela 3). De modo geral, considera-se que comparações entre proteínas com identidade superior a 50% podem ser usadas para previsões funcionais e evolutivas entre proteínas (VASCONCELOS e ALMEIDA, 2012). No

entanto, nenhuma das sequências de evasinas constantes na Tabela 3 e que apresentam maior similaridade com a sequência Bm-nr-264079 foram funcionalmente caracterizadas até o momento. Buscando então estabelecer uma maior legitimidade de identificação, estrutura e função da proteína Bm-nr-264079, nós comparamos a sua sequência de aminoácidos com as sequências primárias das proteínas Evasin-1, Evasin-3 e Evasin-4 de *R. sanguineus*, cuja função está caracterizada. Esta comparação permitiu a identificação de vários resíduos de aminoácidos conservados ou idênticos entre essas sequências (Figura 4, sombreado). A identidade encontrada entre as sequências de Bm-nr-264079 com a Evasin-1 foi de 28% (*e-value*: 4e-12); com a Evasin-3, a identidade foi de 13,5%; e com a Evasin-4, a identidade foi de 52% (*e-value*: 6e-06) (Figura 4). Uma vez que a proteína Bm-nr-264079 possui relações evolutivas, significativa identidade e resíduos conservados com outras evasinas de carrapatos já caracterizadas e depositadas, especialmente a Evasin-4, é possível sugerir que esta sequência nova apresente similaridade de função com as evasinas já caracterizadas, justificando a sua caracterização funcional.

Tabela 3. Comparação da sequência de aminoácidos da proteína Bm-nr-264079 com sequências de evasinas de outras espécies de carrapatos da família Ixodidae.

Espécie	Código de acesso*	Identidade (%)	Score	E-value
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	A0A131YS46	52,3	373	3,9e-43
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	C9W1D9	54,9	337	2,9e-38
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	A0A131Z6L7	47,0	297	3,7e-32
<i>Rhipicephalus zambeziensis</i>	A0A224Y913	52,1	295	6,9e-32
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	A0A131YHW9	51,3	294	1.e-31
<i>Rhipicephalus zambeziensis</i>	A0A224Y3E0	43,5	294	2,6e-31
<i>Rhipicephalus zambeziensis</i>	A0A224YCA7	48,3	287	1.2e-30
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	A0A131YSF7	42,9	287	2,9e-30
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	A0A131Z5M0	43,5	281	1,5e-29
<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	L7MA80	44,2	263	7,7e-27
<i>Hyalomma excavatum</i>	A0A131X968	38,5	192	2e-16
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	C9W1N8	27,8	125	2,6e-6
<i>Ixodes ricinus</i>	A0A0K8RH91	40,0	87	1,4e-0
<i>Ixodes ricinus</i>	A0A090X8B0	40,0	87	1,6e0

*Análises realizadas através da plataforma Blast utilizando banco de dados UniProt.

Figura 4. Comparação da sequência primária de aminoácidos da proteína Bm-nr-264079 com as sequências das proteínas Evasin-1, Evasin-3 e Evasin-4 de *R. sanguineus*.

Bm-nr-264079:	MVFKAFTTVLAAYVVIQMVCKAHGNSEEDMMETTTEFEYEAGACPFQVLKISNNKSLIINCTNECG---Y :	67
Evasin-1 :	MTFKACIALIITALCAMQVICEDDEDYG-----DLGGCPFLVAENKTGYPTIVACKQDONGTTE :	58
Bm-nr-264079:	GLSDGEPVNAVTPPLNFTVVRGDYNTVGSRCNGTSPNGTVEFCWANKTNSEKRPSARSYSVQLY :	133
Evasin-1 :	TAFNGTRCFSIGDEGLRRMTANLPYDQPLGQCSNGDCIPKETYEVCYRRNRWDKKN----- :	114
Bm-nr-264079:	MVFKAFTTVLAAYVVIQMVCKAHGNSEEDMMETTTEFEYEAGACPFQVLKISNNKSLIINCTNECGYGLS :	70
Evasin-3 :	-----MRALLARILLQVLVVSQSKGLVSTIESRTSGDGADNFD-----VVSONKNCTSGQN :	51
Bm-nr-264079:	DGEPVNAVTPPLNFTVVRGDYNTVGSRCNGTSPNGTVEFCWANKTNSEKRPSARSYSVQLY :	133
Evasin-3 :	E---CP-----EGCFGGLGQNKKGHC-----YKIIGNLSGEP-PVVR----- :	86
Bm-nr-264079:	MVFKAFTTVLAAYVVIQMVCK-----KAHGNSEEDMMETTTEFEYEAGACPFQ---VLKISNNKSLIINCT--- :	62
Evasin-4 :	MAFKYMEVFVFAAVLYARQWLSTKCEVPQMTSSAPDLEEDDYTAAPLTCYETNSTLGLAPPNGSVLONSTTTW :	75
Bm-nr-264079:	-NECGYGLSDGEPVNAVTPPLNFTVVRGDYNTVGSRCNGTSPNGTVEFCWANKTNSEKRPSARSYSVQLY :	133
Evasin-4 :	FNETSPNNASCLLTVDFLTQDAILQENQPYNCVSGHCDNGTCAGPPRHAQCW----- :	127

Alinhamento realizado utilizando-se a plataforma ClustalW. Áreas em preto indicam resíduos idênticos entre as duas sequências.

Caracteristicamente, pouca similaridade e identidade pode ser encontrada entre as sequências primárias de evasinas de diferentes organismos (HAYWARD et al, 2017), indicando que outras avaliações podem ser mais úteis para a predição da atividade de evasinas do que a similaridade da estrutura primária. O arcabouço secundário, guiado pela formação de interações dissulfeto, e o consequente arranjo terciário da estrutura, no entanto, parecem ter importância fundamental para a estabilidade das interações entre proteínas inibidoras e quimiocinas (BONVIN et al, 2016). Por isso, a fim de comparar a estrutura conformacional de nossa proteína de estudo com a estrutura cristalizada de evasinas confirmadas, nós realizamos a modelagem tridimensional da proteína Bm-nr-264079.

Para esta análise, foram utilizadas três plataformas, Phyre2, I-Tasser e Swiss-Model. De modo similar, estas ferramentas realizam a modelagem da estrutura tridimensional de uma proteína em estudo a partir de uma molécula molde ou de referência, cuja estrutura 3D já está caracterizada. A escolha da proteína molde leva em consideração a similaridade e identidade entre as proteínas quanto ao

alinhamento das estruturas primárias e secundárias, fazendo um comparativo baseado em homologia. Devido a característica própria do algoritmo utilizado na construção de cada ferramenta, diferentes parâmetros finos podem ser considerados para a escolha do modelo ideal, por isso, é necessário que mais de uma ferramenta seja testada para o modelamento. A estrutura utilizada como molde foi definida pelo próprio algoritmo da plataforma, assim como a indicação dos moldes selecionados e seus códigos de identificação (PDB ID), estando estes apresentados na Tabela 4.

Ainda, diferentes ferramentas podem produzir modelamentos com qualidade variada. Em relação a qualidade dos modelos construídos, cada programa utiliza um *score* que permite avaliar se a estrutura resultante está adequada ou não para ser utilizada. Para o Phyre2, a avaliação da qualidade dos modelos construídos se baseia na porcentagem de confiabilidade dos resíduos modelados, sendo que valores de confiança igual ou acima de 90% indicam que a sua proteína foi modelada com alta precisão.

No nosso caso, 72 resíduos de aminoácidos da proteína Bm-nr-264079 (54% da sequência) foram modelados com 82,7% de confiança (Tabela 4). Para o I-Tasser, a confiabilidade do modelo se baseia no valor do C-score que é calculado com base na significância dos alinhamentos realizados e na convergência dos parâmetros utilizados nas simulações de montagem da estrutura. O resultado é expresso em uma faixa de valor entre -5 e 2, sendo que valores mais altos desse *score* indicam alta confiabilidade do modelo gerado. Para o modelamento de nossa sequência de interesse, o C-score foi de -1.78 (Tabela 4).

