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

AMANDA FONSECA ZANGIROLAMO

**Associação de alótipos de IgG1 e IgG2 bovina com raças
geneticamente resistentes e suscetíveis a carrapatos e suas
interações com a proteína ligante de IgG (IGBP-C) da saliva do
carrapato do boi, *Rhipicephalus microplus***

Ribeirão Preto

2017

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

**Associação de alótipos de IgG1 e IgG2 bovina com raças
geneticamente resistentes e suscetíveis a carrapatos e suas
interações com a proteína ligante de IgG (IGBP-C) da saliva do
carrapato do boi, *Rhipicephalus microplus***

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada
Orientadora: Profa. Dra. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Zangirolamo, Amanda Fonseca

Associação de alótipos de IgG1 e IgG2 bovina com raças geneticamente resistentes e suscetíveis a carrapatos e suas interações com a proteína ligante de IgG (IGBP-C) da saliva do carrapato do boi, *Rhipicephalus microplus*, 2017.

153p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: de Miranda-Santos, Isabel Kinney Ferreira

1. Carrapato.
2. Mecanismos de escape.
3. Imunoglobulinas.
4. Alótipos de IgG bovina.
5. Proteína ligante de IgG.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ZANGIROLAMO, A.F.

Associação de alótipos de IgG1 e IgG2 bovina com raças geneticamente resistentes e suscetíveis a carrapatos e suas interações com a proteína ligante de IgG (IGBP-C) da saliva do carrapato do boi, *Rhipicephalus microplus*.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências – Área de Concentração: Imunologia
Básica e Aplicada.

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

Profª. Drª. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Ademilson Panunto Castelo

Instituição: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP

Assinatura: _____

Profª. Drª. Cleni Mara Marzocchi Machado

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP/USP

Assinatura: _____

Profª. Drª. Aparecida Sadae Tanaka

Instituição: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP. Campus São Paulo

Assinatura: _____

Prof. Dr. Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna

Instituição: Instituto Butantan.

Assinatura: _____

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2012/11372-3 e 2012/14488-2, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 130210/2012-9 e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), processo PROEX.

Aos meus amados pais, **Marly** (razão e garra que me orientam) e
Luiz Carlos (emoção desmedida que transborda em meu peito).

Ao meu irmão, **Jorge Luiz** (pureza que sempre me acalenta).

À minha metade, **Glauco** (Amor e compreensão que me impulsionam).

E à todas as pessoas que um dia possam se
beneficiar com os resultados obtidos neste trabalho!

“Tudo que é seu, encontrará uma maneira de chegar até você”

(Chico Xavier)

“Existe uma grande questão que é trabalhada pela ciência, pela arte, pela filosofia e pela religião. A pergunta mais estridente: “Por que as coisas existem? Por que existimos? Qual é o sentido da existência?” Para essa pergunta, há quatro grandes caminhos de reposta: o da ciência, o da arte, o da filosofia e o da religião. De maneira geral, a ciência busca os “comos”. A arte, a filosofia e a religião buscam os “porquês”, o sentido. A arte, a filosofia e a religião são uma recusa à ideia de que sejamos apenas o resultado da junção casual de átomos, de que sejamos apenas uma unidade de carbono e de que estejamos aqui só de passagem. Como milhões de pessoas no passado e no presente, acho que seria muito fútil se assim fosse. Eu me recuso a ser apenas algo que passa. Eu desejo que exista entre mim e o resto da vibração da vida uma conexão. Essa conexão é exatamente a construção do sentido: eu existo para fazer a existência vibrar. E ela vibra em mim, no outro, na natureza, na história”.

(Mario Sergio Cortella)

Agradeço sinceramente,

À Profa. Dra. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos, minha gratidão, por confiar em minha capacidade e autonomia e por incitar em mim, o espírito investigativo mesmo nas pequenas coisas! Muito obrigada!

Aos meus amados pais (Luiz Carlos e Marly) e meu irmão, Jorgião, pela sustentação e amor incondicional e ao meu esposo (Glauco Roberto) pela paciência e carinho!!

Aos Professores Dr. João Santana da Silva, Dr. Célio Lopes, Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira e Profa. Dra. Yara Valim por disponibilizarem prontamente os seus laboratórios.

À Profa Beatriz Rossetti Ferreira e a todo grupo dos “Carrapatólogos” e amigos de laboratório, por todo apoio, amizade, risadas e bons momentos.

Aos funcionários e amigos do coração, Wendy Martin Rios (meu anjo científico rs), Sandra Thomás (Darling), Ana Paula Masson (Aninha), Izaira Tincani Brandão (Iza), Dorlei dos Santos (Dorlis) e Carlos Alberto Vieira (Betão) e Ana Elisa Caleiro, pela valiosa colaboração, sorrisos e disponibilidade constantes.

Ao Prof. Eduardo Brandt pelas conversas tão preciosas e paciência em (tentar) me ensinar Bioquímica rs

À Profa Aparecida Sadae Tanaka e ao seu esposo Ricardo Torquato por me salvarem da escuridão do Biacore rs, mas principalmente pela disponibilidade em me receber em seu laboratório e paciência durante a minha estadia na UNIFESP, juntamente com o Prof. Dr Ivarne Tersariol.

À Ana Cristine Silva Ferreira, secretária do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP-USP pelo auxílio e também pelas boas risadas

Aos amigos queridos, Letícia Magalhães Arruda (Siss!!!!), Laís Sacramento, Camila Gachet, Virginia Reis e todos do apoio Espiritual de Ribeirão Preto e do grupinho do Reiki =D

Aos familiares e amigos, aqui não citados, mas que de diferentes formas se fizeram presentes e me apoiaram.

A todos os professores, funcionários e colegas que de forma indireta ou direta, também contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

RESUMO

ZANGIROLAMO, A. F. **Associação de alótipos de IgG1 e IgG2 bovina com raças geneticamente resistentes e suscetíveis a carrapatos e suas interações com a proteína ligante de IgG (IGBP-C) da saliva do carrapato do boi, *Rhipicephalus microplus*.** 153f. 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O carrapato do boi, *Rhipicephalus microplus*, é o principal empecilho para o avanço da produção pecuária, causando enormes prejuízos econômicos. Durante a infestação, o carrapato acaba ingerindo uma grande quantidade de imunoglobulinas presentes no soro do hospedeiro. Desse modo, como mecanismo de defesa e com o objetivo de auxiliar o repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas, carrapatos machos Ixodidae, secretam proteínas ligantes de IgG (IGBPs) contidas em sua saliva, teoricamente interferindo na ligação específica de anticorpos com antígenos do carrapato, bem como nas funções efetoras da IgG. Raças bovinas taurinas e zebuínas possuem uma peculiar distribuição de alótipos de IgG e, ao mesmo tempo, frente às infestações por carrapatos, tais raças se comportam de maneira distinta, sendo taurinas susceptíveis e zebuínas resistentes a esse ectoparasita. Uma vez que já é relatado na literatura existir diferença na ligação entre as IGBPs de diversos patógenos e os diferentes alótipos de IgG, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a natureza das interações entre a IGBP-C de *R. microplus* e os alótipos de IgG bovina de animais suscetíveis ou resistentes a carrapatos. Para isso, foi feita a genotipagem por sequenciamento da região CH1-CH3 de IgG1 e IgG2, de 40 bovinos da raça taurina Holandesa (Holandês preto e branco - HPB) e 40 bovinos zebuínos da raça Nelore, com posterior purificação do alótipo de IgG1 e IgG2 mais comum em cada raça a partir do soro dos animais homozigotos. Curiosamente, verificou-se que havia uma associação entre os genótipos da região constante da cadeia pesada de IgG1 e IgG2 com os fenótipos de infestação por carrapato observados nos animais estudados. Em seguida, foram realizados ensaios em sistema de Ressonância Plasmônica de Superfície (Biacore T200 – GE Healthcare) para avaliar a afinidade de ligação entre a proteína recombinante IGBP-C e os alótipos de IgG1 e IgG2 bovinas, de uma forma não cognata. Por meio do ensaio em Biacore, observou-se uma maior afinidade de ligação da IGBP-C com alótipos de IgG2 de ambas as raças estudadas em relação aos alótipos de IgG1 e apesar de ligar em mais moléculas do alótipo de IgG2 mais frequente em bovinos Nelore (resistente a carrapato), apresentou uma afinidade maior para o alótipo de IgG2 mais frequente na raça HPB (suscetível a carrapato). Além disso, foi possível confirmar a porção Fc como o sítio de ligação preferencial da IGBP-C na IgG. Por fim, para um maior entendimento da sua função, foi feita a modelagem por homologia da IGBP-C e em ensaios adicionais, visto que essa proteína também interfere no processo de angiogênese, bem como na ativação da via clássica do complemento. Em suma, no presente trabalho foi possível descrever algumas funções promovidas pela IGBP-C, demonstrando assim, a sua importância em compor mecanismos de escape do carrapato *R. microplus* em relação a resposta imune do hospedeiro.

Palavras-chave: carrapato, mecanismos de escape, imunoglobulinas, alótipos de IgG bovina, proteína ligante de IgG.

ABSTRACT

ZANGIROLAMO, A. F. **The association of bovine IgG1 and IgG2 allotypes with genetically resistant and susceptible breeds to ticks and their interactions with the IgG binding protein (IGBP-C) of the cattle tick saliva, *Rhipicephalus microplus*.** 153p. 2017. Thesis (Doctoral) - Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, is the main impediment to the advance of livestock production, causing enormous economic losses. During infestation, the tick ingests a large amount of immunoglobulins present in the host's serum. Consequently as a defense mechanism and for assisting the blood meal performed by females, male Ixodidae ticks secrete IgG binding proteins (IGBPs) contained in their saliva, theoretically interfering in the specific binding of antibodies with tick antigens and in the effector functions of IgG. The taurine and zebu bovine breeds have a peculiar distribution of IgG allotypes and also present different phenotypes of tick infestation, being susceptible taurines and zebuines resistant to this ectoparasite. Since it is reported in the literature that there is a difference in the binding between the IGBPs of different pathogens and the different IgG allotypes, the present work aimed to evaluate the nature of the interactions between the IGBP-C of *R. microplus* and the IgG from susceptible or tick resistant animals. For this, was done genotyping by sequencing of the CH1-CH3 region of IgG1 and IgG2 from forty Holstein taurine and forty Nelore zebu cattle, with subsequent purification of the more common IgG allotypes in each breed, from the serum of homozygous animals. Interestingly, there was an association between IgG1 and IgG2 heavy chain constant region genotypes with tick infestation phenotypes. Subsequently, assays were performed in Surface Plasmon Resonance System (Biacore T200) to evaluate the binding affinity between the recombinant IGBP-C protein and the bovine IgG1 and IgG2 allotypes in a non-cognate manner. Through the Biacore assay, was observed that IGBP-C binding more affinity with IgG2 than IgG1 allotypes of both breeds, and although IGBP-C binds more molecules of the most frequent IgG2 allotype in Nelore tick resistant cattle, showed a higher affinity for the most frequent IgG2 allotype in the HPB, tick susceptible cattle. In addition, it was possible to confirm the Fc portion as the preferred binding site of IGBP-C in IgG. The homology modeling of this protein was done for a better understanding of its function and finally, IGBP-C has also been shown to interfere with the angiogenesis process, as well as in the activation of the classical complement pathway. In short, in the present work it was possible to describe some of the functions promoted by the IGBP-C, thus demonstrating its importance in composing escape mechanisms of the *R. microplus* tick to the host immune response.

Key words: tick, escape mechanisms, immunoglobulins, bovine IgG allotypes, IgG binding protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	21
Figura 2. Fluxograma do delineamento experimental conduzido no presente trabalho.....	60
Figura 3. Foto modelo utilizada para a classificação de vacas HPB em escores de infestação por carrapato na escala de 0-4.	62
Figura 4. Fotos abrangendo a região posterior e de inserção do úbere de animais HPB.	63
Figura 5. Raspagem da região ventral do membro posterior direito de bovinos HPB.....	63
Figura 6. Amplificação dos domínios CH1- CH3 de IgG1 de bovinos Nelore e HPB.	64
Figura 7. Amplificação dos domínios CH1- CH3 de IgG2 de bovinos Nelore e HPB.....	65
Figura 8. Purificação do produto da amplificação dos domínios CH1- CH3 de IgG1 de bovinos Nelore e HPB Nelore.	65
Figura 9. Purificação do produto da amplificação dos domínios CH1- CH3 de IgG2 de bovinos Nelore e HPB.	66
Figura 10. Mapa de Correspondência entre haplótipos de IgG1 e escores de infestação por carrapato em bovinos HPB.	68
Figura 11. Mapa de Correspondência entre haplótipos de IgG2 e escores de infestação por carrapato em bovinos HPB.	69
Figura 12. Distribuição dos escores de infestação por carrapato e aminoácidos presentes na região de dobradiça de IgG1 bovina.	70
Figura 13. Distribuição dos escores de infestação por carrapato e aminoácidos presentes na região de dobradiça de IgG2 bovina.	70
Figura 14. Distribuição das categorias de infestação por carrapato e aminoácidos presentes na região de dobradiça de IgG1 bovina.	71
Figura 15. Distribuição das categorias de infestação por carrapato e aminoácidos presentes na região de dobradiça de IgG2 bovina.	71
Figura 16. Mapa de Correspondência entre o haplótipo “TIP” de IgG1 e os escores de infestação por carrapato em bovinos HPB..	72

Figura 17. Mapa de Correspondência entre o haplótipo “RDP” de IgG1 e os escores de infestação por carrapato em bovinos HPB.	73
Figura 18. Mapa de Correspondência entre o haplótipo “SPNH” de IgG2 e os escores de infestação por carrapato em bovinos HPB.	74
Figura 19. Mapa de Correspondência entre o haplótipo “IHP” de IgG2 e os escores de infestação por carrapato em bovinos HPB.	74
Figura 20. Ultradiafiltração de gamaglobulinas.	75
Figura 21. Etapas de purificação dos alótipos de IgG1 e 2 bovina.	76
Figura 22. Alótipos de IgG1 e IgG2 de Nelore e HPB.....	77
Figura 23. Confirmação da subclasse dos alótipos de IgG1.....	78
Figura 24. Confirmação da subclasse dos alótipos de IgG2.....	78
Figura 25. Sequências de aminoácidos e nucleotídeos da IGBP-C de <i>R. microplus</i>	79
Figura 26. Extração da sequência da IGBP-C a partir de fago.....	80
Figura 27. Confirmação da clonagem.....	81
Figura 28. Análise de sítios de N-glicosilação na sequência da IGBP-C de <i>R. microplus</i>	81
Figura 29. Análise de sítios de O-glicosilação na sequência da IGBP-C de <i>R. microplus</i>	82
Figura 30. Padronização da expressão da IGBP-C.....	82
Figura 31. Expressão da IGBP-C em bactérias <i>E.coli</i> da cepa Rosetta.....	83
Figura 32. Detecção da expressão da IGBP-C recombinante por <i>western blot</i>	84
Figura 33. Teste Solubilidade da IGBP-C.....	84
Figura 34. Purificação da IGBP-C.....	85
Figura 35. Interação IGBP-C com subclasses IgG1 e IgG2 bovina totais.	86
Figura 36. IGBP-C recombinante utilizada como analito nos ensaios em Biacore.....	88

Figura 37. Interação entre a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i> e subclasse IgG1 bovina em Biacore.....	89
Figura 38. Interação entre a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i> e subclasse IgG2 bovina em Biacore.....	90
Figura 39. Interação entre a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i> e subclasses de IgG1 e IgG2 bovina em Biacore.....	90
Figura 40. Interação entre a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i> e o alótipo de IgG1 mais frequente em bovinos HPB em Biacore.	91
Figura 41. Interação entre a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i> e o alótipo de IgG2 mais frequente em bovinos HPB em Biacore.	92
Figura 42. Interação entre a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i> e alótipes de IgG1 e IgG2 mais frequentes em bovinos HPB em Biacore.	92
Figura 43. Interação entre a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i> e o alótipo de IgG1 mais frequente em bovinos Nelore em Biacore.	93
Figura 44. Interação entre a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i> e o alótipo de IgG2 mais frequente em bovinos Nelore em Biacore.	94
Figura 45. Interação entre a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i> e alótipes de IgG1 e IgG2 mais frequentes em bovinos Nelore em Biacore.....	94
Figura 46. Interação entre a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i> e fragmentos Fc, Fab e F(ab') ₂ de IgG bovina em Biacore.....	95
Figura 47. Colônia de carrapatos da espécie <i>R. microplus</i>	96
Figura 48. Infestação artificial por carrapatos <i>R. microplus</i> em bovino HPB.....	96
Figura 49. Dissecção da glândula salivar de carrapatos machos <i>R. microplus</i>	97
Figura 50. Galinhas que foram imunizadas para a produção de IgY anti-rIGBP-C.....	97
Figura 51. Reconhecimento da IGBP-C por anticorpo IgY policlonal.	98
Figura 52. Presença da IGBP-C nativa em extrato de glândula salivar de carrapatos <i>R. microplus</i> machos.....	98
Figura 53. Ligação da IGBP-C com a heparina por meio de ensaio em Biacore.....	100

Figura 54. Análise da interação entre IGBP-C do carrapato <i>R. microplus</i> e a heparina por Espectroscopia de Fluorescência.	101
Figura 55. Variação da emissão de fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano da IGBP-C de <i>R. microplus</i> em função da concentração de heparina.	102
Figura 56. Análise da força de interação entre a IGBP-C de <i>R. microplus</i> e a heparina por meio de cromatografia de afinidade em coluna de heparina-Sepharose.	102
Figura 57. IGBP-C de <i>R. microplus</i> inibe a formação de tubos capilares de células endoteliais em Matrigel..	104
Figura 58. IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i> modula a atividade da via clássica do sistema complemento.	106
Figura 59. Composição atômica do modelo proposto para a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i>	107
Figura 60. Composição de alfa hélices e folhas beta no modelo proposto para a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i>	107
Figura 61. Potencial eletrostático do modelo proposto para a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i>	108
Figura 62. Validação do modelo proposto para a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i> pelo gráfico de Ramachandran.	109
Figura 63. Validação do modelo proposto para a IGBP-C de <i>Rhipicephalus microplus</i> pelo gráfico de Ramachandran, representação adicional.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD – do inglês, *Biochemical Oxygen Demand*
BSA – do inglês, *Bovine Serum Albumin*
cDNA – DNA complementar
CFA – do inglês, *Complete Freund Adjuvant*
CFD – do inglês, *Complement Fixation test Diluent*
CFU – do inglês, *Colony forming units*
CH – do inglês, *constant domains of the immunoglobulin heavy chains*
DAB – do inglês, *3,3'-diaminodbenzidine*
DNA – do inglês, *Deoxyribonucleic acid*
DNP – do inglês, *Dinitrophenol*
dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DO – Densidade óptica
DTH – do inglês, *Delayed-type Hypersensitivity*
ECL – do inglês, *Enhanced chemiluminescence*
EDTA – do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*
EHS – do inglês, *Engelbreth-Holm-Swarm*
ELISA – do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
Fab – do inglês, *Fragment antigen-binding*
Fc – do inglês, *Fragment crystallizable*
FcRn – do inglês, *neonatal Fc receptor*
GBS – do inglês, *Genotyping by Sequencing*
HRP – do inglês, *Horseradish Peroxidase*
Ig – Imunoglobulina
IGBPs – do inglês, *Immunoglobulin-G Binding Proteins*
IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB – Luria-Bertani
MM – Massa Molecular
MW – do inglês, *Molecular Weight*
MWCO – do inglês, *Molecular Weight Cut-Off*
PBS – do inglês, *Phosphate Buffered Saline*
PCR – do inglês, *Polimerase Chain Reaction*
rIGBP-C – IGBP-C recombinante

RNA – do inglês, *Ribonucleic acid*

RU – do inglês, *Response Units*

SBF – Soro Bovino Fetal

SDS-PAGE – do inglês, *Sodium Duodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*

Th – do inglês, *T helper*

TTBS – do inglês, *Tween – Tris Buffered Saline*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Infestações por carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i>	20
1.1.1 Características e ciclo de vida	20
1.1.2 Prejuízos e controle	21
1.2 A interface carrapato/hospedeiro	22
1.2.1 Resistência genética a carrapatos	22
1.2.2 Depuração de IgG feito pelo carrapato e proteínas ligantes de imunoglobulina-G (IGBPs)	25
1.2.3 Alótipos de IgG bovina e interação com as IGBPs de patógenos	28
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Animais	35
3.2 Coleta das amostras	35
3.3 Obtenção dos fenótipos de infestação de bovinos HPB por carrapatos <i>R. microplus</i>	35
3.4 Identificação dos animais homozigotos para os alótipos de IgG1 e 2 mais frequentes em cada raça	37
3.4.1 Amplificação dos genes que codificam para a região constante das cadeias pesadas de IgG1 e IgG2	37
3.4.2 Genotipagem por Sequenciamento (GBS)	38
3.5 Purificação dos alótipos de IgG1 e IgG2 de bovinos	39
3.5.1 Precipitação com solução saturada de sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄ e ultradiafiltração de gamaglobulinas	39
3.5.2 Construção das colunas de afinidade DNP-Sepharose e anti-IgG1 e anti-IgG2 bovina-Sepharose	40
3.5.3 Purificação de IgG bovina anti-DNP	40
3.5.4 Purificação de IgG1 e IgG2 bovina anti-DNP	41
3.6 Produção da proteína recombinante IGBP-C de <i>R. microplus</i>	41
3.6.1 Escolha e extração da sequência IGBP-C de <i>R. microplus</i> contida em fago	42
3.6.2 Reação de Clonagem	43
3.6.3 Expressão piloto e em grande escala	45
3.6.4 Diálise e purificação	46

3.7 Avaliação da interação entre a IGBP-C e subclasses IgG1 e IgG2 bovina por ELISA	46
3.8 Ensaio de interação entre os diferentes alótipos de IgG bovina e IGBP-C do carrapato <i>R. microplus</i> por meio do sistema de Ressonância Plasmônica de Superfície (Biacore).....	47
3.9 Investigação da região da IgG que a IGBP-C de <i>R. microplus</i> se liga por meio de ensaio em Biacore.....	49
3.10 Confirmação da presença da IGBP-C nativa em extrato de glândula salivar de carrapatos <i>R. microplus</i> machos	49
3.10.1 Produção de IgY anti-rIGBP-C	49
3.10.2 Carrapatos <i>Rhipicephalus microplus</i>	50
3.10.3 Infestação artificial em bovinos da raça Holandesa (HPB).....	50
3.10.4 Obtenção do extrato de glândula salivar de carrapatos machos <i>R. microplus</i>	51
3.11 Investigação de possíveis funções da IGBP-C de <i>R. microplus</i> que não a ligação em IgG bovina	51
3.11.1 Verificação da possível atividade de lectina da IGBP-C	52
3.11.1.1 Ensaio de hemaglutinação	52
3.11.1.2 Interação da IGBP-C com diferentes açúcares e glicosaminoglicanos por meio do sistema de Ressonância Plasmônica de Superfície (Biacore).....	53
3.11.1.3 Interação entre IGBP-C e heparina utilizando espectroscopia de fluorescência	53
3.11.1.4 Interação da IGBP-C com a heparina por meio de cromatografia de afinidade em coluna de heparina-Sepharose	54
3.12 Verificação da possível atividade da IGBP-C no processo de angiogênese	54
3.12.1 Ensaio de angiogênese <i>in vitro</i> sobre Matrigel.....	54
3.12.2 Atividade da IGBP-C na via clássica do sistema complemento.....	55
3.13 Ensaio hemolítico da via clássica	55
3.14 Modelagem por homologia da estrutura protéica de IGBP-C de <i>R. microplus</i>	57
3.15 <i>Western blot</i>	57
3.16 Cromatografia líquida - Espectrometria de massas (LC-MS/MS)	58
4 RESULTADOS	62
4.1 Obtenção dos fenótipos de infestação por carrapato em bovinos HPB	62
4.2 A frequência de haplótipos codificantes para a região CH1-CH3 de IgG1 e IgG2 é diferente entre bovinos da raça Nelore e HPB	64
4.3 Genótipos da região constante da cadeia pesada de IgG1 e 2 bovina estão associados a fenótipos distintos de infestação por carrapato <i>R. microplus</i>	67
4.4 Purificação dos alótipos de IgG1 e IgG2 mais frequentes em bovinos Nelore e HPB.....	75
4.5 Expressão heteróloga da IGBP-C de <i>R. microplus</i>	79
4.5.1 Escolha e extração da sequência da IGBP-C contida em fago	79
4.5.2 Clonagem e expressão da IGBP-C	80

4.5.3 Diálise e Purificação da IGBP-C	85
4.6 A ligação da IGBP-C de <i>R. microplus</i> é maior na subclasse IgG2 que IgG1 bovina.....	86
4.7 IGBP-C de <i>R. microplus</i> se liga mais em alótipos de IgG do bovino resistente (Nelore), porém com maior afinidade em alótipos de IgG do bovino suscetível (HPB)	87
4.8 IGBP-C de <i>R. microplus</i> se liga na região Fc da IgG de bovinos	95
4.9 IGBP-C está presente na glândula salivar de carrapatos <i>R. microplus</i> machos	95
4.10 Apesar de não possuir atividade lectínica, a IGBP-C se liga fracamente à heparina	99
4.11 IGBP-C modula negativamente o processo de angiogênese	103
4.12 IGBP-C modula negativamente a atividade da via clássica do sistema complemento ..	105
4.13 Modelo da IGBP-C de <i>R. microplus</i>	107
 5 DISCUSSÃO	 112
 6 CONCLUSÕES.....	 125
 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 127
 8 APÊNDICES	 144

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infestações por carrapatos *Rhipicephalus microplus*

1.1.1 Características e ciclo de vida

Rhipicephalus microplus, conhecido como o carrapato dos bovinos, é um ectoparasita hematófago pertencente ao filo *Arthropoda*, classe *Arachnida*, família *Ixodidae* (assim considerado carrapato de corpo duro). Por ser um parasita monoxeno, realiza seu ciclo de vida em um único hospedeiro, onde passa obrigatoriamente a maior parte de sua vida sobre ele ingerindo linfa, substratos teciduais e sangue (POWELL e REID, 1982).