Ainda na plataforma I-Tasser, os parâmetros TM-score e o RMSD auxiliam na definição da precisão da modelagem, pois medem a similaridade estrutural entre as sequências que são geralmente usadas para medir a precisão da modelagem da estrutura, sendo que valor de TM-score acima de 0.5 indica um modelo mais adequado e menor que 0.17 indica semelhança estrutural aleatória. O TM-score desta análise foi de 0.50 ± 0.15 (Tabela 4).

Para o Swiss Model, é utilizada a Estimativa Global de Qualidade do Modelo (GMQE, do inglês *Global Model Quality Estimation*), expresso como um valor entre 0 e 1 em que valores maiores ou iguais a 0,5 indicam correta topologia do modelo gerado em relação ao seu molde. Nesta análise, o valor de GMQE retornado foi de 0.44 (Tabela 4). Os valores estimados para a qualidade dos modelos apresentaram variabilidade, sendo valores intermediários na maioria dos casos. Apenas a

plataforma I-Tasser apresentou valor de TM-score próximo daqueles considerados de alta confiabilidade e precisão, devendo este modelo ser considerado para análises futuras das interações possíveis entre a proteína Bm-nr-264079 e outras moléculas de interesse. O modelo gerado pelo Swiss Model pode também ser utilizado, desde que a região estimada de ligação esteja contida dentro dos aminoácidos com melhor predição de modelagem.

Tabela 4. Parâmetros utilizados pelas plataformas Swiss Model, I-Tasser e Phyre2 para a predição da estrutura tridimensional da proteína Bm-nr-264079.

	Swiss Model	I-Tasser	Phyre2
Qualidade do modelamento	GMQE: 0.44	C-score:-1.78 TM-score: 0.50±0.15 RMSD: 8.3±4.5Å	C: 82,7%
PDB id	3fpu.1.A	3fpuA	c3fptC
Estrutura molde	Estrutura cristalográfica do complexo entre Evasin-1 e CCL3	Estrutura cristalográfica do complexo entre Evasin-1 e CCL3	Estrutura cristalina do complexo entre Evasin-1 e CCL3

Apesar de utilizarem parâmetros e metodologias diferentes para a escolha das estruturas de referência, os três modelos elegeram como referência a estrutura cristalográfica da Evasin-1 complexada a quimiocina CCL3 para a construção dos modelos tridimensionais da sequência Bm-nr-264079 (Figura 5). A análise dos modelos cristalográficos da proteína Evasin-1 e da molécula CCL3 antes e após a interação entre elas indica que, embora existam alguns resíduos de aminoácidos nas duas estruturas que interagem entre si e fazem a ligação efetiva, a estabilidade da ligação promovida pelos rearranjos de posicionamento das extremidades n-terminal e c-terminal da Evasin-1 após a interação com a quimiocina é o fator determinante para o sucesso da inibição funcional promovida pela evasina; esse dado é reforçado pelo fato de que outras quimiocinas apresentam os mesmos resíduos de interação que a CCL3, porém não são afetadas pela Evasin-1 (DIAS et al, 2009). Isso indica que a análise das similaridades entre as estruturas das proteínas Evasin-1 e Bm-nr-264079 em busca de regiões homólogas de interação pode não trazer o resultado esperado, devendo-se a análise buscar as semelhanças estruturais amplas que possam representar maior estabilidade após a ligação com quimiocinas específicas.

Evasin-1 e Evasin-4 apresentam baixa identidade entre sequências (<27%), porém um perfil próximo de ocorrência de cisteínas ao longo de suas cadeias, sugerindo arranjo semelhante das ligações dissulfeto e, com isso, semelhança no arranjo secundário (BONVIN et al, 2016). Análises de *docking in silico* entre CCL3 com a estrutura modelada da Evasin-4 (que apresenta 52% de identidade com a proteína Bm-nr-264079), bem como estudos de mutagênese, indicam que, diferentemente da Evasin-1, a interação estável da Evasin-4 com quimiocinas é dependente essencialmente da estabilidade de sua estrutura na região n-terminal.

No caso da Evasin-1, ambas as regiões c-terminal e n-terminal apresentam cadeias longas de configuração *loop*, enquanto que esta configuração está marcadamente presente na região n-terminal da Evasin-4, onde também está previsto o sítio de interação desta evasina com CCL3 (BONVIN et al, 2016). Também na proteína Bm-nr-264079 observa-se a ocorrência de uma estrutura em *loop* estendida apenas na extremidade n-terminal da cadeia (Figura 5B), semelhante ao que ocorre com Evasin-4, a qual pode representar a região de estabilização ou até mesmo de interação com quimiocinas. Apesar de a comparação das estruturas tridimensionais de Evasin-1 e Evasin-4 ser útil para o desenvolvimento de previsões da funcionalidade de Bm-nr-264079, as limitações destas análises indicam serem necessários estudos adicionais de interação *in silico* e *in vitro* para que a atividade da proteína em estudo seja validada.

Figura 5. Modelamento estrutural da proteína Bm-nr-264079.

Modelos tridimensionais da proteína Bm-nr-264079 gerado pelas plataformas Phyre2 (A), I-Tasser (B) e Swiss-Model (C).

4.3 Produção recombinante da proteína Bm-nr-264079 de *R. microplus* em *E. coli*

Para obter a proteína a ser avaliada como uma possível evasina, nós optamos por realizar a produção da mesma através de sistemas de expressão recombinante (*E. coli* e *P. pastoris*). Inicialmente, nós escolhemos *E. coli* como organismo de expressão, um dos principais sistemas procariotos usado na produção de proteínas recombinantes, devido a fatores como: 1) a bactéria apresenta uma cinética de crescimento rápido, amplificação rápida do material de interesse, obtenção de resultados em curto prazo e bons níveis de produção quando comparado a outros sistemas; 2) pode ser cultivada em altas densidades sem prejuízo para o seu metabolismo, produzindo grandes quantidades de proteína em um menor espaço físico; 3) o meio de cultivo essencial ao seu crescimento pode ser produzido a partir de componentes facilmente disponíveis e de baixo custo, tornando viável e mais barata a produção em *E. coli* do que outros sistemas; 4) a transformação bacteriana para inserção de DNA plasmidial exógeno é rápida e fácil; 5) há grande disponibilidade de vetores de expressão e cepas para a expressão

ideal da proteína de interesse (ROSANO e CECCARELLI, 2014). Considerando os fatores citados, o uso de *E. coli* para expressão se torna mais viável porque nos permite otimizar a expressão da proteína com relativo baixo custo e alto nível de produção.

Dessa forma, realizamos a síntese do plasmídeo recombinante de expressão da proteína Bm-nr-264079 em *E. coli* por meio de um serviço terceirizado e buscamos definir protocolos padrão de produção que pudessem ser utilizados na produção em larga escala. Quando os protocolos iniciais realizados em pequena escala não foram bem sucedidos para a produção da proteína, aplicamos novos procedimentos de otimização, e embora apenas alguns resultados sejam apresentados, eles estão citados ao longo do trabalho.

4.3.1 Delineamento, síntese e sequenciamento do plasmídeo recombinante

Visando a construção do plasmídeo para a expressão da proteína Bm-nr-264079 recombinante em *E. coli*, a sequência de aminoácidos da proteína, obtida por análise transcriptômica (GARCIA, 2013), foi submetida à análise *in silico* para identificação do peptídeo sinal utilizando-se a ferramenta SignalP 4.1 (Figura 6). O provável sítio de clivagem foi identificado entre os aminoácidos G:24 e N:25. Uma vez delimitada, a sequência do peptídeo sinal foi excluída da sequência para síntese do gene, pois a mesma é clivada *in vivo* e não faz parte da molécula funcional, não sendo necessária sua expressão.

A sequência de aminoácidos da proteína foi encaminhada para serviço terceirizado (GenScript) que realizou a otimização dos códons de expressão em *E. coli*, construção do gene sintético e clonagem em vetor de expressão pET28a(+). A clonagem do gene codificante da proteína Bm-nr-264079 foi realizada entre os sítios das enzimas de restrição BamHI e NdeI, de forma que a proteína fosse posteriormente expressa ligada a uma cauda de seis histidinas na porção n-terminal, que será utilizada para a purificação por afinidade a metais.

Figura 6. Predição do peptídeo sinal na sequência de aminoácidos da proteína Bm-nr-264079 através da ferramenta SignalP 4.1.

O plasmídeo recombinante foi amplificado, sequenciado e a presença do gene para a expressão da proteína Bm-nr-264079 foi confirmada.

4.3.2 Expressão e purificação da proteína recombinante Bm-nr-264079 em *E. coli*

A fim de melhor orientar a produção da proteína recombinante antes de fazer os testes de expressão, realizamos a predição dos parâmetros físico-químicos da proteína a ser expressa. A predição indicou que a sequência tem 130 aminoácidos, ponto isoelétrico de 5,93, peso molecular de aproximadamente 14,2 kDa, tempo estimado de meia-vida em bactérias *E. coli* acima de 10 horas e apresenta regiões hidrofílicas, porém é insolúvel.

Ao longo das etapas descritas a seguir, estas informações foram utilizadas para indicar qual a banda correspondente à proteína de interesse na análise do material de expressão e purificação após a eletroforese através do peso molecular predito, guiar a seleção de soluções com pH adequado ao ponto isoelétrico, bem

como indicar a estabilidade e condições de solubilidade esperadas da proteína recombinante quando expressa em *E. coli*.

Para a expressão recombinante, inicialmente, realizamos um teste de expressão em pequena escala (10 mL) para padronizar as condições de expressão das proteínas em *E. coli*. Nessa etapa, analisamos a expressão da proteína em cinco diferentes cepas de *E. coli* em busca daquela capaz de promover a maior expressão. Foi possível observar a presença de uma banda proteica com o tamanho esperado da proteína recombinante (14 kDa) em todas as cepas testadas, tanto através de gel de SDS-PAGE (Figura 7A e Figura 8A) quanto através de *Western blot* utilizando anticorpo anti-histidina (Figura 7B e Figura 8B). Embora todas as cepas tenham expressado com sucesso a proteína, não observamos evidente ganho de expressão em nenhuma das cepas avaliadas. Cabe ressaltar que, para todas as cepas, diferentes tempos e temperaturas de crescimento, bem como diferentes concentrações de IPTG foram testadas, porém nenhuma das alterações promoveu aumento na expressão da proteína em questão. Nós optamos, então, por seguir com a expressão da proteína em *E. coli Rosetta* para purificação.

Figura 7. Expressão da proteína Bm-nr-264079 recombinante em diferentes cepas de *E. coli*.

Expressão da proteína Bm-nr-264079 em *E. coli* BL21 (DE3) PLysS, *E. coli* Rosetta (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* STAR (DE3). Indução realizada com IPTG 0,5 mM por 4 horas a 37°C em agitação orbital. A) de gel de poliacrilamida 15% corado com *Coomassie Blue* e B) *Western blot* utilizando anticorpo anti-histidina. Primeira coluna indica o marcador de peso molecular (PM) em kDa, as demais colunas indicam o perfil de expressão de proteínas em diferentes cepas de *E. coli* pré- e pós-indução com IPTG analisado a partir do *pellet* do cultivo (C) e sobrenadante (S). A seta indica a provável banda da proteína recombinante (14 kDa).

Figura 8. Expressão da proteína Bm-nr-264079 recombinante em *E. coli* Arctic Express.

Expressão da proteína Bm-nr-264079 em *E. coli* Arctic Express. Indução realizada com IPTG 0,5 mM por 16 horas a 13°C em agitação orbital. A) de gel de poliacrilamida 15% corado com *Coomassie Blue* e B) *Western blot* utilizando anticorpo anti-histidina. Primeira coluna indica o marcador de peso molecular (PM) em kDa, as demais colunas indicam o perfil de expressão de proteínas na cepa indicada, pré- e pós-indução com IPTG analisado a partir do *pellet* do cultivo (C) e sobrenadante (S). A seta indica a provável banda da proteína recombinante (14 kDa).

Uma vez confirmada a expressão da proteína Bm-nr-264079 em pequena escala e com as configurações esperadas de tamanho e reatividade com anticorpo anti-histidina, o plasmídeo foi novamente transformado nas cepas testadas para expressão em larga escala (500 mL/frasco). Para analisar se a expressão recombinante estava mantida nestas condições, o cultivo total de cada cepa foi novamente avaliado por gel e *Western blot*, conforme anteriormente descrito. Foi possível confirmar a manutenção da expressão da proteína após a expansão de cultivo, em condições similares às aquelas observadas para a expressão em pequena escala, como representado por *E. coli* Rosetta (Figura 9).

Figura 9. Expressão da proteína Bm-nr-264079 recombinante em *E. coli* Rosetta em larga escala.

Expressão da proteína Bm-nr-264079 em *E. coli* Rosetta (DE3) em cultivo expandido de 500 mL/frasco. Indução realizada com IPTG 0,5 mM por 4 horas a 37°C em agitação orbital. A) de gel de poliácridamida 15% corado com *Coomassie Blue* e B) *Western blot* utilizando anticorpo anti-histidina. Primeira coluna indica o marcador de peso molecular (PM) em kDa, e as demais colunas indicam o perfil de expressão de proteínas na cepa indicada, nos períodos pré- e pós-indução com IPTG analisado a partir do *pellet* do cultivo (2ª a 6ª colunas) e sobrenadante (7ª coluna). A seta indica a provável banda da proteína recombinante (14 kDa).

Uma vez que a solubilidade após a produção é um indicativo de uma conformação proteica estável e, possivelmente, semelhante à encontrada *in vivo*, a solubilidade das proteínas em condição não-desnaturante foi avaliada. Após confirmação da expressão, a biomassa produzida foi submetida à lise enzimática com lisozima seguida de lise mecânica por sonicação, e o sobrenadante solúvel foi separado da biomassa insolúvel por centrifugação. O material foi avaliado por gel e *Western blot*, conforme anteriormente descrito. Observamos que a proteína Bm-nr-264079 obtida pela expressão em *E. coli* foi pouco solúvel nas condições avaliadas (Figura 10), mantendo-se em corpos de inclusão (agregados proteicos insolúveis). Outros protocolos de solubilização não-desnaturante, incluindo variações de pH do tampão fosfato, adição de detergentes (Triton X-100 e N-lauroilsarcosina), alteração nas configurações da lise mecânica, alteração de temperatura e período de expressão (37°C/4 h; 28°C/16 h) foram testados, porém sem sucesso (dados não mostrados). Procurando obter uma estrutura solúvel, aplicamos um protocolo de solubilização desnaturante utilizando uréia 6M nos corpúsculos de inclusão da

biomassa obtida do cultivo de *E. coli* Rosetta, processo que originou a solubilização de grande parte da proteína produzida (Figura 10).

Figura 10. Solubilização da proteína recombinante Bm-nr-264079 produzida em *E. coli* Rosetta.