O carrapato *R. microplus* encontra-se amplamente distribuído em áreas tropicais e subtropicais desde a latitude de 40° N até 30° S (FURLONG; CHAGAS; NASCIMENTO, 2002) e já fora reportado em todos os estados brasileiros (LABRUNA et al., 2005).

O ciclo de vida desse ectoparasita divide-se em fase de vida livre e fase de vida parasitária (**Figura 1**). A fase de vida livre tem início com a queda no solo da fêmea ingurgitada, chamada de teleógina, que após 2 a 3 dias inicia o período de ovipostura. Essa fase é seguida da fase de eclosão, com duração em torno de 5 a 10 dias, onde as neolarvas se tornam larvas infestantes após um período de 4 a 20 dias. Em condições ideais de umidade e temperatura, a fase de vida livre tem em média duração de um mês (GONZALES, 1974).

A fase de vida parasitária dura em torno de 21 dias e se inicia quando a larva infestante sobe no hospedeiro, passando então, a ser chamada de larva parasitária (GONZALES, 1975). As larvas alimentam-se preferencialmente de plasma, até que ocorra o processo de muda (ecdise) dando origem a ninfa. Uma nova ecdise acontece após cerca de 7 dias e as ninfas originam carrapatos adultos, machos ou fêmeas. A partir do 17º dia da infestação (3º dia da fase adulta), acontece o acasalamento e as fêmeas fecundadas continuam o processo de hematofagia. Nos momentos que precedem o rápido ingurgitamento das ninfas e, principalmente das fêmeas, o sangue do hospedeiro torna-se o principal constituinte alimentar do carrapato (BENNETT, 1974a, 1974b).

Após a cópula, as fêmeas sofrem um rápido ingurgitamento, podendo aumentar em até 200 vezes seu peso (KEMP, STONE e BINNINGTON, 1982). Posteriormente, essas fêmeas ingurgitadas caem no ambiente e fecham o ciclo novamente, com a produção de 2.000 a 3.000 ovos. Os machos, por sua vez, permanecem por mais tempo sobre o bovino, podendo ainda acasalar com outras fêmeas (FURLONG, 1993).

Figura 1. Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Disponível em: <<http://esteiogestao.com.br/index.php/2014/02/06/control-de-carrapatos-em-bovinos/#more-119>> Acesso em dez. 2016.

1.1.2 Prejuízos e controle

Um dos principais obstáculos à pecuária bovina mundial são as perdas econômicas decorrentes de infestações por endo e ectoparasitas (GRISI et al., 2002; JONSSON; DAVIS; DE WITT, 2001). Dentre os ectoparasitas de maior importância na bovinocultura, encontra-se o carrapato *R. microplus*, que acarreta prejuízos estimados em aproximadamente 2 bilhões de dólares anuais no Brasil (GRISI et al., 2002). No mundo, estima-se que cerca de 1,4 bilhões de bovinos são acometidos pelos danos provocados por carrapato (FAO, 2011).

Dentre os prejuízos causados pela infestação do *R. microplus* de forma direta, destacam-se o estresse, perda de peso, diminuição na produção de leite e carne, danos ao couro e a transmissão de doenças aos animais infestados. Aqueles resultantes dos custos da mão-de-obra necessária para o seu combate, assim como as demais despesas com compra de equipamentos e aquisição de carrapaticidas caracterizam os danos indiretos (EMBRAPA, 2000).

Medidas para o controle de carrapatos como o uso muitas vezes indiscriminado de agentes químicos, têm levado a níveis alarmantes de contaminação do meio ambiente e

presença de resíduos em carne e leite, além de favorecer a multiplicação e aparecimento de parasitas resistentes (GEORGE; POUND; DAVEY, 2004; KENNEDY; CANNAVAN; MCCRACKEN, 2000; KUNZ; KEMP, 1994).

Sendo assim, torna-se de grande importância a demanda urgente do desenvolvimento de alternativas sustentáveis para o controle desse ectoparasita, tais como vacinas e o estudo mais aprofundado de marcadores genéticos para resistência (FRISCH, 1999; PRUETT, 1999).

Atualmente existem duas vacinas anticarrapatos comercialmente disponíveis, TICK-GARD (australiana) (WILLADSEN et al., 1995) e GAVAC (cubana) (RODRÍGUEZ et al., 1995). As duas são compostas pelo antígeno Bm86, uma glicoproteína intestinal de *R. microplus*.

Todavia, a eficiência de ambas as vacinas é muito variável e bastante contestada, uma vez que apresentam efeito de curta duração (MASSARD et al., 1995; DE LA FUENTE et al., 1999) tornando indispensável doses reforço além do uso combinado com acaricidas, o que dificulta o uso e manejo das mesmas.

De qualquer maneira, a busca por novos antígenos capazes de gerar imunidade protetora nos hospedeiros e assim, controlar as infestações por carrapatos ixodídeos mais eficientemente tem sido investigada por diferentes grupos de pesquisa (ALMAZÁN et al., 2003, 2010; HAJDUSEK et al., 2010; IMAMURA et al., 2006; MARUYAMA, 2012; SCHUIJT et al., 2011).

1.2 A interface carrapato/hospedeiro

1.2.1 Resistência genética a carrapatos

Frente às infestações por carrapatos, as diferentes raças bovinas se comportam de maneira distinta. Os bovinos são hospedeiros naturais do carrapato *R. microplus* e, interessante, constituem o único modelo no qual é possível observar desfechos distintos de infestações por esse parasita numa mesma espécie hospedeira.

Entre os bovinos, existem raças resistentes (animais da subespécie *Bos taurus indicus*, zebuínos) e suscetíveis (animais da subespécie *B. t. taurus*, taurinos) a carrapatos. É importante ressaltar que o cruzamento entre esses dois grupos (raças taurinas e zebuínas) resulta em animais apresentando variados níveis de resistência, indicando assim, que tal característica possui também uma base hereditária e poligênica (BLANKENSHIP; MAY; HEDGECOCK, 2002).

A resistência a carrapatos em bovinos zebuínos e seus cruzamentos é relatada desde 1912 (SEIFERT, 1971). *Bos taurus taurus* e *B. t. indicus* são estreitamente relacionados dentro do gênero *Bos*, existindo evidências obtidas em estudos filogenéticos que essas subespécies divergiram uma da outra entre 17 e 20 milhões de anos atrás (HIENDLEDER; LEWALSKI; JANKE, 2008).

Os bovinos foram domesticados apenas há cerca de 5.000–10.000 anos atrás, a partir de *B. taurus* presentes no Oriente Médio, Europa e África, ou *B. indicus* na Ásia (BRADLEY et al., 1998; MACHUGH et al., 1997). Portanto, levando em consideração as observações descritas acima e o fato de que o carrapato *R. microplus* também é originado na Ásia (ESTRADA-PENÑA et al., 2006), o gado *B. indicus* foi domesticado em ambientes onde provavelmente o *R. microplus* era endêmico, exercendo assim, uma pressão seletiva para emergirem os mecanismos naturais do hospedeiro em resistir às infestações por esse carrapato e aos patógenos por ele transmitidos (JONSSON; PIPER; CONSTANTINOIU, 2014).

Raças bovinas suscetíveis e resistentes respondem de modo diferente aos mecanismos de parastismo do carrapato. Para facilitar o acesso e fluxo constante de sangue quanto para escapar dos diferentes mecanismos de defesa do hospedeiro, o carrapato utiliza uma complexa farmacopeia contida em sua saliva com efeitos anti-hemostáticos e anti-inflamatórios (RIBEIRO, 1995; CHAMPAGNE, 1996). RIBEIRO (1987; 1989) salienta que os carrapatos têm uma capacidade altamente estruturada para evadir ou mesmo suprimir os mecanismos responsáveis por manter a homeostase nas espécies hospedeiras de sua preferência.

Do ponto de vista do hospedeiro, fatores físicos presentes em bovinos, tais como o tamanho dos pelos e das camadas da pele, arrepiamento da pele e/ou a capacidade de autolimpeza, arquitetura das papilas da língua e cheiro, já são descritos por afetarem o comportamento e estabelecimento do carrapato logo no início da infestação (GASPARIN et al., 2007; SPICKETT et al., 1989; VERISSIMO et al., 2002; VERÍSSIMO et al., 2015).

Em bovinos da raça Nelore (resistentes a carrapatos), as papilas presentes na língua têm um menor espaçamento, propiciando desse modo a remoção mais efetiva das larvas de *R. microplus* da pele quando o animal faz a autolimpeza por meio de lambedura (VERÍSSIMO et al., 2015). De maneira semelhante, características inatas como camadas mais finas, menor comprimento e menor densidade de pelos, têm impacto direto na carga de carrapatos durante a infestação (GASPARIN et al., 2007; MARUFU et al., 2011; SPICKETT et al., 1989; VERISSIMO et al., 2002).

Dados acumulados na literatura sugerem ainda que as respostas anticarrapatos mais eficazes incluem o padrão de hipersensibilidade cutânea do tipo tardia (DTH) basofílica

(BECHARA; MORELLI JÚNIOR; SZABÓ, 2000; BROWN; ASKENASE, 1985), além de níveis de expressão de citocinas e quimiocinas alterados (PETERKOVÁ et al., 2008; WIKEL, 1999) e produção de anticorpos contra proteínas contidas na saliva (KASHINO et al., 2005; PIPER et al., 2010, 2016).

Conforme visto em análises de PCR quantitativo em tempo real, as quimiocinas IGF-1 e MCP-1 envolvidas no recrutamento de basófilos e a IP-10 envolvida em DTH, estão mais expressas na pele infestada de bovinos resistentes (raça Nelore). Além disso, as citocinas TNF- α e IFN- γ , de padrão pró-inflamatório, também possuem maiores níveis de expressão na pele infestada de bovinos resistentes em relação aos animais suscetíveis (ABATEPAULO, 2007).

Além disso, foi vista uma maior expressão de genes relacionados com matriz extracelular, reparo tecidual e metabolismo oxidativo na pele infestada de hospedeiros resistentes, mostrando a importância desses mecanismos fisiológicos no processo de resistência a carrapatos (FRANZIN et al., 2011).

CARVALHO e colaboradores (2008) demonstraram que os níveis séricos das proteínas de fase aguda e que promovem a inflamação, haptoglobulina e amiloide sérica A, estavam aumentados em animais resistentes (bovinos Nelore), ao passo que a α 1-glicoproteína ácida, proteína que modula a inflamação, estava presente em maior quantidade em bovinos da raça Holandesa, suscetíveis a carrapatos (CARVALHO et al., 2008).

Interessantemente, já foi visto que a transferência passiva de plasma de animais resistentes para hospedeiros nunca antes infestados por carrapatos, conferiu proteção e resistência ao desafio com infestações posteriores (ROBERTS; KERR, 1976; TRAGER, 1939a, 1939b). Foi também relatado que anticorpos são importantes na resistência a carrapato (GARCIA, 2017).

Entretanto, trabalhos publicados a respeito do papel da imunidade humoral do hospedeiro na resistência a carrapato vêm obtendo resultados conflitantes. BROSSARD, (1976) não encontrou correlação entre níveis de anticorpos e resistência contra *R. microplus*, o mesmo foi observado por diferentes estudos realizados por outro grupo de pesquisa (PIPER et al., 2008, 2009, 2010, 2016).

Em contraste, KASHINO e colaboradores (2005) reportaram diferentes padrões de resposta de anticorpo em animais suscetíveis e resistentes, em condições de elevada ou baixa infestação, mostrando que após infestações com cargas de carrapato elevadas os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2 diminuíram em bovinos HPB e permaneceram os mesmos em bovinos da raça Nelore.

Em suma, a interface carrapato-hospedeiro é amplamente complexa e envolve uma gama de mecanismos imunológicos como discutido por RIBEIRO (1989) e WIKEL, (1996).

1.2.2 Depuração de IgG feito pelo carrapato e proteínas ligantes de imunoglobulina-G (IGBPs)

Durante o repasto sanguíneo uma grande quantidade de imunoglobulinas é ingerida pelo carrapato (revisto em GUDDERRA et al., 2002) e pesquisas vêm mostrando a presença de anticorpos com atividade preservada na hemolinfa de diferentes espécies de carrapatos (JASINSKAS; JAWORSKI; BARBOUR, 2000; VAZ JÚNIOR et al., 1996). Essas moléculas, ainda biologicamente ativas, reconhecem tecidos do carrapato até 48 horas após o seu ingurgitamento completo (VAZ JUNIOR IDA et al., 1996; JASINSKAS, JAWORSKI e BARBOUR, 2000). Desse modo, anticorpos específicos podem se ligar a antígenos expressos na superfície de órgãos internos como a glândula salivar ou ovário do carrapato (ACKERMAN et al., 1981) e assim interferir com as funções fisiológicas normais desse parasita (BROWN; ASKENASE, 1986), ou mesmo neutralizar os componentes salivares que são inoculados na pele do hospedeiro durante o processo de alimentação de sangue (RIBEIRO, 1995; WIKEL, 1996).

Além disso, como é bem estabelecido, os anticorpos podem mediar reações inflamatórias promovendo a ativação do sistema complemento e o recrutamento de células efectoras e respostas imunes celulares como consequência da ativação de receptores de Fc por meio das porções Fcs de imunoglobulinas engajadas com seus antígenos cognatos (HOGARTH, 2002), fatores esses que são prejudiciais ao carrapato (WIKEL, 1996).

Trabalhos mostraram que as imunoglobulinas do hospedeiro atravessam a parede do intestino do carrapato, alcançando assim, a hemolinfa (ACKERMAN et al., 1981). BEM-YAKIR e colaboradores (1987) observaram, ainda, que durante o repasto sanguíneo a concentração de IgG na hemolinfa era crescente e CHINZEI e MINOURA (1987) relataram que a IgG presente na hemolinfa desaparece logo após o ingurgitamento do carrapato.

WANG e NUTTALL (1994) encontraram imunoglobulinas ativas também na saliva do carrapato e demonstraram que houve um aumento significativo da concentração de IgG ali no quarto ao sexto dia de repasto sanguíneo, mesmo período em que foi observada uma queda da concentração dessa molécula na hemolinfa. Sendo assim, tais evidências levaram a esse grupo de pesquisa sugerir que o carrapato possivelmente possui um mecanismo de depuração

da imunoglobulina do hospedeiro via saliva durante a sua alimentação, representando um mecanismo de proteção contra os efeitos potencialmente nocivos das IgGs do hospedeiro.

Essa hipótese foi fortemente reforçada pela descoberta de proteínas ligantes de imunoglobulina – G (IGBP – do inglês, *Imunoglobulin-G binding proteins*) compartilhadas, ou não, entre machos e fêmeas na hemolinfa e glândulas salivares de carrapatos fêmeas *Rhipicephalus appendiculatus* (WANG e NUTTALL, 1994) e machos *R. appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* e *Ixodes hexagonus* (WANG; NUTTALL, 1995b).

Baseado no conjunto dessas observações o grupo de pesquisa de WANG e NUTTALL sugeriu que quando as imunoglobulinas do hospedeiro são ingeridas, atravessam a parede do intestino do carrapato alcançando a hemolinfa, onde IGBPs ali presentes podem reconhecer e se ligar a elas. Essas IGBPs por sua vez, transportariam as IgGs do hospedeiro para a glândula salivar, local em que existem outras IGBPs, que por um mecanismo até então desconhecido, assim carregariam essas IgGs para a saliva onde seriam finalmente excretadas (WANG e NUTTALL, 1994,1995a).

Tanto carrapatos machos como fêmeas possuem IGBPs (NUTTALL, 1999) e quando investigada a produção de IGBP nos diferentes tecidos de carrapatos adultos, observou-se que a sua expressão foi significativamente maior em machos (WANG e NUTTALL, 1994 (WANG; NUTTALL, 1995a, 1994, 1995b; GONG et al., 2014).

Foram descobertas em carrapatos *R. appendiculatus* machos em repasto sanguíneo, três IGBPs abundantemente presentes na glândula salivar que eram antigenicamente distintas entre si e das IGBPs encontradas em fêmeas. Foram então classificadas em IGBP-MA de 29kDa, IGBP-MB de 25kDa e IGBP-MC de 21kDa (WANG e NUTTALL, 1995b).

A análise de sequências revelou que apenas a IGBP-MC possui peptídeo sinal, indicando ser essa uma proteína secretada (WANG e NUTTALL, 1995b). Surpreendentemente, quando machos e fêmeas adultos de *R. appendiculatus* foram alimentados em cobaias que tinham sido imunizadas com IGBP-MC, ou quando em machos alimentados foi inoculado anticorpos específicos para IGBP-MC, o desempenho alimentar das fêmeas foi afetado, não havendo porém, qualquer alteração em machos (WANG e NUTTALL, 1995b).

Com base nestes resultados, pode-se sugerir que a secreção de IGBP-MC por machos durante o período de alimentação das fêmeas parceiras, as auxilia em escapar dos danos causados pelos anticorpos do hospedeiro, o que facilita o seu ingurgitamento e assim maximiza a produção de ovos, suportando a opinião de que o macho adota um papel de "*mate guarding*" – guardião da fêmea (WANG et al., 1998).

Foram também identificados cinco tipos de IGBPs em *R. appendiculatus* machos não alimentados, variando entre 21 a 54kDa (WANG e NUTTALL, 1995b). Importante ressaltar que, com a existência de IGBPs em carrapatos não alimentados, podemos inferir que esse mecanismo de escape da resposta de IgG do hospedeiro pode funcionar tão logo o repasto sanguíneo se inicie (NUTTALL, 1999).

Estudos gerados pelo grupo de pesquisa do qual faço parte, demonstraram que *R. microplus* expressam IGBPs em suas glândulas salivares (CARVALHO et al., 2011) e que, diferentemente do observado por WANG e NUTTALL (1995b) com *R. appendiculatus*, todas as três IGBP classificadas em tipos A, B e C de *R. microplus*, apresentam peptídeo sinal e são potencialmente secretadas em sua na saliva (GARCIA, 2013).

Recentemente, IGBPs também foram identificadas em glândula salivar e hemolinfa do carrapato *Rhipicephalus haemaphysaloides* (GONG et al., 2014). Embora as IGBPs variem em diferentes espécies de carrapatos (pelo menos em tamanho), parece que o mecanismo de liberação/depuração de IgG do hospedeiro é comum e bem estabelecido entre carrapatos ixodídeos (NUTTALL, 1999).

Uma razão adicional para a eliminação de IgG via saliva, pode ser que o carrapato se beneficie ao excretar IgG de volta para o local da picada e sítio de alimentação, chamado de poço hemorrágico (WANG e NUTTALL, 1999).

BROWN e ASKENASE (1985) relataram que receptores de Fc de imunoglobulina em células do hospedeiro, tais como mastócitos e basófilos, são necessários e importantes para a rejeição de carrapatos *R. appendiculatus* pelo sistema imune de cobaias (WORMS; ASKENASE; BROWN, 1988). Desse modo, os carrapatos excretando IgG concentrada via saliva de volta para o poço hemorrágico, a relativa concentração de IgG no local da picada pode ficar elevada. Assim, as IgGs excretadas poderiam então competir por receptores de Fc e, conseqüentemente, retardar ou reduzir a resposta imune que leva à rejeição de carrapatos (WANG e NUTTALL, 1999).

Como os carrapatos, diversos patógenos também produzem proteínas ligantes de imunoglobulinas, as quais sabidamente se ligam de maneira não-imune/não cognato às imunoglobulinas pela região Fc (DE MIRANDA-SANTOS; CAMPOS-NETO, 1981; LANGONE, 1982; TORPIER; CAPRON; OUAISSI, 1979). Portanto, foi visto que IGBPs interferem na ligação específica de anticorpos com o patógeno, na ativação do sistema complemento e no processo de fagocitose (LANGONE, 1982; WIDDERS, 1990).

Todavia, o sítio de ligação das IGBPs de carrapatos argasidae (carrapatos de corpo mole) e ixodidae às IgGs do hospedeiro, bem como o fenômeno de captação de

imunoglobulina do intestino médio para a hemolinfa, ainda não é totalmente esclarecido. Assim, em 2005, JASINSKAS e BARBOUR investigaram o papel de fragmentos Fc e Fab de IgG no processo de captação de imunoglobulinas, por meio da alimentação de carrapatos fêmeas *Amblyomma americanum* com capilares contendo IgG intactas ou fragmentos Fc ou Fab marcados. Como resultado, foi visto que a captação de fragmentos Fc foi 4 vezes maior do que Fab na sexta hora da alimentação.