Solubilidade da proteína Bm-nr-264079 expressa em *E. coli* Rosetta (DE3) após cultivo expandido de 500 mL/frasco e aplicação de protocolos de solubilização. A) de gel de poliacrilamida 15% corado com *Coomassie Blue* e B) *Western blot* utilizando anticorpo anti-histidina da porção solúvel do cultivo processado. Primeira coluna indica o marcador de peso molecular (PM) em kDa, e as demais colunas indicam o perfil de solubilização nas diferentes condições. L + S: lisoizima + sonicação. A seta indica a provável banda da proteína recombinante (14 kDa).

Após a solubilização, a proteína recombinante foi purificada utilizando-se coluna cromatográfica de afinidade ao níquel em tampão desnaturante, contendo uréia, e a eluição foi realizada com sucesso utilizando-se 500 mM de imidazol (Figura 11).

Figura 11. Purificação da proteína Bm-nr-264079 recombinante por cromatografia de afinidade ao níquel.

Perfil dos eluatos contendo a proteína Bm-nr-264079 solubilizada em tampão desnaturante após purificação em coluna de afinidade ao níquel. A) de gel de poliacrilamida 15% corado com *Coomassie Blue* e B) *Western blot* utilizando anticorpo anti-histidina dos eluatos recuperados após a purificação. A seta indica a provável banda da proteína recombinante (14 kDa).

Após a purificação, a proteína recombinante foi submetida à diálise gradual contra PBS, permitindo a remoção gradativa do agente desnaturante (ureia), imidazol e sais das amostras; a diálise lenta foi realizada com o objetivo de evitar a precipitação da proteína durante a remoção do agente desnaturante. Mesmo assim, após a diálise, foi observada a formação de pequenas quantidades de precipitado proteico, o qual foi separado do material solúvel por centrifugação e filtração.

Em seguida, a proteína foi concentrada com açúcar, o que auxilia a perda de líquido das amostras e estabiliza a estrutura nativa durante o *refolding*. A integridade da proteína Bm-nr-264079 recombinante após a concentração foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida e confirmada por *Western blot* (Figura 12).

Figura 12. Análise da proteína Bm-nr-264079 recombinante após concentração das frações dialisadas.

Perfil da proteína Bm-nr-264079 recombinante após diálise e concentração. *Western blot* utilizando anticorpo anti-histidina. A seta indica a provável banda da proteína recombinante (14 kDa).

4.3.3 Remoção do LPS da proteína Bm-nr-264079 recombinante produzida em *E. coli*

Uma das desvantagens da expressão de proteínas em *E. coli* é a contaminação da mesma por endotoxinas, que são partes integrantes da membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas como *E. coli* (TORTORA et al, 2017). Porém, algumas metodologias estão disponíveis para que se faça a redução da contaminação das preparações proteicas por lipopolissacarídeos – LPS (endotoxina), a exemplo da cromatografia de troca iônica, adsorção por afinidade, cromatografia de filtração em gel, ultrafiltração, dentre outras.

Optamos por utilizar o método de adsorção por afinidade para reduzir a contaminação por LPS na proteína recombinante e permitir, então, sua utilização como terapia em modelo de doença inflamatória murino (item descrito a seguir). Para tal, utilizamos colunas com polimixina-B imobilizada em resina de agarose (Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel, Thermo Scientific) para a remoção do LPS da amostra de proteína. A eficácia na remoção de LPS foi determinada por ensaio de lisado do amebócito *Limulus* sp. (LAL). Após a quantificação por ensaio de LAL, observamos que as amostras não tratadas com polimixina B apresentavam LPS em uma concentração 0,56 UE/μg, enquanto que as tratadas apresentavam 0,0742 UE/μg. A qualidade da proteína recombinante não foi afetada por este procedimento

(Figura 13). Sendo assim, a remoção de endotoxinas das amostras foi confirmada de forma a gerar uma proteína apta para uso em testes posteriores.

Figura 13. Bm-nr-264079 recombinante após a remoção de LPS utilizando colunas de polimixina-B

Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% corado com *Coomassie blue*. Coluna à esquerda: marcador de peso molecular (PM) em kDa. Demais colunas: amostras contendo a proteína Bm-nr-264079 recombinante após a remoção de endotoxinas em colunas com polimixina B imobilizada. A seta indica a provável banda para a proteína recombinante (14 kDa).

4.3.4 Caracterização da proteína Bm-nr-264079 recombinante por espectrometria de massas

Para confirmar a identidade da proteína expressa e purificada, o espectro de massas resultante da leitura dos fragmentos da proteína purificada foi analisado por serviço terceirizado e os dados foram correlacionados com sequências de aminoácidos de proteínas registradas nos bancos de *Rhipicephalus* do NCBI e UniProt. A análise dos dados indicou compatibilidade da sequência da amostra submetida com a sequência da proteína Bm-nr-264079 (dados não mostrados), confirmando a identidade da proteína de interesse.

4.4 Produção da proteína Bm-nr-264079 de carrapatos *R. microplus* em *P. pastoris*

Uma vez que a *E. coli* é um organismo procarioto, há vários fatores que podem desaconselhar a expressão de proteínas por esse sistema e devem ser considerados: 1) inabilidade de processar corretamente as proteínas heterólogas e realizar modificações pós-traducionais; 2) produção de proteínas insolúveis e não

funcionais (inativas) na forma de corpos de inclusão; 3) baixa secreção do produto recombinante; 4) co-produção de endotoxinas; e 5) atividade biológica da proteína recombinante pode diferir da proteína nativa (DEMAIN e VAISHNAV, 2009; CHEN, 2011).

Uma alternativa ao uso de *E. coli* seria a utilização de leveduras, como *P. pastoris*, para a expressão de proteínas, pois apresentam fácil manipulação genética, alta produtividade, crescimento relativamente rápido e em alta densidade celular, secreção mais eficiente e processamento pós-traducional (glicosilações, fosforilações, formação de pontes dissulfeto) (DEMAIN e VAISHNAV, 2009). A mais notável característica fisiológica dessa levedura constitui-se no fato de ser metilotrófica, ou seja, é capaz de crescer em meio contendo metanol como única fonte de carbono, pois expressa uma enzima peroxissomal chamada álcool oxidase (AOX) em grande quantidade (COUDERC e BARATTI, 1980). Além disso, esse sistema apresenta diversas vantagens na expressão de proteínas heterólogas em relação a outras leveduras, como: 1) maior produtividade; 2) crescimento em meio com metanol, que inibe o crescimento de contaminantes; 3) integração estável das cópias do DNA transformante; 4) modificações pós-traducionais e secreção do produto recombinante mais eficientes; 5) menores chances de glicosilações em excesso; e 6) crescimento em altas densidades celulares em meio relativamente simples e barato (CEREGHINO e CREGG, 2000; DEMAIN e VAISHNAV, 2009).

Com o objetivo de produzir a proteína Bm-nr-264079 com estrutura conformacional e atividade mais próximas daquela encontrada originalmente nos carrapatos, testamos a produção da proteína recombinante em levedura *P. pastoris*. Para tal, nós utilizamos cepas de *P. pastoris* de três fenótipos diferentes: cepa selvagem (WT), Mut^(S) e PepΔ4. *P. pastoris* Mut^(S) possui crescimento lento em metanol em relação a WT, pois apresenta apenas o gene AOX2 funcional para o metabolismo do metanol (o gene AOX1 se encontra inativo), resultando em uma taxa de crescimento significativamente mais lenta, cerca de 5% a 10% da atividade em comparação com AOX1, o que pode ser vantajoso para o arranjo correto da proteína. Já *P. pastoris* PepΔ4 apresenta deleção no gene Pep4, cujo produto é responsável pela ativação de diversas proteases que entram no vacúolo como zimogênios inativos e são ativados pelo produto PEP4. Embora as proteínas recombinantes secretadas não serem direcionadas para os vacúolos, elas podem

entrar em contato com proteases no meio de cultura a partir da lise de uma pequena porção das células, o que pode ser desvantajoso (CREGG et al, 2009).

Para a expressão da proteína, o gene codificante da proteína Bm-nr-264079 foi otimizado e sintetizado comercialmente e posteriormente clonado em vetores da série pD912 (AtumSM) contendo 10 diferentes sequências sinais de secreção, que direcionam a proteína recombinante para a via secretória extracelular. Esta estratégia teve por objetivo triar a melhor condição de secreção da proteína recombinante no sistema de expressão em levedura, favorecendo sua solubilidade e manutenção da estrutura original, uma vez que esse processo evita a necessidade de processamento agressivo e desnaturação da amostra. Devido ao número de construções trabalhadas, a abordagem *high-throughput* para seleção das leveduras transformadas e cultivo dos clones selecionados foi utilizada.

Após a transformação de diferentes cepas de *P. pastoris* e indução da expressão com ou sem metanol, a produção da proteína foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com *Coomassie blue* e *Western blot* dos cultivos induzidos utilizando-se IgY antígeno-específico (anti-Bm-nr-264079) como anticorpo de detecção. Como resultado, não foi observada nenhuma banda correspondente à proteína recombinante de interesse no gel de poliacrilamida (peso molecular esperado de 11,9 kDa), e bandas muito fracas no *Western blot* (Figura 14). Sendo assim, nós desconsideramos esse sistema de expressão proteica e voltamos a focar a produção da proteína de interesse em *E. coli*.

Figura 14. Expressão da proteína Bm-nr-264079 recombinante em *P. pastoris*

Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% corado com Coomassie blue (A) e *Western blot* (B) utilizando anticorpo primário IgY anti-Bm-nr-264079 (1:5.000) e anticorpo secundário anti-IgY-HRP

(1:10.000). Coluna à esquerda: marcador de peso molecular (PM) em kDa. Colunas: sobrenadante ou células do cultivo após indução mantido em agitação constante por 24, 48, 72 e 96 horas. O peso molecular esperado para a proteína Bm-nr-264079 recombinante produzida em *P. pastoris* é de 11,9 kDa.

Embora a produção desta proteína não tenha surtido resultado positivo no sistema eucarioto (*P. pastoris*) durante o desenvolvimento deste trabalho, a produção da mesma em sistemas que permitam modificações pós-traducionais pode ser indicada para estudos posteriores de estrutura e função anti-inflamatória, visto que modificações na configuração estrutural dada pela ocorrência de pontes dissulfeto parece ser essencial para a adequada atividade de proteínas similares, como a Evasin-1 e Evasin-4 de carrapatos *R. sanguineus* (DIAS et al, 2009; BONVIN et al, 2014).

4.5 Atividade da proteína Bm-nr-264079 sobre o desenvolvimento de psoríase experimental em camundongos

As doenças inflamatórias crônicas, como a psoríase, apresentam várias dificuldades para estabelecer terapia, incluindo tratamento prolongado com reações adversas e sem garantia de eficácia, comprometendo diretamente a qualidade de vida dos pacientes (DUARTE, 2001; SFIKAKIS, 2005; BRUNER, 2003; SCACCABAROZZI, 2016). Com isso, a descoberta de novos alvos terapêuticos é importante para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes. Conforme anteriormente descrito, evasinas de carrapatos *R. sanguineus* já haviam sido testadas como agentes terapêuticos em modelos de psoríase, com sucesso (DÉURAZ et al, 2008). Por isso, buscamos avaliar o efeito da proteína Bm-nr-264079 recombinante na amenização da inflamação em modelo experimental de psoríase e seu potencial terapêutico na doença.

Para avaliar se a proteína Bm-nr-264079 pode ser um potencial agente terapêutico na psoríase, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com 60 µg da proteína recombinante aplicada via intraperitoneal antes e durante a indução de psoríase experimental por imiquimode, que é um ligante de TLR7 e TLR8 e um potente ativador do sistema imunológico (VAN DER FITS et al, 2009; KJAER et al, 2015).

O imiquimode, apresentado na forma de creme dermatológico, é um medicamento utilizado para o tratamento de alguns tipos de carcinoma basocelular

superficial, verrugas externas presentes na região genital e anal e ceratose actínica (ROSSO, 2008). Este produto começou a ser usado em modelo de indução da psoríase após relato de alguns pacientes que apresentaram uma reação inflamatória cutânea na pele após sua aplicação tópica, com sinais característicos observados na psoríase (WU, 2004; GILLIET, 2004); sendo Van der Fits e colaboradores (2009) um dos primeiros grupos a utilizar o imiquimode para simular modelo de psoríase em camundongos. A inflamação produzida na pele dos animais pelo uso do imiquimode ocorre devido ao infiltrado inflamatório que inclui células dendríticas e linfócitos, que são células importantes no desenvolvimento e manutenção da psoríase (VAN DER FITS, 2009). Apesar de apresentar algumas limitações, esse é um dos modelos mais utilizados e bem caracterizados na literatura.

No delineamento aqui testado, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com uma dose de 60 µg/animal da proteína Bm-nr-264079 recombinante, via intraperitoneal, um dia antes da indução da psoríase, perdurando durante os 6 dias de aplicação do imiquimode (IMQ). A exposição dos camundongos à proteína Bm-nr-264079 recombinante promoveu diminuição do eritema nos animais tratados em comparação com os não tratados (Figura 15A), bem como reduziu de forma significativa a espessura da pele nos animais tratados especialmente após o terceiro dia (Figura 15B). A redução da inflamação e do espessamento da pele também foram observados por meio de cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina (HE) quando comparados com o grupo não tratado induzido com aplicação tópica de IMQ (Figura 15C).

A diminuição da inflamação e da espessura da pele dos animais tratados com a proteína Bm-nr-264079 recombinante de carrapatos *R. microplus* corrobora o trabalho de Déruaz e colaboradores (2008) que mostrou que a administração da Evasin-1 de carrapatos *R. sanguineus* inibiu o recrutamento celular e reduziu significativamente o espessamento da derme e da epiderme em modelo experimental de psoríase induzida por TPA (do inglês *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*). Porém, Déruaz e colaboradores não avaliaram quais populações celulares estariam alteradas ao ser administrada a Evasin-1, ou seja, não foram capazes de elucidar o mecanismo pelo qual a inflamação se encontrava reduzida na pele dos animais.

Figura 15. Efeito da proteína Bm-nr-264079 sobre o desenvolvimento de psoríase experimental induzida por imiquimode (IMQ) em camundongos.

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados ou não com a proteína recombinante e submetidos à indução de psoríase por imiquimode (n=5/grupo). A) Representação fenotípica da lesão de psoríase induzida na região dorsal dos camundongos dos grupos experimentais B) Espessura da pele dos camundongos durante o período experimental medida por paquímetro, cujos resultados foram comparados através de ANOVA com pós-teste Bonferroni em GraphPad Prism 6.0. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ C). As seções histológicas foram coradas com HE e são referentes à pele dorsal dos camundongos dos grupos experimentais coletadas após eutanásia no dia 6 do período experimental.

Uma vez que o tratamento dos animais com proteína Bm-nr-264079 recombinante diminuiu o espessamento cutâneo, avaliamos se este fenômeno poderia ser acompanhado de uma modulação nas populações de células imunológicas importantes no desenvolvimento e manutenção da psoríase.