Além disso, os fragmentos Fc, mas não Fab, competiram com a incorporação de IgG intacta, sugerindo que o fragmento Fc de IgG é possivelmente o sítio de interação/ligação de moléculas do carrapato responsáveis por fazerem o transporte de IgG do intestino para a hemolinfa (JASINSKAS e BARBOUR, 2005) no caso, por exemplo, as IGBPs.

Em contrapartida, mais recentemente, pesquisadores identificaram que uma IGBP de *R. haemaphysaloides*, homóloga a IGBP-MB de machos de *R. appendiculatus*, apresentou ligação significativa a porção F(ab')₂ mas não ao fragmento Fc de IgG de coelho (GONG et al., 2014).

Assim sendo, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos de interação entre as IGBPs produzidas por carrapatos e as diferentes IgGs de seus hospedeiros.

1.2.3 Alótipos de IgG bovina e interação com as IGBPs de patógenos

Três subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3) são identificadas em bovinos (KACSKOVICS; BUTLER, 1996; KNIGHT; SUTER; BECKER, 1988; RABBANI et al., 1997).

Conforme citado por ABBAS e LICHTMAN (2005), novas variantes alotípicas surgem a partir de polimorfismos na sequência de nucleotídeos que geram, por sua vez, mudanças em aminoácidos nas cadeias pesadas ou leves da região constante da imunoglobulina.

Existem diferenças alélicas em todas as subclasses de IgG de bovinos. Até o momento já foram descritas quatro variantes alotípicas de IgG1, ou seja, IgG1a, IgG1b, IgG1c e IgG1d (SAINI et al., 2007; SYMONS; CLARKSON; BEALE, 1989), duas variantes alotípicas de IgG2, ou seja, IgG2a e IgG2b (KACSKOVICS e BUTLER, 1996) e dois alótipos, IgG3a e IgG3b, da subclasse de IgG3 (RABBANI et al., 1997).

Dos quatro alótipos IgG1 descritos em bovinos, os motivos únicos Pro-Ala- Ser-Ser no domínio constante da cadeia pesada - CH1 (posições 189-192 e 205-208) de IgG1c, parecem

conferir uma nova função de adesão e migração celular, importante na proteção das superfícies de mucosas (SAINI et al., 2007).

Ao longo dos anos pesquisas demonstraram que a IgG2 bovina é importante na proteção contra as infecções piogênicas (NANSEN, 1972), sendo também o subtipo mais protetor contra a mastite causada por *Staphylococcus spp* e infecção por *Haemophilus somnus* (CORBEIL et al., 1997; WATSON, 1981). E em relação aos alótipos de IgG2, diferenças funcionais parecem estar associadas aos diversos desfechos da imunidade específica diante de um processo infeccioso (BASTIDA-CORCUERA et al., 1999).

O papel da IgG2 bovina na resistência às infecções bacterianas extracelulares deve-se provavelmente ao fato de ser uma opsonina melhor que a IgG1 e também por ativar a via clássica do complemento (MCGUIRE; MUSOKE; KURTTI, 1979). Em bovinos, o alótipo IgG2b apresenta uma ativação do sistema complemento cerca de duas vezes maior que a observada com IgG2a, resultado parcialmente explicado por também possuir uma dobradiça mais rígida e fechada (BASTIDA-CORCUERA et al., 1999). Em humanos, características de menor flexibilidade da dobradiça de IgG foram previamente associadas ao aumento da eficiência na ativação do complemento (STEVENSON et al., 1997; TAN et al., 1990).

Como os demais mamíferos, os bovinos possuem distribuições sorológicas peculiares de alótipos de IgG2 (KACSKOVICS et al., 1995). Curiosamente, BLAKESLEE, BUTLER e STONE, (1971) descreveram que cerca de 80% dos bovinos da raça holandesa tinham o alótipo IgG2a e que a presença de IgG2b era rara nesses animais.

Mais recentemente e corroborando a distribuição alotípica observada no trabalho relatado acima, nosso grupo de pesquisa mostrou que o alótipo IgG2a foi significativamente mais frequente em bovinos da raça holandesa (suscetíveis a carrapatos), ao passo que o alótipo IgG2b foi o mais frequente em bovinos Nelore (raça resistente a carrapato) (CARVALHO et al., 2011).

Importante ressaltar que esses dois alótipos (IgG2a e IgG2b) possuem sequências distintas de aminoácidos na região Fc, mais precisamente na região da dobradiça em CH1 e também em CH2, e CH3, dados esses descritos por KACSKOVICS e BUTLER (1996). Posteriormente, esses dados foram posteriormente confirmados e modelados de maneira muito elegante por CARVALHO e colaboradores (2011).

Diversos trabalhos mostraram que de acordo com o alótipo de IgG existe associação com resistência a diferentes micróbios (CORBEIL et al., 1997; GIHA et al., 2009; KACSKOVICS et al., 1995; PANDEY et al., 2008).

Em humanos, alótipos de GM/KM, isto é, pequenas mudanças em aminoácidos nas cadeias leve ou pesada, respectivamente, da região constante da IgG, têm sido associados com uma maior ou menor suscetibilidade a diversas doenças (WHITTINGHAM; PROPERT, 1986). Um estudo feito em 2009, demonstrou que alótipos GM estavam envolvidos na suscetibilidade à forma clínica menos complicada da malária (GIHA et al., 2009). Pesquisas com infecção por *Haemophilus influenzae* mostraram que o alótipo G2m(n+) estava associado a respostas de anticorpo em humanos e consequente processo de resistência (AMBROSINO et al., 1985; GODDARD; BEATTY; HOFFMAN, 1996).

Ao mesmo tempo, a ligação das IGBPs é variável entre as subclasses de IgG. A proteína G (PrG) de cepas de *Streptococcus* liga fortemente e com igual afinidade em IgG1 e IgG2 bovina (LANGONE, 1982), a proteína A (PrA) de *Staphylococcus aureus* interage principalmente com a IgG2 (GOUDSWAARD et al., 1978) e IGBPs de alta massa molecular (HMW IGBPs) de bactérias *H. somnus* ligam-se apenas a IgG2 bovina (YARNALL; WIDDERS; CORBEIL, 1988).

Adicionalmente, os efeitos biológicos das diferenças de interação entre IGBPs de patógenos e variantes alotípicas do hospedeiro, já foram descritos por exemplo, quanto ao desfecho clínico de bovinos que possuem alótipos de IgG2b ou IgG2a na infecção por *H. somnus* (BATISTA-CORCUERA et al., 1999).

Os alótipos de IgG2 bovina são associados a cargas diferentes de carrapatos e possuem sequências distintas de aminoácidos na região Fc (KACSKOVICS e BUTLER, 1996; CARVALHO et al., 2011). A porção Fc da IgG é o sítio de ligação de IGBPs de diversos patógenos (DE MIRANDA-SANTOS e CAMPOS-NETO, 1981; LANGONE, 1982) e cruzamentos entre bovinos taurinos e zebuínos geram animais com níveis variados de resistência a carrapato (BLANKENSHIP; MAY; HEDGECOCK, 2002) uma característica hereditária e poligênica. Em vista disso é, portanto, razoável propor que alótipos herdáveis de imunoglobulinas participam da manifestação do fenótipo de cargas de carrapatos.

Nesse contexto, por ser a ligação de IGBPs às IgGs considerada uma estratégia de suma importância para o carrapato evadir os danos causados pelos anticorpos do hospedeiro, a diferença de interação das IGBPs de *R. microplus* e os alótipos de IgG bovina mais frequentes em raças suscetíveis e resistentes a carrapatos, pode então colaborar de forma potencial com a suscetibilidade ou resistência de bovinos a esse ectoparasita.

Sendo assim, torna-se de substancial relevância um estudo mais direcionado a fim de investigar tais interações e esclarecer os mecanismos de ação das IGPBs do carrapato do boi.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a associação de alótipos de IgG1 e IgG2 bovina com raças geneticamente resistentes e suscetíveis a carrapatos e suas interações com a proteína ligante de IgG (IGBP-C) da saliva do carrapato do boi, *Rhipicephalus microplus*

2.2 Objetivos específicos

Genotipar a região da dobradiça de IgG pelo método de Genotipagem por Sequenciamento (GBS) e identificar os animais homozigotos para os alótipos de IgG1 e IgG2 mais frequentes em raças bovinas suscetível ou resistente a carrapato

- Obter DNA de 40 bovinos da raça Nelore (resistentes a carrapato) e de 40 bovinos da raça Holandesa – HPB (suscetíveis a carrapatos), puros de origem;
- Amplificar por PCR a região de dobradiça, CH1, CH2 e CH3 de IgG1 e IgG2, a fim de sequenciar os *amplicons* para obtenção de genótipos;

Verificar a associação dos fenótipos de infestação a carrapatos com os alótipos de IgG1 e IgG2 bovina

- Obter os fenótipos de infestação dos animais HPB (mais suscetíveis a carrapatos) mediante escores gerados pela comparação com foto modelo de vacas com diferentes graus de infestação; análise da foto de cada animal abrangendo o períneo, virilha e inserção do úbere e contagem de carrapatos presentes no momento da coleta. Como os bovinos Nelore são resistentes a carrapatos e a variação da carga parasitária dentro dessa raça é baixa, não será avaliada o fenótipo de infestação nesses animais;

Verificar a afinidade de ligação dos diferentes alótipos de IgG bovina pela IGBP-C da saliva do carrapato *R. microplus* por meio do sistema de Ressonância Plasmônica de Superfície (Biacore)

- Clonar, expressar e purificar a proteína recombinante IGBP-C de *R. microplus* a partir da sequência do gene obtida em estudo do transcriptoma de glândulas salivares de carrapatos machos;
- Obter soros (20 mL) de bovinos da raça Nelore e da raça HPB, puros de origem, previamente alotipados para IgGs e homozigotos para os alótipos mais frequentes;
- Purificar IgGs bovinas anti-DNP em coluna de afinidade DNP-Sepharose de bois com os alótipos mais frequentes em Nelore e em HPB. Já é descrito que bovinos possuem anticorpos anti-DNP naturalmente (MUKKUR; FROESE, 1971; TEWARI; MUKKUR, 1975).
- Purificar em colunas de afinidade anti-IgG1 e anti-IgG2 bovina-Sepharose as IgG1 e IgG2 anti-DNP;
- Verificar se alótipos de IgG1 e de IgG2 bovina apresentam diferentes afinidades para a IGBP-C por meio do Sistema de Ressonância Plasmônica de Superfície (Biacore);

Investigar por meio de ensaio em Biacore em que região da IgG que a IGBP-C de *R. microplus* se liga

Confirmar a presença da IGBP-C nativa em extrato de glândula salivar de carrapatos *R. microplus* machos

Fazer a modelagem por homologia da estrutura protéica da IGBP-C de *R. microplus*

Investigar possíveis funções da IGBP-C de *R. microplus* que não a ligação em IgG bovina.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos que utilizaram kits comerciais seguiram as recomendações dos fabricantes e quando presentes, as modificações foram descritas. Os animais utilizados foram manuseados seguindo normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (Protocolo nº 095/2012). O delineamento experimental desse trabalho está ilustrado na **Figura 2**, página 60.

3.1 Animais

Foram utilizados 40 bovinos da raça Nelore (zebuínos - *Bos taurus indicus*) e 40 bovinos da raça Holandesa – HPB (taurinos – *Bos taurus taurus*) puros de origem e fêmeas, provenientes dos rebanhos de corte e leite da Fazenda Experimental da FZEA-USP, Pirassununga-SP. A escolha por essas duas raças se deve aos fenótipos de infestação por carrapato contrastantes entre bovinos Nelore (animais resistentes) e HPB (animais suscetíveis).

3.2 Coleta das amostras

A coleta do sangue foi realizada por punção da veia jugular ou mamária, de forma asséptica em tubo de vácuo (vacutainer - BD). O sangue coletado foi armazenado em tubos secos para obtenção de soro e em tubos com anticoagulante para posterior extração de DNA por meio do Kit QIAamp DNA blood (Qiagen). Os tubos sem anticoagulante foram então centrifugados 3220g por 15 minutos para obtenção do soro, e armazenados em freezer a -20°C até a purificação em coluna de afinidade DNP-Sepharose, de IgG1 anti-DNP e IgG2 anti-DNP (processo descrito nos tópicos 3.5.3 e 3.5.4 dessa seção) dos bois homozigotos para os alótipos mais frequentes nas raças Nelore e HPB.

3.3 Obtenção dos fenótipos de infestação de bovinos HPB por carrapatos *R. microplus*

Bovinos *Bos t. indicus* como é o caso da raça Nelore, são geneticamente resistentes a carrapatos (SEIFERT, 1971), sendo assim, apenas os fenótipos de infestação de bovinos HPB (animais suscetíveis a carrapatos) foram estabelecidos. A obtenção dos fenótipos de

infestação foi feita a partir da média aritmética dos valores de 3 análises realizadas conforme descrito abaixo.

Inicialmente, foi utilizado um sistema de pontuação por meio da inspeção visual e comparação dos animais HPB, com foto modelo da região do períneo, virilha e de inserção do úbere de vacas classificadas com escores de infestação entre 0-4 (**Figura Suplementar 1**). O escore 0 correspondia a uma vaca sem carrapatos, ao passo que os escores de 1-4, caracterizavam níveis crescentes da presença de ninfas e / ou teleóginas recobrando essa região.

O primeiro escore foi obtido pelo questionamento com base no sistema de foto modelo, aos funcionários do setor de Gado de Leite da Fazenda Experimental da FZEA-USP, campus Pirassununga-SP, os quais classificaram as vacas de acordo com a experiência e convívio diário que tinham com cada uma.

Em uma segunda análise, ainda utilizando esse sistema, uma vez que sou Médica Veterinária, foi gerado um segundo escore de infestação pela observação e classificação *in situ* de cada animal no momento em que fui realizar a coleta de sangue e soro.

Posteriormente, o terceiro escore, também com variação entre 0-4, foi obtido a partir da análise de fotos tiradas no momento da coleta abrangendo a região do quarto posterior e de inserção do úbere de cada vaca. Essa análise serviu de referência cruzada da pontuação dada pelos funcionários do Setor de Gado de Leite e por mim, *in situ*, além ainda de permitir uma verificação mais minuciosa da presença das “cicatrices” - sinais de infestações anteriores.

Por fim, a partir dos três escores resultantes das análises de fenotipagem descritas acima, obteve-se a média aritmética desses valores gerando então o escore final apresentado por cada vaca. Apenas como um dado complementar, foi também realizada a contagem de carrapatos coletados por meio de raspagem da porção ventral do membro posterior direito de cada vaca. Considerou-se os resultados dessa última análise como um dado complementar uma vez que devido ao alto índice de infestação de algumas vacas, funcionários do Setor de Gado de Leite tiveram que fazer o tratamento com carrapaticidas individualmente. Dessa forma, durante a coleta dos carrapatos era possível encontrar nenhum carrapato em animais classificados com o escore máximo de infestação e carrapatos naqueles animais classificados com o escore 1 por exemplo, contagem que poderia interferir nos valores das médias finais obtidas.

Todas as classificações para se obter os fenótipos de infestação foram feitas com base em observações do quarto posterior dos bovinos, abrangendo inserção do úbere, períneo, virilha e patas traseiras. A escolha por essas regiões foi devido a alguns trabalhos demonstrarem que os carrapatos têm preferência por determinadas regiões do corpo de

bovinos, com destaque as analisadas nesse estudo (BRUM et al., 1987; OLIVEIRA e ALENCAR, 1990).

3.4 Identificação dos animais homozigotos para os alótipos de IgG1 e 2 mais frequentes em cada raça

3.4.1 Amplificação dos genes que codificam para a região constante das cadeias pesadas de IgG1 e IgG2

Das amostras de sangue coletadas (Nelore=40 e HPB=40) fez-se a extração do DNA genômico por meio do Kit QIAamp DNA blood (Qiagen). Em seguida, foi realizada a amplificação dos fragmentos de interesse por reação de PCR utilizando iniciadores específicos para as sequências alvo.

Os iniciadores para IgG1 foram desenhados para amplificar os genes que codificam os domínios constantes da cadeia pesada, CH1 a CH3, incluindo a dobradiça (região constante da cadeia pesada, cuja variabilidade genética pode resultar em diferentes alótipos), sendo o iniciador *sense* (*Forward primer*): 5'CGGGGTGCTGTGAACCA3' e iniciador *anti-sense* (*Reverse primer*): 5'AAGACAGAGGGTCCTCCGG3'. Já os iniciadores utilizados para IgG2 (abrangendo a mesma região de amplificação), foram os descritos no estudo de CARVALHO e colaboradores (2011), com iniciador *sense* (*Forward primer*): 5'CGGGGTGCTGTGAACCA3' e iniciador *anti-sense* (*Reverse primer*): 5'GTTCCCTCACGCCTAATGG3'. Ambos os pares de iniciadores foram sintetizados por Sigma Aldrich.

Em cada reação, com volume final de 25uL, foram adicionados 0,13uL da enzima Go Taq DNA Polymerase (Promega), 0,5uL de iniciadores (*Forward e Reverse primers*) na concentração de 10uM e 5uL da amostra de DNA na concentração de 10ng/uL. O ciclo para a amplificação foi: 1) 94°C 3 minutos, 2) 94°C 1 minuto, 3) 58°C 1 minuto, 4) 72°C 1 minuto, 5) 33x os passos 2-4, 6) 72°C 2 minutos e 7) 4°C por tempo indeterminado, utilizando o termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research).

Após a amplificação, os produtos obtidos por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio a 0,5µg/ml. O tampão para o preparo das amostras foi composto de glicerol 30% e azul de bromofenol 0,05%, em seguida adicionado um volume de 3uL amostra/poço, utilizando o marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) para confirmação do tamanho dos produtos amplificados. A eletroforese foi realizada em uma cuba horizontal com tampão tris-acetato-EDTA com

aplicação de aproximadamente 120 Volts. Em seguida, os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em câmara digital Kodak DC290 Zoom.

Para a purificação das amostras, o volume total da reação de PCR foi transferido para placas de 96 poços MultiScreen PCR (Millipore), as quais foram submetidas a vácuo pelo equipamento MultiScreen Resist Vacuum Manifold (Millipore). A dosagem do DNA em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) foi feita antes e após o processo purificação.

3.4.2 Genotipagem por Sequenciamento (GBS)

Para a identificação de quais animais dentre os bovinos Nelore e HPB utilizados nesse estudo eram homozigotos para os principais alótipos de IgG1 e 2 em cada raça, foi feita a técnica de Genotipagem por Sequenciamento - GBS (ELSHIRE et al., 2011).

Essa técnica usada para descobrir polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em estudos de genotipagem, possibilitou a identificação de SNPs que geraram diferentes haplótipos codificantes para a região constante da cadeia pesada de IgG1 e 2 bovina, resultando assim, em diferentes alótipos (pequenas modificações na sequência de aminoácidos presentes em CH1-CH3).

Os *amplicons* gerados pela PCR foram tratados com ExoSAP-IT (Amersham, Piscataway, NJ) e sequenciados posteriormente com BigDye terminator chemistry (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), por meio de sequenciamento Sanger de *amplicons* da região de interesse (CH1-CH3). As sequências de DNA foram analisadas por meio dos programas Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998) e PolyPhred (NICKERSON; TOBE; TAYLOR, 1997), utilizando como sequências referência para IgG1 (X16701.1) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/x16701> e IgG2 (X16702.1) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/x16702>, contidas no banco de dados do GenBank.

A análise estatística para obtenção dos haplótipos de IgG1 e IgG2 bovina, foi realizada de acordo com CARVALHO e colaboradores (2011). Em resumo, a frequência e a significância das diferenças de distribuição dos SNPs em cada raça bovina foram estimadas por meio da ferramenta Microsatellite Toolkit (PARK, 2001) e as frequências de haplótipos nos fragmentos de exons de IgG1 e IgG2 foram calculadas com a ferramenta Arlequin, algoritmo ELB, de acordo com EXCOFFIER, LAVAL e SCHNEIDER (2005). Posteriormente, a significância das diferenças de distribuição dos haplótipos estudados entre as raças analisadas, foi aferida por meio do programa RXC (MILLER, 1997).

Para essa etapa contamos com a colaboração do Dr. Alexandre Rodrigues Caetano, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

Por fim, após a genotipagem, a diferença entre a distribuição dos haplótipos que codificam a cadeia pesada da IgG1 e 2 em bovinos HPB e Nelore, bem como a associação entre o genótipo encontrado e o fenótipo de infestação por carrapato, foram calculadas por meio do teste Exato de Fisher e geração dos gráficos pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, EUA). Diferenças com valor de $P < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

3.5 Purificação dos alótipos de IgG1 e IgG2 de bovinos

3.5.1 Precipitação com solução saturada de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e ultradiafiltração de gamaglobulinas

Após a realização da genotipagem e, portanto, identificação dos animais homozigotos para os alótipos mais frequentes em bovinos da raça Nelore e HPB, foi feita a purificação parcial dos anticorpos presentes no soro desses animais por meio de precipitação da fração de gamaglobulinas com solução saturada de sulfato de amônio.

Para o processo de precipitação, um volume aproximado de 20 mL de soro de cada animal, resfriado a 4°C e sob agitação lenta e constante, foi acrescido de igual volume de tampão PBS com azida de sódio (0,001% concentração final). Em seguida, foi adicionada a solução de sulfato de amônio saturada a 70% gota a gota com o auxílio de uma bureta, precipitando desse modo as gamaglobulinas com 35% de saturação final.

A suspensão foi homogeneizada *overnight* (14 horas), sob agitação lenta em câmara fria e posteriormente feita a centrifugação do homogenato a 5.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. O precipitado foi recuperado e ressuspensionado em PBS com azida de sódio ao volume original do soro mais PBS (40 mL). Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes.

Na última repetição, o precipitado obtido foi ressuspensionado em 20 mL de PBS com azida de sódio e ultradiafiltrado em membrana 30 kDa, 63,5 mm (Millipore) acoplada em sistema amicon de filtração. Essa etapa foi realizada em câmara fria sob agitação lenta contra o mesmo tampão, para retenção da proteína e liberação do agente por gradiente osmótico.

Como controle do processo de diálise, foi utilizada a prova de cloreto de bário. Brevemente, essa prova caracteriza-se pela retirada de uma alíquota da amostra dialisada adicionada de algumas gotas de cloreto de bário onde caso ocorra turvação, significa que há

sulfato de amônio ainda presente na amostra formando assim, o sulfato de bário. Faz-se portanto necessário, a troca do tampão de diálise até a mistura ficar totalmente limpa.

3.5.2 Construção das colunas de afinidade DNP-Sepharose e anti-IgG1 e anti-IgG2 bovina-Sepharose

Foram construídas 2 colunas DNP-Sepharose, cada uma utilizando 5 mg de soro albumina bovina (BSA) 2,4-Dinitrofenolada (DNP-BSA) (Molecular Probes) conjugada a 0,6 g de *beads* de Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (GE Healthcare).