A imunopatogênese da psoríase é complexa, mas já se sabe que envolve mudanças do sistema imunológico inato (células dendríticas e queratinócitos) e adaptativo (linfócitos T). Inicialmente, os queratinócitos são ativados através de diversos fatores ambientais (trauma mecânico, estresse emocional, medicamentos, infecções), passando a secretar citocinas que, por sua vez, ativam as células dendríticas presentes na epiderme e na derme. A ativação dessas células do

sistema imune inato também pode ocorrer diretamente pela interação dos seus receptores *toll like* (TLR) com os antígenos ambientais ou endógenos. Uma vez ativadas, as células dendríticas migram para os linfonodos, local onde realizam a apresentação de antígenos para os linfócitos T. Os linfócitos T ativados passam a se diferenciar em outros subtipos, no qual se destaca o linfócito Th17. Estes linfócitos ativados, por sua vez, migram para a derme onde interagem com outras células dendríticas e macrófagos presentes nesse local, levando a produção de citocinas que amplificam o processo inflamatório. Além de amplificar respostas Th17, as células dendríticas dérmicas também estimulam respostas de linfócitos $\gamma\delta$, que são células importantes no desenvolvimento da psoríase. A proliferação de linfócitos Th17 na psoríase também está relacionada com a redução das populações de linfócitos T reguladores, responsáveis pela supressão da ativação desses linfócitos (LIMA e LIMA, 2011).

Tendo em vista a importância das células T na manutenção e no desenvolvimento da psoríase, avaliamos a frequência de células T nos linfonodos drenantes da pele, com destaque para células T produtoras de IL-17. Além disso, avaliamos se a administração da proteína poderia aumentar a frequência de células T reguladoras, que promovem a supressão/regulação do sistema imune, controlando o processo inflamatório (ABBAS, 2014). Porém, observamos que, ao final do período experimental (6º dia), o tratamento dos camundongos com a proteína Bm-nr-264079 recombinante não alterou de modo significativo o número absoluto de células $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 (Figura 16A), células T auxiliares produtoras de IL-17 (Figura 16B), bem como o número de células T reguladoras (Figura 16C) nos linfonodos drenantes da pele dos animais tratados quando comparado aos animais não tratados.

O espessamento da pele, a descamação e o eritema são sinais clínicos clássicos da psoríase resultantes da hiperproliferação dos queratinócitos mediada por células do sistema imune, como células dendríticas e linfócitos (ARRUDA, 2001; SCHON, 2005; SABAT, 2007). Os linfócitos Th17 e linfócitos T $\gamma\delta$ produzem IL-17A, IL-17F e IL-22, que atuam diretamente nas células epiteliais/queratinócitos, ativando essas células e induzindo um processo de proliferação acentuada, levando a produção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-8 e outros quimioatraentes, que recrutam neutrófilos e outras células fundamentais para a manutenção da inflamação observada na psoríase (TEUNISSEN, 1998; WOLK, 2006; SUTTON,

2012; QU, 2013). Por isso, também avaliamos a população de leucócitos e neutrófilos na pele dos animais experimentais, no local da lesão. Porém, o tratamento também não alterou de modo significativo o número absoluto de leucócitos (Figura 17A) e neutrófilos (Figura 17B).

Figura 16. Ocorrência de células T CD4 e T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 e células T reguladoras nos linfonodos drenantes da pele dos animais experimentais.

Contagem absoluta de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 (A), T CD4 produtoras de IL-17 (B) e células T reguladoras (C) nos linfonodos drenantes da pele dos animais experimentais (n=5/grupo) no último dia experimental (6º dia), verificada por citometria de fluxo. Controle: sem indução de lesão. IMQ: grupo tratado apenas com imiquimode. Bm-nr-264079: grupo tratado com a proteína recombinante e imiquimode. Resultados foram comparados através de ANOVA com pós-teste Bonferroni em GraphPad Prism 6.0, e foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

Figura 17. Ocorrência de leucócitos totais e neutrófilos no local de indução da lesão por imiquimode.

Contagem absoluta de leucócitos totais (A) e neutrófilos (B) na pele dos animais experimentais, no local da lesão (n=5/grupo) no último dia experimental (6º dia), verificada por citometria de fluxo. Controle: sem indução de lesão. IMQ: grupo tratado apenas com imiquimode. Bm-nr-264079: grupo tratado com a proteína recombinante e imiquimode. Resultados foram comparados através de ANOVA com pós-teste Bonferroni em GraphPad Prism 6.0, e foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

A diminuição da inflamação e da espessura da pele dos animais tratados com a proteína Bm-nr-264079 recombinante de carrapatos *R. microplus* corrobora trabalho de Déruaz e colaboradores (2008) que mostrou que a administração da Evasin-1 de carrapatos *R. sanguineus* reduziu significativamente o espessamento da derme e da epiderme em modelo experimental de psoríase induzida por TPA (do inglês *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*). Porém, não fomos capazes de elucidar o mecanismo pelo qual isso ocorre, tendo em vista que a frequência das populações celulares mais relevantes para a manutenção e desenvolvimento da doença não se alteraram de modo significativo em nosso estudo.

4.6 Efeito antimicrobiano da proteína Bm-nr-264079

Anteriormente, nosso grupo de pesquisa havia detectado que algumas proteínas salivares identificadas em carrapatos *R. microplus* apresentavam outras

funções além daquelas preditas *in silico* (dados não publicados). Estudos tem mostrado que proteínas salivares de carrapatos inibem o crescimento *in vitro* de bactérias Gram-positivas e negativas (SUN et al, 2017; SAITO et al, 2009, PICHU et al, 2009, LAI et al, 2004). Visto que a proteína Bm-nr-264079 não apresenta domínios conservados em sua estrutura e que ela também poderia apresentar outra função, avaliamos seu potencial efeito antimicrobiano em bactérias *S. aureus* ATCC 33591 e *S. uberis* NCTC 3858, que são comumente encontradas na pele de bovinos (MARSILIO et al, 2018).

Para tal, aplicamos ensaio de determinação da concentração inibitória mínima pelas metodologias de microdiluição em caldo (Figura 18) e teste de difusão em disco (Tabela 5, Figura 19). Em ambas as técnicas, foram considerados controles positivos de inibição os cultivos das bactérias na presença dos antibióticos ampicilina e penicilina. Como controle negativo da inibição, foi considerado o crescimento das bactérias no meio de cultivo adicionado de PBS. Em nenhum dos experimentos houve diferença estatística entre os testes e o grupo controle negativo (PBS, sem inibição o crescimento), indicando que a proteína Bm-nr-264079, na configuração em que é produzida e nas concentrações testadas, não apresenta atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *S. uberis*.

Figura 18. Atividade da proteína Bm-nr-264079 sobre o crescimento de *S. aureus* (A) e *S. uberis* (B) avaliada através de teste de determinação da concentração inibitória mínima em caldo.

CPI - Controle Positivo de Inibição: cultivo de *S. aureus* ou *S. uberis* na presença de ampicilina 59 µg/mL + penicilina 59 µg/mL. CNI - Controle Negativo de Inibição: cultivo de *S. aureus* ou *S. uberis* em meio. Experimento realizado em triplicata. Resultados foram comparados através de Teste t de Student não pareado em GraphPad Prism 6.0. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

Tabela 5. Atividade da proteína Bm-nr-264079 sobre o crescimento de *S. aureus* (A) e *S. uberis* (B) através de teste de disco difusão.

Substância/quantidade no disco	Bactéria/ tamanho do halo de inibição (cm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. uberis</i>
Ampicilina/ 59 µg + Penicilina/ 59 µg	2	3,1
Água ultrapura estéril	0	0
Bm-nr-264079/ 5 µg	0	0
Bm-nr-264079/ 30 µg	0	0
Bm-nr-264079/ 50 µg	0	0
Bm-nr-264079/ 100 µg	0	0

Experimento realizado em duplicata.

Figura 19. Atividade da proteína Bm-nr-264079 sobre o crescimento de *S. aureus* (A) e *S. uberis* (B) através de teste de disco difusão.

Imagem representativa do teste de disco difusão utilizando 30 µg da proteína Bm-nr-264079 recombinante por disco (branco) e 30 µg de ampicilina + 30 µg de penicilina por disco (disco com asterisco), utilizado como controle de inibição do crescimento bacteriano.