Para as colunas anti-IgG1 e anti-IgG2 bovina Sepharose, conjugou-se 3 mg de anticorpos purificados por afinidade anti-IgG1 ou anti-IgG2 bovina (adquiridos da Bethyl) a 0,4 g de *beads* de Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (GE Healthcare).

Posteriormente, o gel obtido para os três tipos de colunas foi empacotado separadamente em colunas PD-10 (GE Healthcare). As colunas foram estocadas a 4°C com tampão PBS e azida de sódio até a etapa de purificação dos alótipos de IgG1 e IgG2 bovina.

3.5.3 Purificação de IgG bovina anti-DNP

Após a precipitação de gamaglobulinas por sulfato de amônio saturado a 35% dos animais homozigotos para os alótipos mais frequentes de IgG1 e IgG2 em Nelore e HPB, foi feita a purificação de IgGs anti-DNP em coluna DNP-Sepharose. Segundo MUKKUR e FROESE (1971) e TEWARI e MUKKUR, (1975), bovinos possuem anticorpos anti-DNP naturalmente.

Uma vez que o presente estudo envolve a investigação das interações não cognatas, ou seja, não por ligação antígeno e anticorpo, mas provavelmente da IGBP-C do carrapato *R. microplus* pela porção Fc dos alótipos de IgG1 e IgG2 bovina, por esse motivo e como estratégia de purificação dos alótipos, utilizamos uma coluna DNP-Sepharose.

Desse modo havendo ligação (*binding*) nos ensaios de interação entre os alótipos de IgG (anti-DNP) do boi e IGBP-C do carrapato, pode-se inferir que a proteína do carrapato se ligou a IgG do boi e não o contrário.

Para o processo de purificação, inicialmente as colunas foram lavadas com 10 volumes de PBS acrescido de azida e em seguida, foi adicionada a amostra provinda da precipitação com sulfato de amônio, já dialisada. Incubou-se o conteúdo das amostras por cerca de 10 minutos e posteriormente, foi feita lavagem para retirada das moléculas não ligadas na coluna

com cerca de 25 mL de PBS acrescido de azida. Por fim, as amostras foram eluídas com glicina 0,1 M pH 2,5, onde imediatamente nas frações eluídas foi adicionado Tris-HCl 1M pH 9,0 para normalização do pH por volta de 7,5-8,0. Posteriormente, o eluato foi dialisado contra PBS para a passagem na próxima coluna de purificação (colunas anti-IgG1 ou anti-IgG2 bovina Sepharose). Frações de todas as etapas do processo de purificação foram monitoradas por espectrometria a 280 nm.

3.5.4 Purificação de IgG1 e IgG2 bovina anti-DNP

Para a obtenção de IgG1 e IgG2 anti-DNP dos animais previamente alotipados, as IgGs anti-DNP oriundas da purificação em colunas DNP-Sepharose, foram submetidas em seguida a purificação em colunas anti-IgG1 ou anti-IgG2-Sepharose, para a separação em subclasses IgG1 ou IgG2 totais.

O protocolo de purificação utilizado foi o mesmo descrito para a purificação em coluna DNP-Sepharose (subtópico 3.5.3) e as frações contendo anticorpos IgG1 ou IgG2 anti-DNP foram monitoradas por meio de espectrometria a 280 nm.

Posteriormente, as subclasses dos anticorpos purificados para DNP foram confirmadas por meio de *western blot* (conforme descrito na página 42) com IgGs de ovelha conjugadas com peroxidase (HRP) anti-IgG1 e anti-IgG2 bovina (Bethyl).

3.6 Produção da proteína recombinante IGBP-C de *R. microplus*

Estudos gerados pelo grupo de pesquisa do qual faço parte, demonstraram que *R. microplus* expressam IGBPs em suas glândulas salivares (CARVALHO et al., 2011) e que diferentemente do observado por WANG e NUTTALL (1995b) com *R. appendiculatus*, todas as três IGBP classificadas em tipos A, B e C de *R. microplus*, apresentam peptídeo sinal e são potencialmente secretadas em sua na saliva (GARCIA, 2013).

Dentre as diversas sequências de IGBPs encontradas em carrapatos machos e fêmeas, optamos por escolher a IGBP do tipo C de *R. microplus* machos como candidata aos ensaios de interações com os diferentes alótipos de IgG1 e 2 bovina.

Tal escolha justifica-se pelo fato da IGBP-MC do carrapato *R. appendiculatus*, (número de acesso no GenBank: AAB68803.1), que possui 85% de identidade com ela, já ser descrita por exercer um importante mecanismo de auxílio ao repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas e de evasão do sistema imune do hospedeiro (WANG e NUTTALL, 1995b).

Cabe ressaltar que a proteína aqui produzida foi utilizada para as imunizações de galinhas poedeiras para produção de IgY anti IGBP-C (anticorpo posteriormente utilizado para confirmação da proteína nativa em extrato de glândula salivar de carrapatos machos *R. microplus*) e também, para o ensaio de interação entre IGBP-C e subclasses IgG1e IgG2 bovina, por ELISA.

Para os demais experimentos, foi utilizada IGBP-C recombinante sintetizada por empresas especializadas. No caso dos experimentos feitos em Biacore, foi em virtude da pureza requerida, já que a proteína expressa por nós possuía alguns poucos contaminantes que poderiam interferir nesse tipo de ensaio. A proteína utilizada, produzida em célula de mamífero, veio de alíquotas que estavam estocadas em nosso laboratório provindas de um projeto executado anteriormente com imunizações em bovinos.

Já para os ensaios de investigação de outras funções exercidas pela IGBP-C, foi utilizada proteína sintetizada por empresa especializada decorrente da possível demanda caso as alíquotas estoque utilizadas em Biacore não fossem suficientes para esses ensaios. Proteína produzida em *Pichia pastoris*.

É imprescindível destacar que, a sequência utilizada para a clonagem da IGBP-C nos diferentes sistemas de expressão, foi a mesma. Sendo a IGBP-C produzida em *Escherichia coli* e célula de mamífero, posteriormente adicionadas de cauda de histina (6 resíduos de histidina na porção N-terminal) e a sintetizada em *Pichia pastoris*, não.

3.6.1 Escolha e extração da sequência IGBP-C de *R. microplus* contida em fago

A sequência completa do gene de interesse, codificante para a proteína IGBP-C produzida em glândulas salivares de carrapatos machos da espécie *R. microplus*, está disponível no transcriptoma gerado pelo nosso laboratório, em biblioteca de clones obtida a partir da construção de bibliotecas de cDNA (MARUYAMA, 2008).

Alíquotas de dois fagos-clone contendo a sequência da IGBP-C foram utilizadas como moldes para amplificação por PCR da sequência correspondente ao respectivo *contig*.

A reação de PCR para amplificação do inserto utilizou 0,25 uL de enzima Go Taq DNA Polimerase (Promega), 5 uL de tampão de PCR 10X, 1 uL de mix de dNTPs, 1,5 uL de MgCl₂ 50 mM, 1,25 uL de iniciador *sense* e *antisense* (PT2F1 e PT2R1 – específicos para região do vetor fago TriplEx), 3 uL da amostra (fago-clone) e água deionizada suficiente para completar uma reação de 50 uL. O ciclo utilizado para amplificação foi: 1) 75°C 1 minuto; 2)

94°C 4 minutos; 3) 94°C 1 minuto; 4) 49°C 1 minuto, 5) 72°C 1 minuto, 6) 32x os passos 3-5; 7) 72°C 7 minutos e 8) 4°C por tempo indeterminado.

Os produtos de PCR dos clones selecionados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio a 0,5 µg/ml. O tampão para o preparo da amostra foi composto de glicerol 30% e azul de bromofenol 0,05%, e aplicado um volume de 3 uL da reação/poço, utilizando marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) para confirmação do tamanho dos produtos gerados.

A eletroforese foi realizada em uma cuba horizontal com tampão tris-acetato-EDTA com aplicação de aproximadamente 120 Volts, e ao término, o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado em câmara digital Kodak DC290 Zoom. Em seguida, os *amplicons* foram purificados utilizando Pure Link Purification Kit (Invitrogen) e estocados a -20°C.

Posteriormente, uma alíquota de 10 ng/uL desses *amplicons* purificados foi submetida a PCR utilizando iniciadores específicos para a amplificação da IGBP-C (sintetizados por Sigma Aldrich). A reação de PCR para amplificação do inserto utilizou 0,25 uL de enzima Go Taq DNA Polimerase (Promega), 5 uL de tampão de PCR 10X, 1 uL de mix de dNTPs, 1,5 uL de MgCl₂ 50 mM, 1,25 uL de iniciador direto e inverso (*Forward primer*): 5'CACCACCGTACAATACCACCAGCTG3' e (*Reverse primer*): 5'CTAATCCCAAATGTCCGTTGTC3', 3 uL da amostra e água deionizada suficiente para completar uma reação de 50 uL. O ciclo utilizado para amplificação foi: 1) 94°C 3 minutos; 2) 94°C 45 segundos; 3) 58°C 30 segundos, 4) 72°C 40 segundos, 5) 31x os passos 2-4; 6) 72°C 10 minutos e 7) 4°C por tempo indeterminado. Após a verificação dos insertos amplificados por gel de agarose 1%, todo o restante do produto da reação foi aplicado em gel de agarose *Low Melting* 1,5% (Sigma Aldrich). A banda visualizada foi cortada do gel de agarose para purificação utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Em seguida, a amostra foi eluída em 50 uL de tampão de eluição fornecido pelo kit e o produto de PCR purificado foi estocado a -20°C.

3.6.2 Reação de Clonagem

O produto de PCR purificado foi usado na reação de clonagem realizada com o kit Champion pET Directional TOPO Expression (Invitrogen). Assim sendo, utilizou-se o vetor pET100/D-TOPO que apresenta gene de resistência à ampicilina como marcador de seleção e

produz uma proteína recombinante em fusão com uma cauda de histidina na porção N-terminal.

A estratégia do kit utilizado consiste em clonar um produto de PCR direcionalmente em um dos vetores de expressão pET utilizando a tecnologia TOPO, sem a necessidade de enzimas de restrição. Os insertos clonados nesses vetores estão sob controle do promotor T7 que conta a alta atividade e especificidade da T7 RNA polimerase de bacteriófago para a expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*.

Seguida a reação de clonagem, foi feita a seleção dos clones positivos por meio de PCR de colônias (análise rápida de fragmentos de DNA clonados em plasmídeos) e minipreparação plasmideal com posterior sequenciamento utilizando iniciadores (*T7 Forward primer* e *Reverse primer*) do vetor do Kit de modo a confirmar a presença do fragmento de inserção no local e na orientação corretos.

Para a reação de PCR de colônia, após a clonagem, bactérias *E. coli* One Shot TOP-10 (Invitrogen) foram transformadas com os plasmídeos e volumes de 100 e 200 µL da cultura de bactérias transformadas foram espalhados em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo (LB agar 15%, e ampicilina). As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C e com o auxílio de palitos de dente estéreis, as colônias foram selecionadas (foi coletada uma pequena quantidade de cada colônia).

A fim se de verificar uma grande quantidade de colônias, pools foram adicionados em microtubos acrescidos de 10 uL de água ultrapura estéril, vortexados e aquecidos por 5 minutos a 94°C. Em seguida, foram centrifugados a 13.000 rpm, por 5 minutos a T°C ambiente e 5 uL do sobrenadante foi utilizado como amostra para a reação de PCR contendo os iniciadores do vetor (*Forward primer* e *Reverse primer* T7) e enzima Go Taq DNA polimerase (Promega).

O ciclo utilizado para amplificação foi: 1) 94°C 3 minutos; 2) 94°C 45 segundos; 3) 58°C 30 segundos; 4) 72°C 1 minuto, 5) 31x os passos 2-4; 6) 72°C 10 minutos; 7) 10 °C por tempo indeterminado. Os produtos gerados pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio a 0,5 µg/ml, para confirmação do tamanho dos produtos de PCR.

Após a PCR de colônia, cada colônia selecionada e positiva de acordo com o tamanho esperado para o *amplicon* visualizado em gel de agarose (vetor + inserto), foi cultivada em meio LB líquido adicionado de ampicilina e posteriormente, submetida a reações de minipreparações plasmideais realizadas com Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

Por fim, as amostras (plasmídeos purificados) foram enviadas juntamente com os iniciadores do vetor, para a reação de sequenciamento realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano USP-SP, para a confirmação da presença do fragmento de inserção no local e na orientação corretos.

3.6.3 Expressão piloto e em grande escala

Devido à ausência de possíveis sítios de N ou O-glicosilação por meio da análise da sequência feita em ferramentas NetOGlyc e NetNGlyc do portal Expasy, respectivamente, optou-se pela produção da proteína recombinante IGBP-C em sistema de expressão procarioto.

O gene de interesse clonado no vetor pET100/D-TOPO após as minipreparações plasmídeais foi transformado em bactérias *E. coli* da cepa Rosetta (Novagen) quimicamente competentes, para se fazer uma expressão piloto da IGBP-C recombinante. Diferentes concentrações do indutor de transcrição gênica IPTG foram testadas, assim como diferentes tempos de indução. O IPTG é um análogo sintético não hidrolizável da lactose que ao se ligar ao repressor *lac* deixa de reprimir a expressão da T7 RNA polimerase, que uma vez transcrita, leva a transcrição do gene clonado que está sob controle do promotor T7 (STUDIER et al., 1990).

Após a expressão piloto, feita em pequena escala, foi dado prosseguimento a expressão em maior escala por meio da cultura de bactérias *E.coli* cepa Rosetta (Novagen) transformadas agora em lotes de 2,5 L em meio LB líquido com antibiótico ampicilina na concentração final de 100 ug/mL. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida por 4 horas com IPTG a 0,25 mM. Posteriormente, as bactérias foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 15 minutos e congeladas a -20°C até a lise bacteriana para recuperação das proteínas recombinantes expressas.

A lise foi realizada primeiramente em tampão de lise (0,5 M NaCl, 20 mM tampão fosfato e 20 mM imidazol) adicionado de coquetel inibidor de protease (Roche) pH7,4 e as bactérias sonicadas com ciclo de 3 pulsos de 40 segundos a 60 Hz. Os lisados bacterianos foram centrifugados a 16.000 rpm por 25 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado insolúvel ressuscitado em tampão desnaturante (0,5 M NaCl, 20 mM tampão fosfato, 20 mM imidazol e 8 M uréia pH7,4). Sendo em seguida, submetido ao ciclo de sonicação de 3 pulsos por 15 segundos a 60 Hz para dissolver a proteína recombinante agregada em corpos de inclusão, a qual foi posteriormente incubada a T°C ambiente por 1 hora em agitação leve.

Esse material foi novamente centrifugado e o sobrenadante contendo a proteína recombinante solubilizada foi estocado a -20°C até a etapa de purificação.

Para confirmação da expressão da proteína recombinante IGBP-C em pequena e grande escala, foi feito *western blot* conforme descrito na página 42, utilizando o anticorpo anti-histidina-HRP (Invitrogen) que reconhece a cauda de histidina presente no antígeno recombinante fornecida pelo vetor de expressão.

3.6.4 Diálise e purificação

Uma vez solubilizadas, as alíquotas estocadas da proteína recombinante foram dialisadas usando membrana de celulose (Sigma Aldrich) de 14.000 MWCO para a troca do tampão com agente desnaturante contendo 8 M de ureia, por tampão contendo 20 mM NaH_2PO_3 ; 0,5 M NaCl, pH7,4.

Para o processo de diálise e dobramento da proteína recombinante, as alíquotas solubilizadas foram diluídas em tampão contendo 8 M de ureia para uma concentração desejada a ser injetada no saco de diálise. O saco de diálise foi colocado em 2 L de tampão *refolding* sob agitação, a 4°C , contendo quantidades decrescentes de ureia. A cada 20-24 horas o tampão era trocado até que todo o agente desnaturante fosse retirado (procedimento com duração de 7 dias).

Após o processo de diálise a IGBP-C recombinante foi purificada por meio de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), que consiste na separação de proteínas baseada na afinidade de resíduos de aminoácidos como a histidina, a íons metálicos como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Co^{2+} (PORATH, 1992). Para essa etapa utilizamos a coluna Ni-Sepharose His-Trap HP (Amersham Biosciences – GE).

Os tampões e a amostra foram injetados com o auxílio de uma seringa de 20 mL. O tampão de equilíbrio foi composto de 20 mM NaH_2PO_3 ; 0,5 M NaCl; 40 mM Imidazol; pH7,4 e eluição 20 mM NaH_2PO_3 ; 0,5 M NaCl; com 250 mM ou 500 mM de Imidazol; pH7,4. As frações eluídas da coluna foram submetidas a SDS-PAGE 15% posteriormente corado com coomassie blue para verificação da pureza das amostras purificadas.

3.7 Avaliação da interação entre a IGBP-C e subclasses IgG1 e IgG2 bovina por ELISA

É importante ressaltar que anterior aos ensaios em Biacore, a fim de confirmar o papel de ligante de imunoglobulina da IGBP-C de *R. microplus* (função até o momento apenas

putativa, com base na homologia da sequência com a família das IGBPs), foi feita a técnica de ELISA.

Microplacas foram sensibilizadas com rIGBP a 1 μ g por poço num volume de 50 μ L de tampão para *coating* (carbonato pH 9,0) e incubadas a 4°C *overnight*. Para o bloqueio da placa foi utilizado tampão BSA 3%/TBS e posteriormente adicionadas IgG1 e IgG2 purificadas de bovinos (Bethyl) nas concentrações de 8, 16 e 32 μ g por poço, por 1 hora a 37°C.

Por fim, após a adição de anticorpo de ovelha anti-IgG1 ou IgG2 conjugados à peroxidase (Bethyl) nas diluições de 1:5000 e 1:10000, seguiu-se com a adição de substrato revelador e feita a leitura do produto colorimétrico em espectrofotômetro para microplaca ao comprimento de onda de 450 nm.

3.8 Ensaio de interação entre os diferentes alótipos de IgG bovina e IGBP-C do carrapato *R. microplus* por meio do sistema de Ressonância Plasmônica de Superfície (Biacore)

Os ensaios foram realizados no equipamento multiusuário da FAPESP Biacore T200 (GE Healthcare) presente na UNIFESP, campus São Paulo.

O sistema Biacore detecta e mede interações proteína/proteína ou proteína/ligante em tempo real. O princípio de detecção do equipamento se dá pelo processo de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), um fenômeno óptico que ocorre quando a luz incide em delgados filmes condutores sob condições específicas.

O SPR detecta mudanças de massa na superfície do um *chip* sensor, medindo as alterações no índice de refração. Assim, quando as moléculas na solução teste se ligam às moléculas alvo, a massa molecular aumenta e a medida que as moléculas se dissociam, a massa molecular diminui. Este mecanismo é a base do sensograma – um monitoramento contínuo e em tempo real do processo de associação e dissociação da interação das moléculas testadas. A quantificação das alterações no índice de refração provocado pela mudança da massa molecular na superfície do *chip* sensor, é dada em RUs (unidades de resposta) pelo sensograma do aparelho.

Inicialmente, se faz a imobilização de uma proteína denominada ligante na superfície de um *chip*, por onde outra proteína denominada analito, que passará em fluxo. O *chip* utilizado nas análises deste projeto (CM5, GE Healthcare) é composto por uma camada de dextrana carboximetilada que deixa a superfície negativamente carregada permitindo assim, que proteínas de carga positiva se aproximem dopara serem nele imobilizadas.

O pH a ser utilizado durante a etapa de imobilização, é um fator determinante para que o ligante possa ser imobilizado de maneira correta na superfície do *chip*. Soluções de acetato de sódio 10 mM (GE Healthcare) com pH variando entre 4,0 e 5,5 foram utilizadas no *scouting* do ligante, que em um primeiro momento era a rIGBP-C e, posteriormente, os principais alótipos de IgG1 e IgG2 bovina purificados.

Após a passagem do ligante pelo *chip* (a cada pH testado) o mesmo foi lavado para retirada de qualquer resíduo do ligante. Processo denominado de regeneração e feito com NaOH 50 mM (GE Healthcare).

Em todas as imobilizações, foi utilizada a solução de acetato de sódio 10 mM pH 4,5. Em seguida, uma vez selecionado o melhor pH para a imobilização, é necessário que a superfície do *chip* seja ativada, para que o ligante possa ser corretamente imobilizado por meio de ligações covalentes com a matriz de dextrana. No caso, o kit utilizado, *Amino Coupling Kit* (GE Healthcare), propiciou a criação de grupamentos ésteres succinimidas na dextrana do *chip*, que então interagiram com os grupamentos amina presentes no ligante.

Para cálculo da quantidade ideal de ligante a ser imobilizado, foi utilizada uma fórmula com base no peso molecular do analito e do ligante:

$$\text{Capacidade de ligação do analito (RU)} = \frac{\text{PM analito} \times \text{nível imobilizado do ligante}}{\text{PM ligante}}$$

Os ligantes testados, IGBP-C recombinante ou alótipos de IgG1 e IgG2 bovina purificados, ou IgG1 e IgG2 bovina comerciais (Bethyl) foram imobilizados a 25°C em fluxo de 10 uL/minuto na concentração de 20 ug/mL do ligante em tampão HBS-EP com posterior utilização de 0,4 M de 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) - carbodiimida (EDC), 0,1 M de N-hidroxisuccinimida (NHS), 1 M de etanolamina pH 8,5.

Como tampão de corrida, foi utilizado PBS em todos os ensaios, com taxa de fluxo de 10 uL/minuto dos diferentes analitos (hora IGBP-C, hora alótipos de IgG bovina purificados ou IgG1 e 2 bovina comerciais) e tempo de contato de 100 segundos. Os ensaios foram realizados a 37°C, objetivando mimetizar as condições naturais existentes na interação entre a proteína do carrapato e as IgGs do boi.

Por fim, os sensorgramas foram pré-processados utilizando o *software* BIAevaluation versão 1.0, e em seguida, foi feita análise dos dados gerados pelas corridas com o *software* EVILFIT (SVITEL et al., 2003).

Para todos os ensaios realizados em sistema de Ressonância Plasmônica de Superfície (Biacore) nesse trabalho, utilizou-se IGBP-C recombinante sintetizada por empresa especializada face a pureza requerida pelo aparelho e em virtude da aqui produzida (tópico 3.6 dessa seção) ainda conter alguns contaminantes mesmo após o processo de purificação e que poderiam interferir nesse tipo de ensaio. A IGBP-C recombinante utilizada nos ensaios feitos em Biacore foi produzida em célula de mamífero e advém de um projeto de pesquisa com imunização de bovinos anteriormente realizado em nosso laboratório.

3.9 Investigação da região da IgG que a IGBP-C de *R. microplus* se liga por meio de ensaio em Biacore

Seguiu-se o mesmo protocolo experimental contido no tópico 3.8, com algumas modificações.

Como ligantes, foram imobilizados fragmentos Fc, Fab e F(ab')₂ de IgG bovina purificados comercialmente (Rockland), nas concentrações de 10 ug/mL, 10 ug/mL e 20 ug/mL, respectivamente. E a IGBP-C como analito, nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 160 e 260 ug/mL. A taxa de fluxo foi ajustada para 20 uL/minuto e o tempo de contato para 65 segundos.