Apesar de alguns estudos descreverem a atividade antimicrobiana da saliva do carrapato *R. microplus* (JOAZEIRO et al, 2012), este efeito não foi observado para a proteína Bm-nr-264079.

5 Conclusão e perspectivas futuras

Neste trabalho, descrevemos características estruturais, produção recombinante e algumas atividades da proteína Bm-nr-264079, uma evasina putativa identificada na saliva de carrapatos *R. microplus*. Análises comparativas entre as estruturas primárias e tridimensionais da proteína Bm-nr-264079 com evasinas putativas ou caracterizadas de outros carrapatos demonstraram a existência de similaridades entre as sequências estudadas, indicando que esta proteína apresenta potencial atividade de evasina.

A expressão heteróloga da proteína Bm-nr-264079 foi possível utilizando-se sistema procarioto de expressão (*E. coli* Rosetta), o que gerou a proteína de interesse na forma insolúvel. A aplicação de protocolo de desnaturação e renaturação permitiu a obtenção da proteína em seu formato solúvel para purificação e utilização nos experimentos descritos ao longo deste trabalho.

Nas condições testadas, a proteína Bm-nr-264079 recombinante apresentou atividade inibidora do desenvolvimento de lesão de psoríase na pele dos animais tratados, com redução da espessura da pele e do edema, sugerindo que a proteína produzida neste formato pode apresentar propriedades de interesse farmacológico. Delineamentos experimentais que explorem mais os componentes imunológicos envolvidos no efeito da proteína na lesão da psoríase podem ser úteis para a melhor caracterização funcional desta proteína.

Em relação ao crescimento bacteriano de *S. aureus* e *S. uberis*, a proteína Bm-nr-264079 recombinante não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana.

No trabalho aqui apresentado, exploramos o potencial terapêutico desta proteína em psoríase; estudos funcionais adicionais podem ser úteis para um melhor entendimento da relação carrapato-hospedeiro e contribuir para o combate deste parasita.

Referências bibliográficas

- ABBAS et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 6–20, 2014.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. A.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 8 ed. Saunders, 2014.
- ALI et al. Reprolysin metalloproteases from *Ixodes persulcatus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 63, n. 4, p. 559-578, 2014.
- ARRUDA, L. H. F; CAMPBELL, G. A. M, TAKAHASHI, M. D. F. Psoríase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 76, p. 141-167, 2001.
- BECHARA, G. H.; MORELLI JÚNIOR, J.; SZABÓ, M. P. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, n. 1, p. 570–5, 25 jan. 2000.
- BOEHNCKE, W.H.; SCHÖN, M. P. Psoriasis. **Lancet**, v. 5; n. 386(9997), p. 983-94, 2015.
- BONVIN P. et al. Identification of the pharmacophore of the CC chemokine-binding proteins Evasin-1 and -4 using phage display. **Journal of Biological Chemistry**, 2014.
- BONVIN, P. et al. Evasins: Therapeutic Potential of a New Family of Chemokine-Binding Proteins from Ticks. **Frontiers in Immunology**, 2016.
- BRAUNERSREUTHER, V. et al. Treatment with the CC chemokine-binding protein Evasin-4 improves post-infarction myocardial injury and survival in mice. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 110, p. 807–25, 2013.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. **Parasitology**, v. 129, S161–S176, 2004.
- BRUNER, CHRISTINE R. et al. A systematic review of adverse effects associated with topical treatments for psoriasis. **Dermatology Online Journal**, v. 9, n.1, 2003.
- CARVALHO, W. A. et al. *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, *Bos taurus* and *Bos indicus*. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 587–91, abr. 2008.

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.

CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**. 2012 Sep-Oct;30(5):1102-7.

CHMELAR, J. et al. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 13, p. 3842-54, 2012.

COURDEC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 2279-2289, 1980.

CREGG, J. M. et al. Expression in the yeast *Pichia pastoris*. **Methods Enzymology**. v. 463, p. 169-89, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437-46, 2012.

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

DE LA FUENTE, J. et al. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac (TM). **Genet Anal**, v. 15, p. 143–8, 1999.

DE LA FUENTE, J. et al. Field studies and cost-effectiveness of vaccination with Gavac against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 16, p. 366–73, 1998.

DE LA FUENTE, J. et al. Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience**, v.13, p. 6938–46, 2008.

DE LA FUENTE, J.; CONTRERAS, M. Tick vaccines: current status and future directions. **Expert Review of Vaccines**. p. 1–10. 2015.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009.

DÉRUAZ, M., et al. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, p. 2019–31, 2008.

DÉRUAZ, M., et al. Evasin-4, a tick-derived chemokine-binding protein with broad selectivity can be modified for use in preclinical disease models. **FEBS Journal**, v. 280, p. 4876–87, 2013.

DIAS, J.M. et al. Structural Basis of Chemokine Sequestration by a Tick Chemokine Binding Protein: The Crystal Structure of the Complex between Evasin-1 and CCL3. **PLOS ONE**, v. 4, n.12, 2009.

DUARTE, A.; CHEHIN, F. Psoríase moderada a grave tratada com infliximabe em 53 pacientes: perfil dos pacientes, eficácia e efeitos adversos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p. 257-263, 2011.

ESTRADA-PEÑA, A. et al. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 38, n. 2–3, p. 219–235, 2006.

FRAUENSCHUH, A. et al. Molecular Cloning and Characterization of a Highly Selective Chemokine-binding Protein from the Tick *Rhipicephalus sanguineus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 27250 –27258, 2007.

GARCIA, G. R. **Estudo do proteoma e imunoproteoma salivar do carrapato de bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, para identificação e caracterização de antígenos silenciosos**. Doutorado (Tese em Imunologia Básica e Aplicada) – FMRP - USP. Ribeirão Preto, p. 242. 2013.

GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., WILKINS, M. R., APPEL, R. D., & BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In **The Proteomics Protocols Handbook** (pp. 571-607). Humana press. 2005.

GILLIET, M. et al. Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. **Archives of Dermatology**, v. 140.12, p. 1490-1495, 2004.

GONZÁLES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Sulina, 1995. 235 p.

GREB, J. E. et al. Psoriasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 16082, 2016.

GRISI, L. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

HABECK, M. Vaccinating against ticks. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 11, p. 586-8, 2002.

HAJNICKA, V. et al. Anti-interleukin-8-activity of tick salivary gland extracts. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 483-489, 2001.

HAYWARD, J., SANCHEZ, J., PERRY, A., HUANG, C., VALLE, M. R., CANALS, M., ... & STONE, M. J. Ticks from diverse genera encode chemokine-inhibitory evasin proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 38, p. 15670-15680, 2017.

HENRIOUD, A. N. Towards sustainable parasite control practices in livestock production with emphasis in Latin America. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 2–11, 2011.

JOAZEIRO, A. C. Antimicrobial Peptides in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Acta Scientiae Veterinari**, v. 40, n. 4, 2012.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, Suppl:S3-14, 2004.

JONSSON, N.N. et al. Evaluation of TickGARD(PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein– Friesian cows. **Veterinary Parasitology**, v. 88, p. 275–85, 2000.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 1–10, 2006.

KAZIMÍROVÁ, M.; STIBRÁNIOVÁ, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 43. 2013.

KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845-58, 2015.

KEMP, D.H.; STONE, B.F; BINNINGTON, K.C. Tick attachment and feeding: role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response. **Physiology of Ticks**, v. 1, p. 119-168, 1982.

KJÆR, T. N., THORSEN, K., JESSEN, N., STENDERUP, K., & PEDERSEN, S. B. Resveratrol ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice. **PLOS ONE**, 10(5), e0126599. 2015.

LAI, R. et al. A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. **FASEB Journal**, v. 18, n. 12, p. 1447-9, 2004.

LEW-TABOR et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick in vitro feeding methods for functional (dsRNA) and vaccine candidate (antibody) screening. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 5, n. 5, p. 500-10, 2014.

LIMA, E.A.; LIMA, M.A. Imunopatogênese da psoríase: revisando conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1151-8, 2011.

MACHADO, M.A. et al. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*). **BMC Genomics**, v. 11, 2010.

MARITZ-OLIVIER, C. et al. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. **Trends in Parasitology**, v. 23, p. 397–407, 2007.

MARSILIO, F.; DI FRANCESCO, C. E.; DI MARTINO, BARBARA. **Pet-To-Man Travelling Staphylococci A World in Progress**, p. 43-50, 2018.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H.; BITTENCOURT, V. R.; OLIVEIRA, J. B. & SILVA, K. M. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBM86- “GAVAC” contra o carrapato *Boophilus microplus* no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 167-173, 1995.

MCWILLIAM, H., LI, W., ULUDAG, M., SQUIZZATO, S., PARK, Y. M., BUSO, N., ... & LOPEZ, R. Analysis tool web services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, 41(W1), W597-W600. 2013.

MONTECUCCO, F. et al. Single Administration of the CXC Chemokine-Binding Protein Evasin-3 During Ischemia Prevents Myocardial Reperfusion Injury in Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, p. 1371-1377, 2010.

MOORHOUSE, D.E. The attachment of some ixodid ticks to their natural hosts. Proceedings of the 2nd International Congress of Acarology. Budapest, Hungary: Hungarian Academy of Sciences. P. 319–327, 1969.

NETO, L. R. P. et al. Molecular genetic approaches for identifying the basis of variation in resistance to tick infestation in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 165-172, 2011.

NICHOLAS, K. B.; HUGH, B. Jr. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. 1997.

NIELSEN, H. Predicting secretory proteins with SignalP. **Protein Function Prediction: Methods and Protocols**, 59-73. 2017.

NUÑES, J. L.; MUÑOZ COBENAS, M. E.; MOLTEDO, H. L. *Boophilus microplus*, la garrapata comum del ganado vacuno. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 19 p., 1982.

NUTTALL, P.A.; LABUDA, M. Saliva-assisted transmission of tick-borne pathogens. *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge, Cambridge University Press, 205-219, 2008.

PAESEN, G.C. et al. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. **Molecular Cell**, v. 3, p. 661–671, 1999.

PAESEN, G. C. et al. Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1482, p. 92-101, 2000.

PALOMINO, D.C.; MARTI, L.C. Chemokines and immunity. **Einstein**, v. 13, n. 3, p. 469-73, 2015.

PARIZI, L. F. et al. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 2009.

PARIZI, L. F. et al. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: A field evaluation. **Vaccine**, v. 30, p. 6912– 6917, 2012.

PERERA et al. Psoriasis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, p. 385-422, 2012.

PETERKOVÁ, K. et al. Immunomodulatory arsenal of nymphal ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 22, p. 167–71, 2008.

PUNDIR, S., MARTIN, M. J., O'DONOVAN, C., & UNIPROT CONSORTIUM. UniProt tools. **Current Protocols in Bioinformatics**, v.53, n. 1, p. 1-29, 2016.

PICHU, S.; RIBEIRO, J. M.C.; MATHER, T. N. Purification and Characterization of A Novel Salivary Anti Microbial Peptide from the tick, *Ixodes scapularis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 3, p. 511–515, 2009.

QU, N. et al. Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in inflammatory diseases. **Clinical and Developmental Immunology**, 2013.

RAUT, A. S.; PRABHU, R. H.; PATRAVALE, V. B. Psoriasis clinical implications and treatment: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 30, n. 3, p. 183-216, 2013.

RECHAV, Y. Naturally acquired resistance to ticks — A global view. **Insect Science and its Application**, v. 13, n. 4, p. 495-504, 1992.

- RIBEIRO, J.M.C. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of tick, *Ixodes dammini*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 161, p. 332-344, 1985.
- RODRIGUES, D.S; LEITE, R.C. Economic impact of Rhipicephalus (Boophilus) microplus: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1570-2, 2013.
- RODRIGUEZ, M. et al. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of Boophilus microplus in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine**, v. 13, n. 18, p. 1804-1808. 1995a.
- RODRÍGUEZ, M. et al. Control of Boophilus microplus populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 339–49. 1995b.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–17, 2014.
- ROSSO, J. Topical Imiquimod Therapy for Actinic Keratosis. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 1, n. 3, p. 44–47, 2008.
- RUSSO, R.C. et al. Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 45, p. 72–80, 2011.
- SABAT, R. et al. Immunopathogenesis of psoriasis. **Experimental Dermatology**, v.16, p. 779-98, 2007.
- SAITO, Y. Identification and characterization of antimicrobial peptide, defensin, in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. **Insect Molecular Biology**, v. 18, n. 4, p. 531-9, 2009.
- SCACCABAROZZI, L. et al. Análise de custo por resposta dos medicamentos biológicos no tratamento da psoríase moderada a grave sob as perspectivas dos sistemas de saúde público e privado, no Brasil. **JBES: Brazilian Journal of Health Economics**, v. 8, n. 2, 2016.
- SCHOELER, G. B.; MANWEILER, S. A.; WIKEL, S. K. *Ixodes scapularis*: Effects of Repeated Infestations with Pathogen-Free Nymphs on Macrophage and T Lymphocyte Cytokine Responses of BALB/c and C3H/HeN Mice. **Experimental Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 239–248, 1999.

SCHÖN, M. P.; HENNING, W. B. Psoriasis. **New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1899-912, 2005.

SFIKAKIS, P. P. et al. Psoriasis induced by anti-tumor necrosis factor therapy: a paradoxical adverse reaction. **Arthritis & Rheumatology**, v. 52, n. 8, p. 2513-2518, 2005.

SMIALOWSKI, P., MARTIN-GALIANO, A. J., MIKOLAJKA, A., GIRSCHICK, T., HOLAK, T. A., & FRISHMAN, D. Protein solubility: sequence based prediction and experimental verification. **Bioinformatics**, v. 23, n. 19, p. 2536-2542, 2006.

SUN, T. et al. Functional characterization of two defensins, HIDS1 and HIDS2, from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **Parasites & Vectors**, v. 10, p. 455, 2017.

SUTTON, C. E.; MIELKE, L. A.; MILLS, K. H. G. IL- 17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells. **European journal of immunology**, v. 42.9, p. 2221-2231, 2012.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetic Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TEUNISSEN et al. Interleukin-17 and interferon- γ synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, 111.4, p. 645-649, 1998.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VALLE, M. R.; GUERRERO, F. D. Anti-tick vaccines in the omics era. **Frontiers in Bioscience (Elite edition)**, v. 10, n. 2, p. 122–136, 2018.

VAN DER FITS, L. et al. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 9, p. 5836-5845, 2009.

VASCONCELOS, A. T. R.; ALMEIDA, D. F. **Biologia Molecular Básica**. Bioinformática na análise de genes e genomas. 4 ed. Artmed, 2012. P. 364-381.

VIEIRA, A. T. et al. Treatment with a Novel Chemokine-Binding Protein or Eosinophil Lineage-Ablation Protects Mice from Experimental Colitis. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 6, p. 2382-2391, 2009.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, 46(W1), W296-W303, 2018.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, v. 129, p. 367–87, 2004.

WILLADSEN, P.; KEMP, D.H. Vaccination with 'Concealed' Antigens for Tick Control. **Parasitology Today**, v. 4, n. 7, 1988.

WOLK et al. IL- 22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. **European Journal of Immunology**, v. 36.5, p. 1309-1323, 2006.

WU, J.; SILLER, G.; STRUTTON, G. Psoriasis induced by topical imiquimod. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 45, n. 1, p. 47-50, 2004.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 23;9:40, 2008.