3.10 Confirmação da presença da IGBP-C nativa em extrato de glândula salivar de carrapatos *R. microplus* machos

3.10.1 Produção de IgY anti-rIGBP-C

A obtenção de anticorpo específico para a IGBP-C recombinante seria uma importante ferramenta no auxílio da detecção dessa proteína, como por exemplo, a confirmação da presença da IGBP-C nativa em extrato de glândula salivar de carrapatos *R. microplus* machos. Sendo assim, foi realizada a produção de anticorpos em galinhas poedeiras e purificação a partir da gema do ovo de IgY anti rIGBP-C.

As vantagens do uso de IgY vêm sendo publicadas por alguns grupos de pesquisa (CARLANDER, 2002; SCHADE; HLINAK, 1996) de ser uma prática menos onerosa do que a similar em outras espécies animais é também mais adequada aos padrões de bem-estar animal. A produção de anticorpos de uma galinha corresponde a de um animal de grande porte. Desse modo, uma elevada quantidade de anticorpos pode ser produzida em uma galinha (CAMENISCH et al., 1999).

Dentre os fatores adicionais que ressaltam a escolha por produção de IgY, destacam-se o fato de anticorpos de galinha não serem capazes de ativar o sistema complemento de mamíferos (HATTA et al., 1993), bem como não se fixarem a proteína A ou G. Fatores que reduzem interferências (LEENAARS et al., 1999) e diminuem a chance de falsos positivos em diferentes ensaios imunológicos.

Para obtenção de IgY anti-rIGBP-C, galinhas poedeiras foram imunizadas com cinco doses da rIGBP-C (100 ug por dose da IGBP-C produzida conforme relatado no tópico 3.6), com adjuvante completo de Freund na primeira dose e incompleto nas demais. A administração foi por via intramuscular, com intervalo de 15 dias entre as doses. Em seguida, os ovos coletados após 5 dias da última imunização, foram utilizados para purificação e obtenção de IgY a partir da gema.

Para isso, fez-se a delipidação por meio da lavagem da gema com 9 volumes de água pH 5,0 a 5,5, com posterior incubação por 6 horas, sob agitação lenta, 4°C. O conteúdo foi centrifugado a 10.000 g por 25 minutos a 4°C. Após, coletou-se a fase líquida e foi realizado o processo de precipitação por sulfato de amônio saturado a 45%, seguido por ultrafiltração e diálise em sistema amicon de filtração (Millipore).

Posteriormente, a especificidade do anticorpo produzido em reconhecer a IGBP-C recombinante, foi confirmada por *western blot* (vide tópico *Western blot*).

3.10.2 Carrapatos *Rhipicephalus microplus*

A colônia de carrapatos do Laboratório de Imunoparasitologia da FMRP-USP foi estabelecida com *R. microplus* coletados na região de Ribeirão Preto-SP e mantida por meio de infestações artificiais periódicas em bovinos. Os carrapatos foram mantidos em estufa incubadora B.O.D (Tecnal, Piracicaba, Brasil) em condições ideais de temperatura, umidade e fotoperíodo.

3.10.3 Infestação artificial em bovinos da raça Holandesa (HPB)

Bovinos HPB, mantidos em piquete localizado no Biotério Central da FMRP-USP, foram submetidos a infestações artificiais por meio de câmaras de infestação contendo aproximadamente 10 mil larvas não alimentadas de *R. microplus*.

As câmaras de infestação, feitas de tecido e amarradas na ponta, foram coladas (utilizando cola especial) na região do flanco desses animais e monitoradas durante a

infestação para obtenção de carrapatos machos a partir do décimo quinto dia de infestação (fase do ciclo de vida do carrapato *R. microplus* em que há a mudança do estágio de ninfa para o estágio adulto).

3.10.4 Obtenção do extrato de glândula salivar de carrapatos machos *R. microplus*

A extração da glândula salivar de carrapatos machos coletados no décimo quinto dia de infestação foi feita com o auxílio de lupa em PBS estéril. Como já relatado, por WANG e NUTTALL (1995a; b), machos secretam abundantemente proteínas ligantes de IgG (IGBPs) em sua saliva. Os pares de glândulas salivares dissecados foram mantidos em PBS com inibidor de protease a 20% e o material foi armazenado a -20°C.

Posteriormente, para obtenção do extrato as amostras foram submetidas a sete sessões de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e banho-maria a 56°C, seguidas por 10 minutos de sonicação. O lisado foi centrifugado a 14.000 g por 30 minutos e o sobrenadante coletado dosado para a quantidade de proteína presente pelo método de Bradford (Sigma Aldrich).

O material processado foi então utilizado para a confirmação da presença da IGBP-C no extrato de glândula salivar do carrapato macho *R. microplus*, por meio de *western blot* com o anticorpo IgY anti-IGBP-C produzido anteriormente. Para o protocolo completo vide tópico *Western blot*.

3.11 Investigação de possíveis funções da IGBP-C de *R. microplus* que não a ligação em IgG bovina

Face a importância da já descrita IGBPMC de *R. appendiculatus* (proteína homóloga e com 85% de identidade com a IGBP-C de *R. microplus*), em exercer um importante mecanismo de auxílio ao repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas e de evasão do sistema imune do hospedeiro (WANG e NUTTALL, 1995b), fomos também motivados a verificar além da função da IGBP-C de *R. microplus* como uma proteína ligante de imunoglobulina, possíveis funções adicionais em virtude também dessa proteína ainda não ter sido caracterizada até o presente momento.

Para os ensaios de investigação de outras funções exercidas pela IGBP-C aqui descritos, foi utilizada proteína produzida em *Pichia pastoris*, sintetizada por empresa especializada. A produção dessa proteína foi decorrente da possível demanda caso as

alíquotas estoque utilizadas para os experimentos em Biacore (poucas alíquotas restantes de um projeto anteriormente executado em nosso laboratório) não fossem suficientes para esses ensaios.

3.11.1 Verificação da possível atividade de lectina da IGBP-C

Um grande número de lectinas (proteínas que ligam em carboidrato) presentes em invertebrados já foram descritas (RATCLIFFE et al., 1985; YEATON, 1981a, 1981b). As lectinas, parecem ser moléculas de grande importância nas reações celulares e humorais para o reconhecimento e defesa por opsonização de moléculas não-*self* no interior dos artrópodes (GRUBHOFFER; KOVÁŘ; RUDENKO, 2004).

Apesar de WANG e NUTTALL (1995b) não terem encontrado evidências que IGBPs são lectinas, investigamos se a IGBP-C tinha função lectínica, uma vez que atualmente já é bem documentado que dependendo do perfil de glicosilação da porção Fc das imunoglobulinas é afetada a resposta dessas moléculas frente às infecções por diferentes patógenos (GARDINASSI et al., 2014). Assim, além das variáveis dentro de FcR e de classes e subclasses de imunoglobulina, as interações de moléculas de IgG com receptores celulares são reguladas pela natureza das estruturas de glicanos presentes na cadeia pesada da IgG (MALHOTRA et al., 1995; ZAUNER et al., 2013).

3.11.1.1 Ensaio de hemaglutinação

O ensaio de hemaglutinação foi realizado segundo a metodologia descrita por BARCA, OCHOA e VALENCIA, 1985. Em resumo, a técnica consiste na utilização de placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços cada com fundo em “V”, os quais foram preenchidos com solução salina tamponada e em seguida acrescidos com igual volume de amostra nos primeiros poços da fileira.

A amostra teste (IGBP-C) foi submetida a uma série de diluições em triplicata, com homogeneização e transferência de 100 µL para o poço seguinte até o penúltimo poço da fileira. Em seguida, a amostra diluída foi incubada com 100 µL de suspensão de hemácias a 2% - preparada com sangue humano O Rh⁺, A⁺, B⁺. AB⁺, bovino, coelho, carneiro, cobaia ou de cavalo, em temperatura ambiente.

Posteriormente, as leituras da aglutinação das hemácias foram realizadas visualmente, após 60 e 90 minutos em temperatura ambiente. Os poços contendo somente a suspensão de

eritrócitos serviram como controle negativo e como controle positivo, utilizou-se a jacalina – proteína sabidamente com ação lectínica.

3.11.1.2 Interação da IGBP-C com diferentes açúcares e glicosaminoglicanos por meio do sistema de Ressonância Plasmônica de Superfície (Biacore)

Seguiu-se o mesmo protocolo dos experimentos descritos no tópico 3.8, utilizando o *chip* sensor CM5 com a IGBP-C imobilizada a 20 ug/mL (ligante) onde foi realizado um *screening* com diferentes açúcares e glicosaminoglicanos (como analitos), nas concentrações de 20 e 200 mM. A relação de todos os analitos testados encontra-se na **Tabela Suplementar 3**. Adicionalmente, a interação entre IGBP-C e heparina foi também analisada utilizando *chip* sensor SA (streptoavidina) com heparina biotinilada imobilizada a 10 ug/mL e IGBP-C nas concentrações de 30, 60 (duplicata), 100, 300, 600 e 1000 ug/mL, como analito.

3.11.1.3 Interação entre IGBP-C e heparina utilizando espectroscopia de fluorescência

A fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano da IGBP-C foi monitorada em PBS, a 37°C, pela mensuração da emissão de fluorescência intrínseca no espectro entre 310 – 400 nm, após excitação a $\lambda_{ex}=295$ nm em espectrofluorímetro Hitachi F-2500 na ausência ou presença de diferentes concentrações de heparina (0.26 mM, 2.6 mM e 5.0 mM).

Adicionou-se 1 mL da IGBP tamponada (1 uM) a uma cubeta de 1 cm de comprimento de percurso colocada num compartimento de células controlado termostaticamente sob agitação magnética constante no espectrofluorímetro, durante 5 minutos. Em seguida fez-se a adição da solução contendo heparina e a diminuição no sinal de fluorescência foi posteriormente lida.

A variação da fluorescência relativa, isto é, $\Delta F = (F_{obs} - F_0)$ onde F_0 é o valor de fluorescência da solução inicial da IGBP-C e F_{obs} é o valor de fluorescência observado após cada adição de heparina, foi analisada por mínimos quadrados não lineares ajustando os dados pela equação de ligação (eqn1) (PIMENTA et al., 2002; SHINJO et al., 2002). O *software* utilizado foi o Grafit 5.0, e o teste, feito com heparina nas seguintes concentrações: 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 e 0,0312 mM e 1 mL de IGBP-C (1 uM).

3.11.1.4 Interação da IGBP-C com a heparina por meio de cromatografia de afinidade em coluna de heparina-Sepharose

A interação da IGBP-C com a heparina também foi avaliada por meio de cromatografia de afinidade em coluna de heparina-Sepharose.

Para a confecção da coluna foi necessário 1mL de resina heparina-Sepharose (GE Healthcare). Inicialmente foi passado na coluna o volume de 1 mL da IGBP-C (1 uM) e para a eluição, tampão Hepes 100 mM com NaCl nas concentrações de 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mM, com a adição de 3mL de cada concentração em seguida coletados separadamente.

A leitura das frações purificadas foi feita em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 280 nm.

3.12 Verificação da possível atividade da IGBP-C no processo de angiogênese

O interesse em investigar se a IGBP-C interfere no processo de formação de vaso (angiogênese) decorreu de estudos sobre diferentes espécies de carrapatos, tais como *Ixodes scapularis* (FRANCISCHETTI; N. MATHER; RIBEIRO, 2005), *Haemaphysalis longicornis* (ISLAM et al., 2009) e inclusive, mais recentemente o *R. microplus* (SOARES et al., 2016), que vêm mostrando que suas proteínas salivares podem modular a angiogênese do hospedeiro. SOARES e colaboradores (2016), sugerem que provavelmente o carrapato lance mão desse mecanismo durante o repasto sanguíneo para controlar a cicatrização de feridas dependente da angiogênese no hospedeiro.

3.12.1 Ensaio de angiogênese *in vitro* sobre Matrigel

Primeiramente o matrigel purificado a partir do tumor EHS (KLEINMAN, 2001) foi descongelado a 4°C em gelo, plaqueado no fundo de placas de 24 poços e deixado a 37°C durante 16 horas para gelificação. Em seguida, células endoteliais (10^5 células derivadas da aorta de coelho) foram semeadas em Matrigel em meio F12 contendo 10% de soro fetal bovino com IGBP-C ou solução salina (controle). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umedecida contendo 2,5% de CO₂ durante 24 horas (STATON, LEWIS e BICKNELL, 2006).

Cada tratamento foi realizado em triplicata. A formação de tubos foi examinada sob um microscópio de luz invertida com ampliação de 100x. Três imagens foram tiradas

aleatoriamente em diferentes áreas e quantificadas por dois observadores diferentes quanto ao número de vasos e estruturas tubulares formados no Matrigel. Para essa etapa foi utilizado o *software* de análises de imagem Image J (NIH, 1997).

3.12.2 Atividade da IGBP-C na via clássica do sistema complemento

O sistema do complemento é uma das primeiras linhas de defesa dos hospedeiros vertebrados e também está envolvido no desenvolvimento da imunidade contra carrapatos. (WIKEL, 1979; WIKEL; ALLEN, 1977).

Ele pode ser ativado por três vias: a clássica, a da lectina e a alternativa (DUNKELBERGER; SONG, 2010). A via clássica é desencadeada quando C1q se liga à região Fc da imunoglobulina ligada ao antígeno. Em contrapartida, estudos já documentaram que IGBPs de diferentes patógenos se ligam à porção Fc do anticorpo (DE MIRANDA-SANTOS e CAMPOS-NETO, 1981; LANGONE, 1982) interferindo por exemplo, na ativação da via clássica do sistema complemento (LANGONE, 1982; WIDDERS, 1990).

Assim sendo, e somado ao fato de que ao longo dos anos diversos estudos mostraram que moléculas salivares de carrapatos são capazes de inibir o sistema complemento (OLIVER et al., 1993; RIBEIRO, 1987; SCHROEDER et al., 2009; TYSON; ELKINS; DE SILVA, 2008; VALENZUELA, 2000) dentre elas as recentemente descritas na saliva de *R. microplus* (JOE et al., 2016; SILVA et al., 2016), fez-se também interessante verificar se a IGBP-C interfere na ativação da via clássica do sistema complemento. Acreditamos que possivelmente de forma indireta pela interação com a porção Fc da imunoglobulina e impedimento da ligação de C1q nesse local.

3.13 Ensaio hemolítico da via clássica

Foram realizados ensaios hemolíticos da via clássica utilizando uma suspensão fresca de eritrócitos de carneiro (500 µL), conservada em solução Alsever. Inicialmente essa solução foi lavada com 5 mL de tampão diluente de fixação do complemento (CFD) contendo 0,1% de gelatina e centrifugada a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Esse processo foi repetido por 3x e a suspensão resultante ajustada para D.O. em espectrofotômetro, entre 0,70-0,75 a 700 nm.

Em seguida, foi feita a mistura e sensibilização dos eritrócitos com um volume apropriado de anticorpo de coelho anti-hemácia de carneiro. A suspensão de anticorpo-eritrócito foi mantida a 4°C durante 15 minutos e posteriormente sua absorbância também foi ajustada para D.O. entre 0,70-0,75 a 700 nm.

Os ensaios hemolíticos foram conduzidos num volume final de 200 µL com 60 uL de solução CFD contendo até 0,9; 4,5; 9,0 ou 45,0 uL de IGBP recombinante (nas concentrações finais de 4,5; 22,5; 45,0 ou 225 ug/mL, respectivamente) ou adicionado na reação PBS nos volumes correspondentes (tampão em que a proteína está diluída), e 60 µL de soro humano diluído em tampão CFD a uma razão de 1:125. Logo após, adicionou-se 80 uL da solução de eritrócitos-anticorpo aos ensaios e a reação foi incubada a 37°C durante 30 minutos.

Após incubação, a reação foi Interrompida pela adição de 200 uL de PBS gelado e as amostras centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Por fim, foi adicionado 200 uL do sobrenadante obtido em uma placa de 96 poços e feita a leitura a 412 nm em espectrofotômetro.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata, contendo três controles, utilizados como se segue: hemólise total (tampão CFD foi substituído por água destilada); controle positivo (hemólise causada pelo soro sem amostra); e controle negativo (sem soro onde apenas a hemólise espontânea está presente). Assim, os resultados gerados foram expressos em percentagem de inibição da hemólise em relação ao controle positivo.

Adicionalmente, foi também realizado o ensaio hemolítico cinético no qual a reação é instantânea, não havendo o período de incubação por 30 minutos a 37°C anterior a leitura. O volume total da reação realizada em placa de 96 poços, foi de 240 uL contendo 193 uL de tampão CFD, 7 uL de soro humano e 40 uL da suspensão eritrócitos-anticorpo acertada. Nesse ensaio, a suspensão de hemácias foi ajustada para D.O. entre 0,70-0,75 a 540 nm, utilizando para a leitura uma alíquota de 100 uL da suspensão, com 1,4 mL de água destilada. Nas amostras teste foi adicionado 15 uL de IGBP-C, a qual ficou na reação com concentração final de 62,5 ug/mL.

Como controles do ensaio hemolítico cinético foram utilizadas amostras sem o tratamento com a IGBP-C e reações adicionadas de PBS no volume correspondente de IGBP-C nas amostras teste (15 uL). O tempo médio ($t_{1/2}$) para lise de 50% das hemácias nas reações tratadas ou não com a IGBP-C, foi calculado.

O ensaio hemolítico cinético foi realizado a fim de tentar descartar a possibilidade da IGBP-C estar tendo uma atividade anti-complementar direta e não por “competição” pelo sítio

de ligação do C1q à porção Fc do anticorpo (ação propiciada pela incubação de 30 minutos, tempo talvez suficiente para a possível ocupação da IGBP-C na porção Fc da IgG).

3.14 Modelagem por homologia da estrutura protéica de IGBP-C de *R. microplus*

Para uma melhor compreensão da função do IGBP-C, conseguimos fazer a modelagem por homologia desta proteína utilizando o *software* Modeller (SALI e BLUNDELL, 1993) e posterior visualização pelo *software* Pymol, a fim de entendermos os possíveis sítios de interação presentes em sua superfície.

Uma vez que a qualidade estereoquímica do modelo é de suma importância, utilizamos o programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) para validação do modelo gerado pela análise em gráfico de Ramachandran. O gráfico de Ramachandran identifica e mostra se determinado aminoácido tem uma conformação permitida para uma macromolécula, levando em consideração diversos parâmetros. Por si só, não valida a estrutura de uma proteína, porém se faz uma ferramenta valiosa na análise da estrutura 3D, sendo particularmente útil já que aponta os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis orientando desse modo, para a geração de modelos teóricos de qualidade. (LOVELL et al., 2003; RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968).

3.15 Western blot

Para confirmação da expressão da proteína recombinante IGBP-C em pequena e grande escala, foi feito *western blot* utilizando o anticorpo anti-histidina-HRP (Invitrogen) que reconhece a cauda de histidina presente no antígeno recombinante fornecida pelo vetor de expressão, nas diluições 1:5.000 e 1:7.000, juntamente com marcador de massa molecular (Bio-Rad).

A cultura foi lisada com tampão de amostra 10x reduzido com mercapto etanol (4%) e submetida a SDS-PAGE 12%. Após a corrida do gel, os componentes proteicos foram transferidos para a membrana de nitrocelulose ECL (GE-Healthcare) utilizando sistema de transferência semi-seco (Amersham Biosciences – GE).

A transferência foi realizada sob voltagem constante de 10 V, 400 mA, por 25 minutos. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora em temperatura ambiente com TTBS contendo 5% (p/v) de leite desnatado em pó. Posteriormente, a membrana foi então

lavada por três vezes com TTBS por 5 minutos e incubada com o anticorpo Anti-HisG-HRP em TTBS contendo 2% (p/v) de leite em pó desnatado, durante 1 hora a T°C ambiente sob agitação.

Após três lavagens, a membrana foi submetida à revelação com substrato quimioluminescente (Pierce ECL *Western blot Substrate*) em temperatura ambiente. A detecção foi realizada por meio do fotodocumentador de imagens ImageQuant (GE Healthcare).

Western blot também foi feito para a confirmação das subclasses de IgG1 e IgG2 dos anticorpos purificados anti-DNP (obtidos pelas purificações apresentadas nos subtópicos 3.5.3 e 3.5.4 dessa seção) e transferidos para a membrana de nitrocelulose. Posteriormente, foram incubados com IgGs de ovelha conjugadas com peroxidase (HRP) anti-IgG1 e anti-IgG2 bovinas (Bethyl) na diluição de 1:5000.

Ainda por meio de *western blot* e seguindo o protocolo experimental aqui descrito, com algumas modificações, foi confirmada a capacidade do anticorpo IgY produzido em galinhas e extraído e purificado da gema do ovo (vide subtópico 4.1) em reconhecer a IGBP-C recombinante. Para isso, foi transferida para membrana de nitrocelulose a rIGBP-C, a qual foi incubada com o anticorpo IgY produzido em galinhas e posteriormente com o anticorpo anti-IgY (HRP) produzido em cabra (Abcam), na diluição de 1:5000.

Por fim, utilizou-se essa técnica para a confirmação da presença da IGBP-C nativa no extrato de glândula salivar de carrapatos machos de *R. microplus*. Fez-se SDS-PAGE 12% contendo amostra do extrato de glândula salivar preparado conforme relatado no subtópico 4.4, transferência em membrana de nitrocelulose e incubação do anticorpo IgY anti-IGBP-C produzido em galinhas (diluição 1:1000) com posterior incubação com o anticorpo anti-IgY (HRP) produzido em cabra (Abcam), na diluição de 1:5000. A membrana foi submetida à revelação com substrato colorimétrico Pierce DAB Substrate Kit (Thermo Fisher Scientific).

3.16 Cromatografia líquida - Espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Para identificação de alguns contaminantes presentes nos alótipos de IgG1 e 2 purificados de bovinos Nelore e HPB, foi feita digestão em gel das bandas correspondentes e posterior análise de LC-MS / MS.

Para isso, 50 µg dos principais alótipos de IgG1 e IgG2 purificados de Nelore e HPB foram dissolvidos em 30 µl de tampão de amostra contendo DTT (1mg/mg de

proteína total), e fervidos durante 5 minutos para redução das ligações dissulfeto posteriormente alquilados com Iodoacetamida (5 mg/mg de proteína total). Em seguida, as amostras submetidas a SDS-PAGE a 10% (Bio-Rad) e as bandas correspondentes aos contaminantes foram cortadas, lavadas e digeridas com tripsina como descrito por THOME e colaboradores (2012).

Os peptídeos tripsinizados foram sucessivamente extraídos com ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila a 50%, e com acetonitrila a 70%, com posterior secagem por SpeedVac. Em seguida as amostras foram dissolvidas em 10 µL de acetonitrila a 5%/ácido fórmico 0,1% e feito o desalting em colunas ZipTip (Sigma-Aldrich). Posteriormente, foram eluídas em 52,5% de acetonitrila / água em ácido fórmico a 0,1%, novamente secas e ressuspendidas em 15 µL de acetonitrila a 5%/ácido fórmico a 0,1% para análise de LC-MS.

O equipamento utilizado para as análises por LC-MS / MS foi um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos acoplado com um nano-LC (EASY-nLC II, ThermoScientific). A cromatografia líquida foi realizada em uma coluna C18 revestida com resina Magic C18, a 600 nL / min com gradientes lineares de 90 minutos de 5 a 40% de acetonitrila em 0,1% ácido fórmico.

A partir do modo de operação MS/MS *scan*, os dez íons mais abundantes duplamente ou triplamente carregados na FT-MS *scan* foram selecionados para análise dependente de dados no *linear ion trap*. Finalmente, os peptídeos foram identificados com uma instalação local do Labkey Server (2013.3), usando os algoritmos de pesquisa X! Tandem (2013.2.01), PeptideProphet e ProteinProphet a fim de validar a estatística dos dados, bem como o agrupamento de proteínas (KELLER et al., 2002; MACLEAN et al., 2006; NESVIZHSHKII et al., 2003).

Figura 2. Fluxograma do delineamento experimental conduzido no presente trabalho. Acs: Anticorpos; rec IGBP-C: IGBP-C recombinante.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção dos fenótipos de infestação por carrapato em bovinos HPB

A obtenção dos fenótipos de infestação por carrapatos foi realizada apenas com os animais da raça Holandesa – HPB (suscetíveis ao carrapato), uma vez que bovinos *Bos t. indicus*, caso da raça Nelore, são geneticamente resistentes a carrapatos (SEIFERT, 1971), com variação muito menor da carga de carrapatos entre indivíduos.

Funcionários do Setor de Gado de Leite da FZEA-USP campus Pirassununga-SP foram questionados quanto ao grau de infestação de cada animal, classificando o escore por meio de foto modelo representada na **Figura 3**. Escores de infestação também foram dados por mim (uma das médicas veterinárias do nosso grupo de pesquisa) no momento da coleta das amostras.

Figura 3. Foto modelo utilizada para a classificação de vacas HPB em escores de infestação por carrapato na escala de 0-4.

Adicionalmente, foram tiradas fotos abrangendo a região posterior e de inserção do úbere para análise das “cicatrizas” de infestações anteriores (**Figura 4**), bem como a

raspagem da região ventral do membro posterior direito para coleta e contagem dos carrapatos presentes, método representado na **Figura 5**.

Figura 4. Fotos abrangendo a região posterior e de inserção do úbere de animais HPB. Fotos tiradas no momento da coleta, para posterior análise das "cicatrices" de infestações anteriores e obtenção do fenótipo de infestação.

Figura 5. Raspagem da região ventral do membro posterior direito de bovinos HPB. Método para contagem de carrapatos presentes no animal no momento da coleta e utilizado para obtenção do fenótipo de infestação.

Sendo assim, a partir dos escores resultantes das análises de fenotipagem descritas acima, fez-se a média aritmética desses valores gerando um escore final para cada vaca, o qual foi posteriormente relacionado com os haplótipos da cadeia pesada da IgG1 e IgG2 bovina. Na **Tabela Suplementar 1**, encontra-se a classificação dos fenótipos de infestação de todos os bovinos HPB aqui estudados.

4.2 A frequência de haplótipos codificantes para a região CH1-CH3 de IgG1 e IgG2 é diferente entre bovinos da raça Nelore e HPB

Após a extração do DNA genômico das amostras de sangue coletadas foi feita amplificação por PCR utilizando iniciadores *sense* e *anti-sense* específicos para os domínios CH1 a CH3, incluindo a região de dobradiça de IgG1 e IgG2 (regiões que contém a maior parte da variabilidade genética da região constante, o que resulta, dessa forma, em diferentes alótipos).

Desse modo, o resultado das amplificações da cadeia pesada de IgG1 e IgG2 de alguns animais da raça Nelore e HPB estão representados na **Figuras 6 e 7**, respectivamente. Os *amplicons* gerados para IgG1 possuem tamanho de 449 pb e IgG2 377 pb.

Figura 6. Amplificação dos domínios CH1- CH3 de IgG1 de bovinos Nelore e HPB. Dos *amplicons* gerados por PCR foi feita eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 ug/mL. Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). *Amplicons* de IgG1 de bovinos Nelore e HPB, estão nas canaletas 1 a 6 e canaletas 7 a 12, respectivamente.

Figura 7. Amplificação dos domínios CH1- CH3 de IgG2 de bovinos Nelore e HPB. Dos *amplicons* gerados por PCR foi feita eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 ug/mL. Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). *Amplicons* de IgG2 de bovinos Nelore e HPB, estão nas amostras delimitadas em branco e vermelho, respectivamente.

Em seguida à amplificação, as amostras foram purificadas em sistema MultiScreen Resist Vacuum Manifold (Millipore). Na **Figura 8** seguem algumas amostras de IgG1 purificadas de bovinos Nelore e HPB e na **Figura 9**, amostras de IgG2 purificadas das duas raças.

Figura 8. Purificação do produto da amplificação dos domínios CH1- CH3 de IgG1 de bovinos Nelore e HPB Nelore. As amostras purificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 ug/mL. Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). *Amplicons* purificados de IgG1 de bovinos Nelore e HPB estão nas amostras delimitadas em branco e vermelho, respectivamente.

Figura 9. Purificação do produto da amplificação dos domínios CH1- CH3 de IgG2 de bovinos Nelore e HPB. As amostras purificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 ug/mL. Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). *Amplicons* purificados de IgG2 de bovinos Nelore e HPB estão nas amostras delimitadas em branco e vermelho, respectivamente.

Posteriormente foi feito o envio das amostras para realização da Genotipagem por Sequenciamento (GBS) em colaboração com o Dr. Alexandre Rodrigues Caetano da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF. Esse processo está descrito na seção Material e Métodos.

Por meio do sequenciamento dos genes codificantes para a região CH1-CH3 de IgG1 e IgG2, foi possível encontrarmos SNPs que geraram cinco haplótipos distintos de IgG1, dois exclusivos de bovinos Nelore e dois de HPB, enquanto que para IgG2, dos cinco haplótipos encontrados, um foi exclusivo de Nelore e dois de HPB.

A frequência dos haplótipos de IgG1 e IgG2 bovina na população das duas raças estudadas e os resíduos de aminoácidos na região de dobradiça resultantes dos SNPs identificados nas posições 795, InDel 803-809 e 954 para IgG1, e 753, 767, 768, 770 e 780, para IgG2, estão descritos na **Tabela 1**.

Nota-se pelos resultados gerados que houve diferença estatisticamente significativa (Teste exato de Fisher $P=0.0002$) pela maior frequência do haplótipo de IgG1 correspondente aos resíduos de aminoácidos “TIP” em bovinos HPB, e o haplótipo correspondente aos aminoácidos “RIP” (Teste exato de Fisher $P=0.005$), em animais da raça Nelore, respectivamente.

De maneira interessante e corroborando os dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (CARVALHO et al., 2011), os haplótipos de IgG2 mais frequentes na raça

HPB, correspondente aos aminoácidos “SPNH” (Teste exato de Fisher $P=0.005$), e Nelore (“IHP”) no presente estudo (Teste exato de Fisher $P=0.005$), definem os alótipos IgG γ 2^a e IgG γ 2b, respectivamente e destacados em vermelho na **Tabela 1**.

Tabela 1. Frequência de haplótipos de IgG1 e IgG2 em raças bovinas suscetíveis (Holandês [HPB], *Bos taurus taurus*) e resistentes a carrapato (Nelore, *Bos taurus indicus*).

Gene	Haplótipo	Resíduos de aa na região de dobradiça ^a	% Frequência Haplotípica		<i>P</i> value (Teste exato de Fisher)
			HPB	Nelore	
IGHG1	C I C	TIP	45,5	9,50	0,001*
	G D C	RDP	38,6	47,6	2,569
	C I G	TIR	2,3	0	5
	G D G	RDR	13,6	0	0,131
	G I C	RIP	0	42,9	0,005*
IGHG2	G C C A A ^b	SPNH	65,8	10,8	0,005*
	G C G A A	SRNH	1,3	0	5
	T T G C C ^c	IHP	32,9	85,1	0,005*
	T T G C A	ICHH	0	2,7	1,208
	G T C A A	SSNH	0	1,4	2,466

^a Resíduos de aminoácidos resultantes dos SNPs identificados na posição dos nucleotídeos 795, InDel 803-809 e 954 para IgG1, e 753, 767, 768, 770, para IgG2.

^b Haplótipo correspondente ao alótipo definido sorologicamente IgG2 γ 2a

^c Haplótipo correspondente ao alótipo definido sorologicamente IgG2 γ 2b

* Indica que o valor de *P* é significativo após a correção de Bonferroni, que foi realizada considerando o número de haplótipos para o gene IGHG1 e IGHG2.

4.3 Genótipos da região constante da cadeia pesada de IgG1 e 2 bovina estão associados a fenótipos distintos de infestação por carrapato *R. microplus*

Para o estudo da associação entre os genótipos da região constante da cadeia pesada de IgG1 e 2 e os fenótipos de infestação em HPB, inicialmente foram feitos mapas de correspondência entre eles. Desse modo, utilizou-se valores do escore na escala de 1-4 de cada animal (nenhum bovino HPB na população estudada foi classificado com escore 0 de infestação) e os genótipos, em homozigose ou heterozigose, correspondentes aos aminoácidos referentes aos SNPs presentes na região constante da cadeia pesada da IgG1 e IgG2.

No mapa de correspondência apresentado na **Figura 10**, foi possível encontrarmos a associação (maior proximidade na distribuição observada no mapa) dos animais HPB homozigotos “TIP/TIP”, haplótipo de IgG1 mais frequente em bovinos dessa raça, ao escore 4 de infestação.

Ao passo que animais HPB heterozigotos para “TIP” e que também possuem “RDP”, um haplótipo de IgG1 que nesse estudo foi encontrado mais em bovinos Nelore, apresentaram correspondência com os escores intermediários de infestação 2 e 3.

Figura 10. Mapa de Correspondência entre haplótipos de IgG1 e escores de infestação por carrapato em bovinos HPB. Seguem em vermelho os animais homo ou heterozigotos para os haplótipos correspondentes aos aminoácidos referentes aos SNPs presentes na região CH1-CH3, e em preto, os escores de infestação (1 a 4).

Assim, no mapa de correspondência da **Figura 11**, encontramos que o haplótipo de IgG2 mais frequente em bovinos HPB, representado como “SPNH”, quando em homozigose nesses animais, está associado ao escore máximo de infestação. Ao mesmo tempo, quando presente uma única vez (heterozigose), a associação se dá com níveis intermediários de infestação (escore 3 e 2). Curiosamente, o escore de infestação 1 está associado aos animais HPB homozigoto para o haplótipo de IgG2 mais frequente na raça Nelore.

Figura 11. Mapa de Correspondência entre haplótipos de IgG2 e escores de infestação por carrapato em bovinos HPB. Seguem em vermelho os animais homo ou heterozigotos para os haplótipos correspondentes aos aminoácidos referentes aos SNPs presentes na região CH1-CH3, e em preto, os escores de infestação (1 a 4).

Em seguida, para uma representação mais elucidativa dos resultados, analisou-se a distribuição dos escores de infestação individuais dentro dos diferentes haplótipos de IgG1 e IgG2 gerados (**Figuras 12 e 13**, respectivamente).

Além disso, a distribuição de animais em categorias de infestação baixa/intermediária (grupo compreendendo bovinos com escores 1 e 2) e alta (escores 3 e 4) também foi feita (**Figuras 14 e 15**). A distribuição por categorias em vez de escores de infestação talvez seja o método mais adequado de análise e inclusive de maior interesse ao produtor porque este, por sua vez, classifica os animais de sua propriedade em pouco ou muito infestados para escolher o melhor manejo (i.e., descarte) e tratamento.

Figura 12. Distribuição dos escores de infestação por carrapato e aminoácidos presentes na região de dobradiça de IgG1 bovina. Os fenótipos de infestação por carrapato em bovinos HPB estão distribuídos em escala de 1-4 e os genótipos (em homozigose ou heterozigose) codificantes para a região da dobradiça de IgG1 estão representados pelos aminoácidos correspondentes. Cada caracter, corresponde a um bovino HPB. Nessa análise a distribuição dos fenótipos de infestação dentre os genótipos foi estatisticamente significativa de acordo com Teste exato de Fisher $P=0.03$.

Figura 13. Distribuição dos escores de infestação por carrapato e aminoácidos presentes na região de dobradiça de IgG2 bovina. Os fenótipos de infestação por carrapato em bovinos HPB estão distribuídos em escala de 1-4 e os genótipos (em homozigose ou heterozigose) codificantes para a região da dobradiça de IgG2 estão representados pelos aminoácidos correspondentes. Cada caracter, corresponde a um bovino HPB. Nessa análise a distribuição dos fenótipos de infestação dentre os diferentes genótipos não foi estatisticamente significativa de acordo com Teste exato de Fisher $P=0.17$.

Figura 14. Distribuição das categorias de infestação por carrapato e aminoácidos presentes na região de dobradiça de IgG1 bovina. As categorias de infestação por carrapato em bovinos HPB estão distribuídas em baixa/inter (compreende escores 1 e 2) e alta (escores 3 e 4). Os genótipos (em homozigose ou heterozigose) codificantes para a região da dobradiça de IgG1 estão representados pelos aminoácidos correspondentes. Cada caracter, corresponde a um bovino HPB. Nessa análise a distribuição dos fenótipos de infestação dentre os genótipos foi estatisticamente significativa de acordo com Teste exato de Fisher $P=0.03$. Baixa/inter: categoria de infestação baixa/intermediária.

Figura 15. Distribuição das categorias de infestação por carrapato e aminoácidos presentes na região de dobradiça de IgG2 bovina. As categorias de infestação por carrapato em bovinos HPB estão distribuídas em baixa/inter (compreende escores 1 e 2) e alta (escores 3 e 4). Os genótipos (em homozigose ou heterozigose) codificantes para a região da dobradiça de IgG2 estão representados pelos aminoácidos correspondentes. Cada caracter, corresponde a um bovino HPB. Nessa análise a distribuição dos fenótipos de infestação dentre os genótipos foi estatisticamente significativa de acorso o Teste exato de Fisher $P=0.04$. Baixa/inter: categoria de infestação baixa/intermediária.

Entre os bovinos HPB as categorias de cargas de carrapatos e os escores de infestações estavam significativamente (Teste exato de Fisher $P=0,03$) associados com os genótipos para IgG1 mais frequentes em Nelore ou HPB, respectivamente (baixa/intermediária e alta; 0 a 4). Havia, por exemplo, entre os homozigotos para o haplótipo de IgG1 “TIP”, o haplótipo mais frequente em HPB, significativamente mais animais apresentando escore 4 /categoria alta de infestação do que animais apresentando outros escores e outras categorias de cargas. Em contrapartida, havia mais animais apresentando escores 3 e 2 quando possuíam o haplótipo “TIP” em heterozigose.

Quanto a haplótipos de IgG2 bovina, a distribuição destes correlacionou-se significativamente apenas com categorias de cargas de carrapatos, baixa/intermediária ou alta, mas não com os diferentes escores, 1 a 4 (Teste exato de Fisher $P=0,03$ e $P=0,17$, respectivamente). Em resumo, para os haplótipos mais frequentes de ambas as subclasses de IgG nas duas raças, HPB e Nelore, foi possível observar um claro viés na distribuição de fenótipos de infestação em bovinos HPB.

A fim de confirmar as associações entre genótipos e fenótipos encontradas até o momento, avaliamos por meio de mapas de correspondência a influência da presença de determinado haplótipo de IgG1 ou IgG2 presente uma vez (i.e., em heterozigose), duas vezes (em homozigose) ou mesmo ausente com os escores de infestação (**Figuras 16 e 17**).

Figura 16. Mapa de Correspondência entre o haplótipo “TIP” de IgG1 e os escores de infestação por carrapato em bovinos HPB. O haplótipo de IgG1 representado com os aminoácidos correspondentes na região de dobradiça “TIP”, foi analisado quando em homozigose “TIP/TIP”, heterozigose “TIP/.”, ou quando ausente “Não TIP”; em relação aos escores de infestação a carrapato (1 a 4) em bovinos HPB. Em vermelho, a representação das formas haplotípicas, e em preto os escores de infestação.

Figura 17. Mapa de Correspondência entre o haplótipo “RDP” de IgG1 e os escores de infestação por carrapato em bovinos HPB. O haplótipo de IgG1 representado com os aminoácidos correspondentes na região de dobradiça “RDP”, foi analisado quando em homozigose “RDP/RDP”, heterozigose “RDP/.”, ou quando ausente “Não RDP”; em relação aos escores de infestação a carrapato (1 a 4) em bovinos HPB. Em vermelho, a representação das formas haplotípicas, e em preto os escores de infestação.

Dito de outra forma, na população de animais aqui estudada, os haplótipos mais frequentes na raça HPB (o haplótipo de IgG1 representado como “TIP” e o haplótipo de IgG2 representado como “SPNH”) quando em homozigose estão associados significativamente ao escore 4 de infestação (nível máximo de carga de carrapatos de acordo com o método utilizado), mas essa associação diminui de forma gradativa quando esses haplótipos estão em heterozigose ou ausentes na população em questão (**Figuras 16 e 17**).

Nos mapas de correspondência para os haplótipos mais frequentes na raça Nelore o contrário foi verificado para os fenótipos de infestação em bovinos HPB: os haplótipos “RDP” de IgG1 (que não é o haplótipo mais frequente, mas está mais presente em Nelores) e “IHP” de IgG2, quando em homozigose estão associados a escores de infestação mínimos, escores esses que aumentam gradativamente quando esses haplótipos estão em heterozigose ou ausentes (**Figuras 18 e 19**).

Figura 18. Mapa de Correspondência entre o haplótipo “SPNH” de IgG2 e os escores de infestação por carrapato em bovinos HPB. O haplótipo de IgG2 representado com os aminoácidos correspondentes na região de dobradiça “SPNH”, foi analisado quando em homozigose “SPNH/SPNH”, heterozigose “SPNH/.”, ou quando ausente “Não SPNH”; em relação aos escores de infestação a carrapato (1 a 4) em bovinos HPB. Em vermelho, a representação das formas haplotípicas, e em preto os escores de infestação.

Figura 19. Mapa de Correspondência entre o haplótipo “IHP” de IgG2 e os escores de infestação por carrapato em bovinos HPB. O haplótipo de IgG2 representado com os aminoácidos correspondentes na região de dobradiça “IHP”, foi analisado quando em homozigose “IHP/IHP”, heterozigose “IHP/.”, ou quando ausente “Não IHP”; em relação aos escores de infestação a carrapato (1 a 4) em bovinos HPB. Em vermelho, a representação das formas haplotípicas, e em preto os escores de infestação.

Portanto, foi encontrada uma associação entre o fenótipo de maior suscetibilidade em animais HPB e a presença do haplótipo correspondente aos aminoácidos na região de dobradiça “SPNH”, o alótipo IgG γ 2a, significativamente mais frequente em HPB. Por outro lado, os fenótipos intermediários de infestação foram observados em animais HPB que possuem o haplótipo correspondente aos aminoácidos “ICHP”, o alótipo IgG γ 2b, mais frequente em bovinos da raça Nelore.

Em suma, os resultados obtidos com as análises de alo-haplótipos de IgG2 bovina e fenótipo de infestação, corroboram e sobrelevam os dados relatos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa por CARVALHO e colaboradores (2011). Ainda não foram publicados estudos de associação de alo-haplótipos de IgG1 em bovinos com maior ou menor infestação por carrapato, salientando a importância das análises aqui feitas.

4.4 Purificação dos alótipos de IgG1 e IgG2 mais frequentes em bovinos Nelore e HPB

Feita a genotipagem e, portanto, identificação dos animais homozigotos para os haplótipos de IgG1 e IgG2 mais frequentes em Nelore e HPB, seguiu-se para a purificação dos alótipos de IgG1 e IgG2 presentes nesses bovinos.

Assim, os soros dos animais sabidamente homozigotos foram inicialmente precipitados com sulfato de amônio a 35% e ultradiafiltrados para a precipitação das gamaglobulinas (**Figura 20**).

Figura 20. Ultradiafiltração de gamaglobulinas. Na figura, sistema Amicon (Millipore) de agitação de células, promovendo a concentração e diálise de gamaglobulinas precipitadas com sulfato de amônio saturado a 35%. O equipamento de ultradiafiltração, suplementado com um ducto fornecedor de pressão - representado pelo conector “H”, está montado acima de um agitador magnético em câmara fria.

Posteriormente, uma vez que o presente estudo envolve a investigação das interações não cognatas, ou seja, não por ligação entre antígeno e anticorpo, mas provavelmente da IGBP do carrapato *R. microplus* pela porção Fc dos alótipos de IgG1 e 2 bovina, realizou-se a purificação de IgGs anti-DNP em coluna DNP-Sepharose descartando assim, a possibilidade de interação pela porção Fab durante os ensaios de interação. Segundo MUKKUR e FROESE (1971) e TEWARI e MUKKUR, (1975), bovinos possuem anticorpos anti-DNP naturalmente.

Por fim, as IgGs anti-DNP foram purificadas em coluna anti-IgG1 ou anti-IgG2 bovina-Sepharose. Alíquotas de todas as etapas de purificação até a obtenção dos alótipos de IgG1 e 2 mais frequentes em Nelore e HPB, foram submetidas a SDS-PAGE 12% e encontram-se na **Figura 21**.

Figura 21. Etapas de purificação dos alótipos de IgG1 e 2 bovina. SDS-PAGE 12%, coloração com coomassie blue. Canaletas 1 – 5 correspondem às etapas de purificação para obtenção de alótipos de IgG1 e 2 de Nelore. 1: soro total; 2: após precipitação com sulfato de amônio a 35%; 3: eluato coluna DNP-Sepharose; 4: eluato coluna anti-IgG1 bovina-Sepharose; 5: eluato coluna anti-IgG2 bovina-Sepharose. A mesma ordem segue para as canaletas 6-10, referentes às etapas de purificação para obtenção de alótipos de IgG1 e 2 de HPB.

Na **Figura 22**, estão representdos os padrões eletroforéticos das amostras dos alótipos de IgG1 e 2 (eluatos das colunas anti-IgG1 e 2 bovina-Sepharose) em condição não redutora. O marcador de peso molecular utilizado continha o agente redutor β -mercaptoetanol que se difunde pelo gel, por isso não ocupamos as canaletas próximas a ele para não reduzir os alótipos por difusão.

Figura 22. Alótipos de IgG1 e IgG2 de Nelore e HPB. SDS-PAGE 6% não reduzido, coloração com prata. Canaletas 1-2 correspondem aos eluatos das coluinias anti-IgG1 e anti-IgG2 bovina-Sepharose de Nelore, respectivamente. Canaletas 3-4 correspondem aos eluatos das colunas anti-IgG1 e anti-IgG2 bovina-Sepharose de HPB, respectivamente.

Todavia, apesar das várias etapas de purificação empregadas, encontramos assim mesmo dois aparentes contaminantes nas canaletas 4-5 e 9-10, contendo os eluatos das colunas de anti-IgG1 e anti-IgG2 bovina-Sepharose de Nelore e HPB, respectivamente (com bandas de 25 kDa, correspondente às cadeias leves, e 50 kDa, correspondente às cadeias pesadas da IgG1 e IgG2). Como podemos observar na **Figura 21**, uma das bandas adicionais possui massa com cerca de 250 kDa e a outra por volta de 80-90 kDa.

Assim sendo, para identificar os contaminantes e evitar uma possível interferência durante os ensaios de interação em Biacore com a IGBP-C de *R. microplus*, empreendemos a espectrometria de massas com análises das bandas correspondentes supracitadas em LC-MS/MS. Esse processo foi realizado em colaboração com Prof. Dr. Vitor Marcel Faça do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP. Para a nossa surpresa, os resultados da espectrometria de massas indicaram que as bandas com massas de 80-90 kDa e de 250 kDa foram identificadas como contendo IgM e imunoglobulinas com CDR H3 ultralongo, respectivamente. Muito embora as bandas ditas como contaminantes exibissem tamanhos um pouco maiores do que o esperado para as identificadas pelo LC-MS/MS.

Já foi visto que em cerca de 10% das Igs de bovinos, entre elas IgG e IgM, a região hipervariável da cadeia pesada formadora do sítio de ligação com antígenos e determinante de complementariedade é cerca de seis vezes maior que o tamanho do CDR correspondente em humanos e camundongos (BERENS; WYLIE; LOPEZ, 1997; SAINI et al., 1999, 2003; ZHAO; JACKSON; AITKEN, 2006).

Estudos anteriores de um mesmo grupo de pesquisa relataram que IgM bovina pode se ligar ao DNP, hapteno da coluna DNP-Sepharose (MUKKUR; FROESE, 1971;

MUKKUR; TEWARI, 1973) justificando, portanto, o fato dela ser encontrada e até concentrada no eluato da purificação de gamaglobulina na coluna de DNP (a sua presença tornou-se mais evidente a partir das canaletas 3 e 8). Porém, a presença de IgM persiste mesmo após a purificação em coluna anti-IgG1 ou anti-IgG2 bovina-Sepharose.

O achado nos impeliu, portanto, a questionar a especificidade dos anticorpos anti-IgG1 e IgG2 bovina, produzidos em ovelha e adquiridos de fonte comercial (Bethyl) utilizados para a construção das colunas. Por isso foi feito *western blot* dos alótipos de IgG1 e IgG2 purificados, a fim de confirmar o subtipo das amostras, anterior aos ensaios de interação com a IGBP-C em Biacore (**Figuras 23 e 24**).

Figura 23. Confirmação da subclasse dos alótipos de IgG1. *Western blot* utilizando alótipos de IgG1 purificados. Da esquerda para a direita – uma amostra Nelore, seguida por três amostras de HPB. Por último, amostra IgG2 bovina (Bethyl), como controle.

Figura 24. Confirmação da subclasse dos alótipos de IgG2. *Western blot* utilizando alótipos de IgG2 purificados. Da esquerda para a direita – duas amostras Nelore, seguida por quatro amostras de HPB. Por último, amostra IgG1 bovina (Bethyl), como controle.

A purificação dos alótipos de IgG1 e IgG2 exigiu várias etapas de purificação e provavelmente por isso o rendimento foi baixo. Isso imprediu empreender um método de purificação adicional que excluísse as bandas contaminantes de massas de 80-90 kDa e de 250 kDa.

De qualquer maneira, nada foi descrito a respeito da proteína ligante de IgG, IGBP-MC de *R. appendiculatus* que é homóloga IGBP-C, de *R. microplus*, havendo 85% de identidade entre elas (alinhamento feito pelo programa Clustal Omega - **Figura Suplementar 2**), e tampouco a própria IGBP-C de *R. microplus*, se ligarem a IgM. Entretanto, na primeira oportunidade realizaremos ensaios em Biacore, bem como *western blot* para verificar se existe afinidade e ligação entre elas e a IgM.

4.5 Expressão heteróloga da IGBP-C de *R. microplus*

Encontram-se nas **Tabelas Suplementares 4, 5 e 6** algumas considerações sobre as IGBPs, tais como como similaridades das sequências com aquelas de outras proteínas ligantes de imunoglobulina G presentes na base dados de proteína NCBI NR para transcritos de *R. microplus*, bem como a análise comparativa das IGBPs presentes no sialotranscriptoma de *R. microplus* (gerado pelo nosso grupo – GARCIA, 2013) de acordo com o estágio de desenvolvimento do carrapato e do hospedeiro em que foi alimentado.

4.5.1 Escolha e extração da sequência da IGBP-C contida em fago

Estudos gerados pelo grupo de pesquisa, do qual faço parte, demonstraram que *R. microplus* expressa IGBPs em suas glândulas salivares (CARVALHO et al., 2011) e que, diferentemente do observado por WANG e NUTTALL (1995b) com *R. appendiculatus*, todas as três IGBP classificadas em tipos A, B e C de *R. microplus*, apresentam peptídeo sinal e são potencialmente secretadas em sua na saliva (GARCIA, 2013).

A sequência completa do gene de interesse codificante para IGBP-C foi retirada do sialotranscriptoma gerado pelo laboratório (biblioteca de clones obtida a partir da construção de bibliotecas de cDNA, ver MARUYAMA, 2008). Na **Figura 25**, seguem as sequências de aminoácidos e nucleotídeos da IGBP-C de *R. microplus*.

IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* - sequência de aminoácidos

MMHFAATAVLLAFAADLAQGTVQYHQLIKCSQNYSAEVMGVVTRDAIIGSQMTAKIK
LRVYDTILKELKLRVTLFTPEGTVVPCIEHFGSCVYDVCEDVPDDKKTMTWTTKCPVKP
GTYWRNLIFRVSPKLLKHIGSGHLIAALMLESKGKKLSCQALHLRVYKTRPTTDIWD

IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* - sequência de nucleotídeos

ATGATGCACTTCGCTGCGACTGCGGTGCTGCTGGCGTTCGCGGCTGACCTGGCGCA
GGGCACCGTTCAGTATCACCAGCTGATCAAATGCTCTCAGAACTACTCTGCGGAAG
TTATGGGTGTTGTTACTCGTGACGCAATCATCGGTTCTCAGATGACCGCGAAGATC
AAACTGCGTGTGTATGACACCATCCTGAAAGAACTGAAGCTGCGCGTTACCCTGTT
CACCCCGGAAGGCACCGTTGTTCCGTGCATCGAACACTTCGGCTCTTGCGTTTACG
ACGTTTGCGAAGACGTTCCGGACGACAAAAAGACTATGTGGACCACCAAATGCCC
GGTTAAACCGGGcACCTACTGGCGTAACCTGATTTTCCGTGTTAGCCCCGAACTGCT
GAAACACATTGGTTCTGGTCACCTGATCGCGGCACTGATGCTGGAATCTAAAGGCA
AGAAGCTGTCTTGCCAGGCGCTGCACCTGCGCGTGTACAAAACCCGTCCGACCACC
GACATCTGGGAC

Figura 25. Sequências de aminoácidos e nucleotídeos da IGBP-C de *R. microplus*.

Duas alíquotas de fagos-clone da IGBP-C, foram utilizadas de molde para a reação de PCR a fim de ser obter o produto correspondente à sequência do respectivo *contig*, com o uso de iniciadores *sense* e *anti-sense* (PT2F1 e PT2R1, específicos para região do vetor fago TriplEx). Dos dois fagos testados contendo o *contig* da IGBP-C, apenas um deles foi amplificado (**Figura 26**).

Figura 26. Extração da sequência da IGBP-C a partir de fago. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 ug/mL. Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1 e 2: alíquotas fagos-clone IGBP-C, canaleta 3: controle negativo (reação sem amostra).

Posteriormente, do produto de PCR purificado fez-se uma nova reação, utilizando agora, iniciadores específicos para a amplificação da IGBP-C.

Em seguida, parte do produto amplificado foi aplicado em gel de agarose Low Melting 1,5 % (Sigma Aldrich) e a banda visualizada foi cortada para purificação utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

4.5.2 Clonagem e expressão da IGBP-C

A amostra obtida pelo processo descrito acima foi usada na reação de clonagem realizada com o kit Champion pET Directional TOPO Expression (Invitrogen).

Para confirmação da clonagem, foi feita a PCR de colônia utilizando iniciadores T7 do vetor, de pools contendo de 3 a 5 colônias com o objetivo de se testar uma maior quantidade de clones, uma vez que não estávamos obtendo clones positivos em duas das reações anteriores; além disso, foram testadas diferentes proporções inserto:vetor, até se obter a proporção ideal. As proporções testadas (1:1, 2:1, 4:1 e 10:1 de inserto para vetor) e o pool de

clones positivos de acordo com o tamanho molecular apresentado no gel de agarose 1%, vetor vazio (276 pb) ou vetor + inserto (738 pb) estão demonstrados na **Figura 27**.

Figura 27. Confirmação da clonagem. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 ug/mL de produtos gerados pela PCR de colônia. Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 1, 2 e 3: pool de colônias nas proporções 1:1, 2:1 e 4:1 de inserto para vetor, respectivamente; algumas colônias/clones foram negativos (vetor vazio) e outros positivos para a clonagem (vetor + inserto). Canaleta 4: pool de colônias/clones na proporção 10:1 de inserto para vetor, onde todos foram positivos para a reação de clonagem, apresentando *amplicons* com tamanho correspondente a vetor + inserto (738 pb).

Posteriormente, a presença do fragmento de inserção no local e na orientação corretos foi confirmada pela reação de sequenciamento feita no Centro de Estudos do Genoma Humano USP-SP.

Para a escolha do sistema de expressão heteróloga da IGBP-C em *E.coli* foi feita anteriormente, a análise da sequência de interesse em relação à ausência de sítios de N ou O-glicosilação, pelos programas NetNGlyc 1.0 e NetOglyc 3.1 (**Figuras 28 e 29**, respectivamente). Como não apresentavam sítios de glicosilação foi justificado seguir com expressão nesse sistema.

Figura 28. Análise de sítios de N-glicosilação na sequência da IGBP-C de *R. microplus*. Análise feita pelo programa NetNGlyc 1.0 Server.

Figura 29. Análise de sítios de O-glicosilação na sequência da IGBP-C de *R. microplus*. Análise feita pelo programa NetOGlyc 3.1 Server.

A produção da proteína recombinante foi realizada em sistema de expressão procarioto usando *E. coli* quimicamente competente. A princípio foi tentada a expressão em *E. coli* da cepa BL21 Star (DE3) One Shot fornecida pelo Kit de expressão (Invitrogen). No entanto, após várias tentativas a proteína não estava exibindo um padrão de expressão adequado.

As seguintes temperaturas de indução, T°C ambiente, 30°C e 37°C com IPTG adicionada nas concentrações de 0,25 mM, 0,5 mM ou 1 mM e nos tempos de indução 4 horas, *overnight* ou 24 horas, foram testadas (a **Figura 30** mostra um dos géis da padronização).

Figura 30. Padronização da expressão da IGBP-C. Bactérias *E. coli* da cepa BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen) foram transformadas com pET100/IGBP-C e induzidas com 0,25 mM, 0,5 mM e 1 mM de IPTG por 4 horas ou *overnight* a T°C ambiente, 30°C ou 37°C. A cultura foi lisada e submetida a SDS-PAGE 12%, posteriormente corado com coomassie blue. AI: amostra coletada antes da indução com IPTG. IGBP-C recombinante (17,3 kDa + 3 kDa 6xHis-tag N-terminal) está indicada na figura.

Desse modo, após mudarmos todas as condições de expressão, resolvemos testar uma cepa de *E.coli* diferente da fornecida pelo kit de expressão, no caso, a cepa Rosetta (Novagen), fornecida por outro laboratório aqui do Departamento. Assim, numa expressão piloto com a cepa em questão utilizando 0,25 mM de IPTG, num período de indução de 4 horas a 37°C, foi possível observar um padrão de expressão bem distinto dos anteriores (**Figura 31**). Posteriormente fez-se a expressão em grande escala.

Com esse resultado, concluímos que a sequência da IGBP-C apresentava na verdade, códons raros e por isso não era possível ser expressa em cepa BL21 Star (DE3) One Shot (Invitrogen), uma vez que essa cepa não possui a maquinaria necessária (tRNAs) para codificação de códons não usuais para *E.coli*. Por isso, passamos a utilizar a cepa Rosetta porque possui maquinaria compatível com os códons do plasmídeo que construímos.

Figura 31. Expressão da IGBP-C em bactérias *E.coli* da cepa Rosetta. Bactérias *E.coli* da cepa Rosetta (Novagen) foram transformadas com pET100/IGBP-C e induzidas com 0,25 mM de IPTG por 4 horas a 37°C. A cultura foi lisada e submetida a SDS-PAGE 12%, posteriormente corado com coomassie blue. AI: amostra coletada antes da indução com IPTG. IGBP-C recombinante (17,3 kDa + 3 kDa 6xHis-tag N-terminal) está indicada na figura.

Para confirmação da expressão da proteína recombinante IGBP-C em pequena e grande escala, foi feito *western blot* utilizando o anticorpo anti-histidina-HRP (Invitrogen) que reconhece a cauda de histidina presente no antígeno recombinante fornecida pelo vetor de expressão, nas diluições 1:5.000 e 1:7.000 (**Figura 32**).

Figura 32. Detecção da expressão da IGBP-C recombinante por *western blot*. Lisados de culturas de bactérias *E.coli* da cepa Rosetta (Novagen) transformadas com pET100/IGBP-C e induzidas com 0,25 mM de IPTG por 4 horas a 37°C, foram submetidos a SDS-PAGE 12%. Para a detecção por *western blot* utilizou-se o anticorpo anti-histidina-HRP (Invitrogen) nas diluições 1:5.000 e 1:7.000, o qual reconhece a cauda de histidina da IGBP-C recombinante.

Em seguida, após ser feito o teste de solubilidade da proteína, o sobrenadante e o sedimento de cada fração foram submetidos a SDS-PAGE 12% (**Figura 33**). Conforme observado, em virtude da IGBP-C recombinante estar agregada em corpos de inclusão, foi em seguida solubilizada em tampão de lise contendo 8 M de ureia.

Figura 33. Teste Solubilidade da IGBP-C. A cultura de bactérias *E.coli* da cepa Rosetta (Novagen), transformadas com pET100/IGBP-C e induzidas com 0,25 mM de IPTG por 4 horas a 37°C, foi ressuspensa em solução de lise e submetida à sonicação. Após centrifugação (obtenção do 1° sobrenadante), o pellet formado foi ressuspensa em tampão de lise na presença de ureia 8 M e centrifugado novamente - obtenção do 2° sobrenadante e do *pellet* insolúvel. As amostras foram lisadas e submetidas a SDS-PAGE 12%, posteriormente corado com coomassie blue. 1°sob: 1°sobrenadante; 2°sob: 2°sobrenadante; PI: *pellet* insolúvel. IGBP-C recombinante (17,3 kDa + 3 kDa 6xHis-tag N-terminal) está indicada na figura.

4.5.3 Diálise e Purificação da IGBP-C

Uma vez solubilizadas, a fim de obter proteína em conformação adequada, as alíquotas foram dialisadas em 2 L de tampão de *refolding* contendo quantidades decrescentes de ureia sob agitação a 4°C. A cada 20-24 horas o tampão era trocado até que fosse retirada toda a ureia (procedimento com duração cerca de 7 dias).

Após o processo de diálise a IGBP-C recombinante foi purificada em coluna Ni-Sepharose His-Trap HP (Amersham Biosciences – GE). As frações eluídas foram submetidas a SDS-PAGE 12% (**Figura 34**) e o gel contendo tais frações foi analisado com o programa ImageJ (NIH, 1997) para estimar a quantidade de proteína recombinante purificada obtida, por meio da densitometria de bandas. Foi obtida uma quantidade média de 3 mg de proteína/L, confirmada posteriormente pelo método de Bradford.

Figura 34. Purificação da IGBP-C. Purificação em coluna Ni-Sepharose His-Trap HP (Amersham Biosciences – GE) da rIGBP-C. As frações eluídas foram submetidas a SDS-PAGE 12%, posteriormente corado com coomassie blue. AP: lisado antes da purificação; NL: fração não ligada à coluna; LI: lavagem inicial; LF: lavagem final; 250: eluição com 250 mM de imidazol; 500 mM: eluição com 500mM de imidazol.

A proteína purificada, foi utilizada para imunização em galinhas poedeiras para obtenção de IgY policlonal anti-rIGBP-C e para teste de interação entre IGBP-C e subclsses IgG1 e 2 bovina purificadas comercialmente (Bethyl), por ELISA.

4.6 A ligação da IGBP-C de *R. microplus* é maior na subclasse IgG2 que IgG1 bovina

É importante ressaltar que anterior aos ensaios em Biacore, a fim de confirmar o papel de ligante de imunoglobulina da IGBP-C de *R. microplus* (função até o momento apenas putativa, com base na homologia da sequência com a família das IGBPs), foi feito ensaio imunoenzimático (ELISA) para confirmar que a IGBP de *R. microplus* liga, de fato, em IgGs.

Desse modo, após microplacas serem sensibilizadas com rIGBP (expressa em *E. coli*) a 1 μg por poço, foram posteriormente adicionadas com IgG1 e IgG2 purificadas de bovinos (Bethyl) nas concentrações de 8, 16 e 32 μg por poço, seguida a adição de anticorpo de ovelha anti-IgG1 ou IgG2 conjugados à peroxidase (Bethyl) nas diluições de 1:5.000 e 1:10.000.

Os resultados mostram que a IGBP liga IgG1 e IgG2 bovina obtidas comercialmente, apresentando interação maior com a subclasse IgG2 (**Figura 35**).

Figura 35. Interação IGBP-C com subclasses IgG1 e IgG2 bovina totais. ELISA com rIGBP-C incubada com IgG1 e IgG2 bovina (Bethyl) nas concentrações de 8, 16 e 32 μg por poço, seguida da adição de IgGs de ovelha conjugada a HRP anti-IgG1 e anti-IgG2 bovina nas diluições de 1:5.000 (triângulo [IgG2] e círculo [IgG1] preenchidos) e 1:10.000 (triângulo [IgG1] e círculo [IgG2] em branco).

4.7 IGBP-C de *R. microplus* se liga mais em alótipos de IgG do bovino resistente (Nelore), porém com maior afinidade em alótipos de IgG do bovino suscetível (HPB)

A interação dos diferentes alótipos de IgG bovina pela IGBP-C do carrapato *R. microplus* foi avaliada por meio do sistema de Ressonância Plasmônica de Superfície (Biacore). O sistema Biacore detecta e mede interações proteína/proteína ou proteína/ligante em tempo real.

Os ligantes testados (i.e., os principais alótipos de IgG1 e IgG2 purificados de bovinos Nelore e HPB e pools de alótipos de IgG1 e IgG2 bovina de fontes comerciais) foram imobilizados na concentração de 20 ug/mL em tampão HBS-EP. Como o tampão de corrida foi utilizado PBS em todos os ensaios, com taxa de fluxo de 10 uL/minuto do analito, rIGBP-C, nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 160 e 260 ug/mL, com tempo de contato de 100 segundos. Os ensaios foram realizados a 37°C, objetivando mimetizar as condições naturais existentes na interação entre a proteína do carrapato e as IgGs do boi.

Em seguida, os sensorgramas obtidos foram pré-processados usando o *software* BIAevaluation versão 1.0, e posteriormente foi feita análise dos dados gerados pelas corridas com o *software* EVILFIT (SVITEL, 2003).

Para todos os ensaios realizados em sistema de Ressonância Plasmônica de Superfície (Biacore) neste trabalho, utilizou-se IGBP-C recombinante sintetizada por empresa especializada, face a pureza requerida para o ensaio e em virtude daquela aqui produzida ainda conter alguns contaminantes mesmo após o processo de purificação (subtópico 3.6 dessa seção). Assim sendo, optamos por utilizar algumas alíquotas estoque de IGPB-C produzida em célula de mamífero e sintetizada pela empresa Invitrogen, providas de um projeto envolvendo imunização de bovinos executado anteriormente em nosso laboratório.

Inicialmente, ao fazermos um teste verificando a análise de interação da rIGBP-C, como ligante, e o alótipo de IgG1 mais frequente em bovinos HPB (purificado de bovino sabidamente homozigoto para o haplótipo com os aminoácidos “TIP” gerados pelos SNPs presentes na região de dobradiça) como analito, observarmos uma ligação muito maior à superfície do *chip* quando este não estava carregado com o ligante (rIGBP-C), chamado aqui de “branco”, em relação à célula do *chip* contendo a rIGBP-C imobilizada.

Estudos mostram que bovinos possuem anticorpos reativos contra diversos polissacarídeos, dentre eles a dextrana (SAGE et al., 2014), fato que poderia explicar esse resultado. Uma explicação adicional, dada pelo responsável pelo equipamento Biacore da UNIFESP, Ricardo José Soares Torquato, prevê que: 1) sítios de ligação da IGBP-C ficam

indisponíveis por ela conter muitos resíduos do aminoácido lisina em sua estrutura (10% dos resíduos; lisina carrega grupo amina na cadeia lateral), permitindo que não somente o resíduo amino terminal se ligue à superfície do *chip*, como também outras regiões da proteína. Ou seja, a IGBP-C fica imobilizada por meio de várias regiões contendo aminas reativas e não somente uma, possivelmente impedindo o acesso das imunoglobulinas aos sítios de interação dessa proteína; 2) a IGBP-C, de aproximadamente 21 kDa, é oito vezes menor que a imunoglobulina (160 kDa), o que também possivelmente aumenta a acessibilidade das IgGs analitos às carboxilas da matriz em pontos não recobertos pela IGBP-C.

Em vista desses fatores, seguimos a recomendação do Sr. Torquato e optamos por inverter o delineamento do ensaio, onde as diferentes IgGs (ou seja, os diferentes alótípos de IgG1 e IgG2) passaram a ser os ligantes e a IGBP-C a ser o único analito. Essa inversão no delineamento aumentou muito o consumo do analito IGBP-C e não tínhamos certeza se a quantidade de rIGBP-C produzida em células de mamífero disponível no laboratório seria suficiente. Desse modo, em virtude dessa possível demanda e uma vez que o nosso grupo de pesquisa estava iniciando um grande ensaio de proteção de bovinos contra infestações por carrapatos com coquetel de antígenos que inclui a IGBP-C, foi encomendada mais rIGBP-C com outro prestador de serviços em quantidades que atendam aos dois propósitos.

Todavia, a quantidade da rIGBP-C produzida em célula de mamífero foi suficiente para todos os ensaios realizados em Biacore no presente estudo. Sendo assim, na **Figura 36**, encontra-se o SDS-PAGE 12%, corado com prata da rIGBP-C utilizada nas análises de interação e afinidade em Biacore.

Figura 36. IGBP-C recombinante utilizada como analito nos ensaios em Biacore. IGBP-C expressa em célula de mamífero e sintetizada por empresa especializada, submetida a SDS-PAGE 12%, posteriormente corado com prata.

Corroborando os resultados obtidos por ELISA, no ensaio feito em Biacore a IGBP-C também apresentou maior ligação (*binding*) pela subclasse IgG2 bovina quando os valores de RU (unidades de resposta de cada sensorgrama) foram comparados com os mesmos parâmetros obtidos para a IgG1. Além disso, o Biacore aferiu a afinidade de ligação entre essas mesmas moléculas e as constantes de dissociação em equilíbrio calculadas (KD) foram de $1,505 \times 10^{-6}$ M para IgG1 e $1,278 \times 10^{-6}$ M para IgG2, constante um pouco menor quando comparado a IgG1 (i.e., maior afinidade para IgG2). Nas **Figuras 37 e 38** encontram-se os sensorgramas correspondentes às análises de interação entre a IGBP-C e subclasses IgG1 e IgG2 bovina totais obtidas comercialmente (Bethyl), já na **Figura 39** segue a sobreposição e comparação entre os sensorgramas gerados para as duas subclasses, IgG1 e IgG2. Vale comentar que na **Figura 37** a curva correspondente a IGBP-C na concentração de 160 ug/mL provavelmente apresentou um formato atípico devido à entrada de bolha de ar contida no vial de diluição dessa amostra cujo conteúdo é posteriormente puxado por agulhas de injeção pelo equipamento.

Figura 37. Interação entre a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* e subclasse IgG1 bovina em Biacore. Ensaio de interação em Biacore T200 entre IGBP-C nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 80, 160 e 260 ug/mL, como analito, utilizando fluxo de 10 uL/minuto, tempo de contato de 100 segundos e subclasse IgG1 total, obtida comercialmente (Bethyl) imobilizada em *chip* CM5 a 10 ug/mL como ligante. Ensaio foi realizado a 37°C.

Figura 38. Interação entre a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* e subclasse IgG2 bovina em Biacore. Ensaio de interação em Biacore T200 entre IGBP-C nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 80, 160 e 260 ug/mL, como analito, utilizando fluxo de 10 uL/minuto, tempo de contato de 100 segundos e subclasse IgG2 total, obtida comercialmente (Bethyl) imobilizada em *chip* CM5 a 10 ug/mL como ligante. Ensaio foi realizado a 37°C.

Figura 39. Interação entre a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* e subclasses de IgG1 e IgG2 bovina em Biacore. Sobreposição dos sensorgramas do ensaio de interação em Biacore T200 entre IGBP-C nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 80, 160 e 260 ug/mL, como analito, utilizando fluxo de 10 uL/minuto, tempo de contato de 100 segundos e subclasses IgG1 e 2 totais, obtidas comercialmente (Bethyl) imobilizadas em *chip* CM5 a 10 ug/mL como ligantes. Ensaios foi realizado a 37°C.

As **Figuras 40 e 41** apresentam os sensorgramas das análises de interação feitas entre a IGBP-C e os principais alótipos de IgG1 e IgG2 purificados de bovinos HPB. É possível observar que, assim como ocorreu nos ensaios anteriores, a IGBP-C continuou apresentando maior ligação (*binding*), e maior afinidade por IgG2 bovina, no caso, o alótipo de IgG2 mais frequente na população de bovinos HPB aqui estudada com $KD\ 4,386 \times 10^{-11}\ M$ e, portanto, 5 vezes menor em relação ao alótipo de IgG1 desses animais ($KD\ 2,284 \times 10^{-7}\ M$) - justificando a maior afinidade pelo alótipo de IgG2. A diferença de ligação (*binding*) é visível quando os sensorgramas das duas corridas são sobrepostos (**Figura 42**).

Figura 40. Interação entre a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* e o alótipo de IgG1 mais frequente em bovinos HPB em Biacore. Ensaio de interação em Biacore entre IGBP-C nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 80, 160 e 260 ug/mL, como analito, utilizando fluxo de 10 uL/minuto, tempo de contato de 100 segundos e o alótipo de IgG1 mais frequente em bovinos HPB (IgG1 anti-DNP), imobilizado em *chip* CM5 a 10 ug/mL como ligante. Ensaio foi realizado a 37°C.

Figura 41. Interação entre a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* e o alótipo de IgG2 mais frequente em bovinos HPB em Biacore. Ensaio de interação em Biacore entre IGBP-C nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 80, 160 e 260 ug/mL, como analito, utilizando fluxo de 10 uL/minuto, tempo de contato de 100 segundos e o alótipo de IgG2 mais frequente em bovinos HPB (IgG2 anti-DNP), imobilizado em *chip* CM5 a 10 ug/mL como ligante. Ensaio foi realizado a 37°C.

Figura 42. Interação entre a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* e alótipes de IgG1 e IgG2 mais frequentes em bovinos HPB em Biacore. Sobreposição dos sensorgramas do ensaio de interação em Biacore T200 entre IGBP-C nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 80, 160 e 260 ug/mL, como analito, utilizando fluxo de 10 uL/minuto, tempo de contato de 100 segundos e os alótipes de IgG1 e 2 mais frequentes em bovinos HPB (IgG1 e 2 anti-DNP), imobilizados em *chip* CM5 a 10 ug/mL como ligantes. Ensaio foi realizado a 37°C.

Finalmente, quando analisamos a interação da IGBP-C agora pelos alótipos de IgG1 e IgG2 mais frequentes em Nelore, como já era esperado, houve uma maior ligação (*binding*) e afinidade (mesmo com uma diferença bem discreta) da IGBP-C pelo alótipo de IgG2 (KD $1,142 \times 10^{-6}$ M) em relação ao alótipo de IgG1 desses animais (KD $1,112 \times 10^{-6}$ M); **Figuras 44 e 43** respectivamente e as sobreposição dos sensorgramas, apresentada na **Figura 45**.

Para a nossa surpresa, frente aos resultados obtidos até aqui, a IGBP-C apresentou uma ligação (*binding*) cerca de 20 vezes maior tanto com os alótipos de IgG1 como IgG2 do bovino resistente a carrapato (Nelore), em relação aos alótipos de IgG1 e 2 mais frequentes em bovinos HPB, animais suscetíveis, apesar dos valores de KD serem menores (i.e., maior afinidade de ligação) tanto para o alótipo de IgG1 (KD $2,284 \times 10^{-7}$ M) como para o alótipo de IgG2 de HPB (KD $4,386 \times 10^{-11}$ M), sendo esse último parâmetro bem mais evidente.

Figura 43. Interação entre a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* e o alótipo de IgG1 mais frequente em bovinos Nelore em Biacore. Ensaio de interação em Biacore entre IGBP-C nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 80, 160 e 260 µg/mL, como analito, utilizando fluxo de 10 µL/minuto, tempo de contato de 100 segundos e o alótipo de IgG1 mais frequente em bovinos Nelore (IgG1 anti-DNP), imobilizado em *chip* CM5 a 10 µg/mL como ligante. Ensaio foi realizado a 37°C.

Figura 44. Interação entre a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* e o alótipo de IgG2 mais frequente em bovinos Nelore em Biacore. Ensaio de interação em Biacore entre IGBP-C nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 80, 160 e 260 ug/mL, como analito, utilizando fluxo de 10 uL/minuto, tempo de contato de 100 segundos e o alótipo de IgG2 mais frequente em bovinos Nelore (IgG2 anti-DNP), imobilizado em *chip* CM5 a 10 ug/mL como ligante. Ensaio foi realizado a 37°C.

Figura 45. Interação entre a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* e alótipos de IgG1 e IgG2 mais frequentes em bovinos Nelore em Biacore. Sobreposição dos sensorgramas do ensaio de interação em Biacore T200 entre IGBP-C nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 80, 160 e 260 ug/mL, como analito, utilizando fluxo de 10 uL/minuto, tempo de contato de 100 segundos e os alótipos de IgG1 e 2 mais frequentes em bovinos nelore (IgG1 e 2 anti-DNP), imobilizados em *chip* CM5 a 10 ug/mL como ligantes. Ensaio foi realizado a 37°C.

4.8 IGBP-C de *R. microplus* se liga na região Fc da IgG de bovinos

A identificação do local de ligação da IGBP-C do carrapato *R. microplus* na IgG de bovinos foi também realizada por meio de ensaio em Biacore.

Como ligantes, foram imobilizados fragmentos Fc, Fab e F(ab')₂ de IgG bovina obtidos comercialmente (Rockland), nas concentrações de 10 ug/mL, 10 ug/mL e 20 ug/mL, respectivamente; o analito rIGBP-C foi empregado nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 160 e 260 ug/mL.

Como podemos ver na **Figura 46**, a proteína do carrapato apresentou maior ligação (*binding*) pelo fragmento Fc quando comparado com os demais fragmentos analisados, Fab e com F(ab)₂, o qual não houve *binding*. Porém, com afinidade de ligação um pouco menor (KD 1.91x10⁻⁸ M) que aquela observada pelo fragmento Fab (KD 6.911x10⁻⁹ M) da IgG.

Figura 46. Interação entre a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* e fragmentos Fc, Fab e F(ab')₂ de IgG bovina em Biacore. Ensaio de interação em Biacore entre IGBP-C nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 80, 160 e 260 ug/mL, como analitos, utilizando fluxo de 20 uL/minuto, tempo de contato de 65 segundos e como ligantes, foram imobilizados fragmentos Fc, Fab e F(ab')₂ de IgG bovina purificados comercialmente (Rockland), nas concentrações de 10 ug/mL, 10 ug/mL e 20 ug/mL, respectivamente. Ensaio foi realizado a 37°C.

4.9 IGBP-C está presente na glândula salivar de carrapatos *R. microplus* machos

Bovinos da raça HPB, mantidos em piquete localizado no Biotério Central da FMRP-USP, foram submetidos a infestações artificiais por meio de câmaras de infestação contendo aproximadamente 10 mil larvas não alimentadas de *R. microplus*, provindas da colônia de carrapatos do Laboratório de Imunoparasitologia da FMRP-USP onde os carrapatos foram

mantidos em estufa incubadora B.O.D (Tecnal, Piracicaba, Brasil) em condições ideais de temperatura, umidade e fotoperíodo.

Nas **Figuras 47 e 48**, seguem fotos representativas da colônia de carrapatos, bem como da infestação artificial de bovinos HPB por meio de câmaras de infestação, respectivamente.

Figura 47. Colônia de carrapatos da espécie *R. microplus*. Carrapatos, coletados na região de Ribeirão Preto-SP, mantidos em estufa incubadora B.O.D (Tecnal, Piracicaba, Brasil) em condições ideais de temperatura, umidade e fotoperíodo.

Figura 48. Infestação artificial por carrapatos *R. microplus* em bovino HPB. Animal mantido em piquete localizado no Biotério Central da Faculdade, com câmara de infestação colada na região do flanco contendo aproximadamente 10 mil larvas não alimentadas de *R. microplus*.

A dissecação dos pares de glândulas salivares (em média 100 pares) foi feita a partir de carrapatos machos coletados no décimo quinto dia de infestação. A extração da glândula foi feita em PBS estéril com auxílio de lupa (Figura 49).

Figura 49. Dissecação da glândula salivar de carrapatos machos *R. microplus*. A extração dos pares de glândula salivar foi feita em PBS estéril com auxílio de material cirúrgico também estéril em lupa. Imagem com aumento de 2,5X. Setas vermelhas indicam a glândula salivar dissecada.

O material dissecado foi mantido em PBS com inibidor de protease a 20% e armazenado a -20°C . Posteriormente, para a obtenção do extrato, o material foi submetido a ciclos alternados de sonicação e congelamento/descongelamento.

Para a confirmação da presença da IGBP-C nativa em extrato de glândula salivar de carrapatos *R. microplus* machos, foi feita a imunização de galinhas poedeiras com rIGBP-C e purificação de anticorpos IgY policlonais anti-rIGBP-C a partir da gema do ovo (Figura 50).

Figura 50. Galinhas que foram imunizadas para a produção de IgY anti-rIGBP-C. Os animais foram mantidos em baia localizada no Biotério Central da Faculdade. Na figura, o comedouro contendo ração *ad libitum* e feno forrando a baia com a finalidade de minimizar o estresse obtido com o transporte e mudança de ambiente.

Na **Figura 51**, é confirmada a capacidade do anticorpo produzido reconhecer a IGBP-C recombinante, por meio de *western blot*, com anticorpo secundário IgG de cabra anti IgY-HRP (Abcam). Finalmente, a **Figura 52** apresenta a identificação da IGBP-C nativa em extrato de glândula salivar de carrapatos machos *R. microplus*.

Figura 51. Reconhecimento da IGBP-C por anticorpo IgY policlonal. IGBP-C expressa em *E.coli*, incubada com IgY anti recIGBP-C na diluição 1:500 e em seguida, com IgG de cabra anti IgY-HRP (Abcam) na diluição 1:5.000. IGBP-C recombinante (17,4 kDa + 3 kDa 6xHis-tag N-terminal) está indicada na figura.

Figura 52. Presença da IGBP-C nativa em extrato de glândula salivar de carrapatos *R. microplus* machos. IGBP-C expressa em *E.coli*, incubada com IgY anti recIGBP-C na diluição 1:500 e em seguida, com IgG de cabra anti IgY-HRP (Abcam) na diluição 1:5.000. IGBP-C recombinante (17,4 kDa + 3 kDa 6xHis-tag N-terminal) e IGBP-C nativa estão indicadas na figura. EGSM: extrato de glândula salivar de carrapatos macho (com aproximadamente 17,0kDa).

4.10 Apesar de não possuir atividade lectínica, a IGBP-C se liga fracamente à heparina

O grupo de WANG e NUTTALL (1995b) não encontrou evidências que as IGBPs de carrapatos possuem atividade lectínica, no entanto, investigamos se a IGBP-C aqui estudada seria ou não uma lectina porque está documentado que o perfil de glicosilação da porção Fc das imunoglobulinas difere de acordo com estágios clínicos de infecções por diferentes patógenos (revisto em GARDINASSI et al., 2014). Ressaltamos que ensaios realizados em Biacore confirmam que a IGBP-C de *R. microplus* se liga à porção Fc da IgG.

Inicialmente, para a investigação de comportamento lectínico pela IGBP-C (proteína com perfil eletroforético presente na **Figura Suplementar 3**), foi feito teste de hemaglutinação com diferentes diluições dessa proteína adicionadas de suspensão de hemácias a 2% - preparada com sangue humano O Rh⁺, A⁺, B⁺. AB⁺, bovino, coelho, carneiro, cobaia e cavalo. Entretanto, as leituras da aglutinação das hemácias realizadas visualmente, após 60 e 90 minutos em temperatura ambiente, indicaram que a IGBP-C não possuiu atividade hemaglutinante com nenhuma das soluções de hemácias testadas (dados aqui não mostrados). Apenas no controle positivo (jacalina) foi possível observar a presença de hemaglutinação.

Mesmo com o resultado negativo obtido pelo teste de hemaglutinação, seguimos adiante com mais experimentos que investigassem a possível ação lectínica da IGBP-C, uma vez que no caso de proteínas serem monovalentes (ou seja, possuírem apenas um único sítio de ligação a carboidrato), não existe atividade hemaglutinante, mesmo sendo uma lectina. Assim, investigamos se talvez esse não era o caso da IGBP-C.

Desse modo, por meio de Biacore fez-se a verificação da presença de ligação (*binding*) pela IGBP-C (no papel de ligante) com diferentes açúcares e glicosaminoglicanos (como analitos) nas concentrações de 20 e 200 mM. A relação de todos os analitos encontra-se na **Tabela Suplementar 3**. Como resultado, dentre os analitos testados, apenas com a heparina houve indício de *binding* pela IGBP-C, confirmada posteriormente pela análise em um chip sensor SA (streptoavidina) com heparina biotinizada imobilizada (10 ug/mL) e IGBP-C como analito nas concentrações de 30, 60, 100, 300, 600 e 1000 ug/mL (os sensorgramas negativos não foram aqui mostrados). Na **Figura 53**, segue a análise de interação entre a heparina imobilizada e diferentes concentrações da IGBP-C.

Figura 53. Ligação da IGBP-C com a heparina por meio de ensaio em Biacore. A análise de interação em equipamento Biacore T200 foi feita utilizando chip sensor SA (streptoavidina) com heparina biotinilada imobilizada a 10 µg/mL e IGBP-C nas concentrações de 30, 60 (duplicata), 100, 300, 600 e 1000 µg/mL, como analito. Taxa de fluxo 10 µL/minutos e tempo de contato de 100 segundos.

A fim de confirmarmos e melhor analisarmos a natureza de interação entre a IGBP-C e a heparina também realizamos ensaio por espectroscopia de fluorescência e por meio de cromatografia de afinidade em coluna de heparina–Sephadex.

Por espectroscopia de fluorescência foi possível observar que houve interação entre a IGBP-C (1 µM) e a heparina (adicionada nas concentrações de 0,26 mM, 2,6 mM e 5,0 mM), e que essa ligação provocou a diminuição da fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano presentes em sua estrutura (**Figura 54**). A variação da emissão de fluorescência intrínseca ΔF ($F - F_0$) dos resíduos de triptofano da IGBP-C (1 µM) em função da concentração de heparina 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 e 0,3125 mM está representada na **Figura 55**.

Contudo, ao avaliarmos a força da interação entre IGBP-C e a heparina por meio de cromatografia de afinidade em coluna de heparina-Sephadex, com eluição utilizando tampão Hepes com diferentes concentrações de NaCl observamos, conforme pode ser visto na **Figura 56**, que 100 mM de NaCl (uma força iônica baixa) já foi suficiente para provocar o desligamento quase que total da IGBP-C à heparina presente na coluna.

O K_D calculado foi de $7,9 \times 10^{-1}$ M, bem maior que o já descrito na ligação entre heparina e a antitrombina humana ($2,085 \times 10^{-7}$ M), por exemplo (um ligante já conhecido da heparina). O K_D representa a constante de dissociação em equilíbrio para determinada interação molécula-molécula, assim, um valor mais baixo de K_D indica uma interação de maior afinidade e, vice-versa. Assim sendo, apesar de existir uma interação entre a IGBP-C e a heparina, a afinidade dessa ligação é baixa.

Figura 54. Análise da interação entre IGBP-C do carrapato *R. microplus* e a heparina por Espectroscopia de Fluorescência. A fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano da IGBP-C foi monitorada em PBS, a 37°C, pela mensuração da emissão de fluorescência intrínseca entre 310 – 400 nm, após excitação a $\lambda_{ex} = 295$ nm na ausência ou presença de diferentes concentrações de heparina (0.26 mM, 2.6 mM e 5.0 mM). A ligação da IGBP-C à heparina induziu uma diminuição da fluorescência intrínseca da proteína.

Figura 55. Variação da emissão de fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano da IGBP-C de *R. microplus* em função da concentração de heparina. ΔF ($F-F_0$) dos resíduos de triptofano da IGBP-C (1 μM) de *R. microplus*, em função das diferentes concentrações de heparina (4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 μM). A leitura foi feita em espectrofluorômetro, utilizando comprimento de onda de 295 nm de excitação e 343 nm.

Figura 56. Análise da força de interação entre a IGBP-C de *R. microplus* e a heparina por meio de cromatografia de afinidade em coluna de heparina-Sepharose. Utilizou-se coluna conjugada com 1 mL de resina heparina-Sepharose (GE healthcare) e após a passagem de 1 mL da IGBP-C (1 μM) foi feita a eluição com tampão Hepes 100 mM com NaCl nas concentrações de 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mM. A leitura das frações purificadas foi feita em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 280 nm.

4.11 IGBP-C modula negativamente o processo de angiogênese

Pesquisas envolvendo diferentes espécies de carrapatos (FRANCISCHETTI, MATHER e RIBEIRO, 2005; ISLAM et al., 2009), inclusive, mais recentemente o *R. microplus* (SOARES et al., 2016), vêm mostrando que proteínas salivares desses ectoparasitas podem modular a angiogênese do hospedeiro.

Assim, resolvemos investigar se a IGBP-C de *R. microplus* afetaria a angiogênese. De maneira surpreendente, ensaios de angiogênese *in vitro* com células endoteliais de aorta de coelho sobre Matrigel mostraram que, quando tratadas com apenas 7 uM da rIGBP-C (**vide perfil eletroforético da proteína recombinante na Figura Suplementar 3**) ocorreu inibição clara e evidente da formação de vaso sanguíneo em relação ao controle (**Figura 57**). Destaca-se, ainda, o fato da inibição pela IGBP-C não ser devido a um possível efeito citotóxico, uma vez que as células endoteliais apresentadas na figura estão com morfologia normal. Significa, portanto, que essa proteína interferiu de fato no processo de neovasculogênese por algum mecanismo ainda desconhecido mas que está sendo melhor investigado pelo nosso grupo de pesquisa juntamente com a equipe do Professor Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol, da UNIFESP-SP.

Figura 57. IGBP-C de *R. microplus* inibe a formação de tubos capilares de células endoteliais em Matrigel. O ensaio de angiogênese *in vitro* sobre Matrigel foi realizado com células endoteliais (derivadas da aorta de coelho) expostas a 7 µM de IGBP-C. O tratamento foi realizado em triplicata. (A) A formação do tubo foi examinada sob um microscópio de luz invertida com ampliação de 100x. (B) O número de vasos e estruturas tubulares sobre o Matrigel foi medido e determinado usando análise da imagem por *software*. Controle: grupo sem tratamento.

4.12 IGBP-C modula negativamente a atividade da via clássica do sistema complemento

Moléculas salivares de carrapatos são capazes de inibir o sistema complemento (RIBEIRO, 1987; OLIVER et al., 1993; VALENZUELA et al., 2000; TYSON, ELKINS e DE SILVA, 2008; SCHROEDER et al., 2009), dentre elas, as recentemente descritas na saliva de *R. appendiculatus* e *R. microplus* (JORE et al., 2016; SILVA et al., 2016).

Desse modo, o papel da IGBP-C em modular, ou não, a ativação da via clássica do sistema complemento (possivelmente de forma indireta, pela interação com a porção Fc da imunoglobulina e impedimento da ligação de C1q nesse local), foi investigada, já que por Biacore confirmamos a porção Fc da IgG como o local de interação dessa proteína.

Para os ensaios hemolíticos da via clássica foram utilizados volume final de 200 µL (ensaio estático) ou 240 uL (ensaio cinético) com o volume total de tampão CFD contendo até 0,9; 4,5; 9,0 ou 45,0 uL de IGBP recombinante (nas concentrações finais de 4,5; 22,5; 45,0 ou 225 ug/mL, respectivamente), somente 62,5 ug/mL de IGBP-C, ou adição de PBS nos volumes correspondentes (vide protocolo completo na seção de Material e Métodos).

Após a adição de soro humano e da solução de eritrócitos-anticorpo aos ensaios e a reação foi incubada a 37°C durante 30 minutos (ensaio hemolítico estático) para posterior continuação e leitura do sobrenadante resultante a 412 nm em espectrofotômetro, ou então, fez-se reação instantânea, não havendo o período de incubação anterior a leitura (ensaio hemolítico cinético).

A **Figura 58 A** apresenta resultados do ensaio hemolítico estático: ocorreu inibição da atividade da via clássica do complemento em relação ao controle não tratado com as diferentes concentrações de IGBP-C (expresso em (%)) inibição de hemólise). A interferência da IGBP-C no processo de ativação da via clássica foi bem evidente nas concentrações testadas, chegando a quase 90% de inibição no último ponto utilizado, com 225 ug/mL de IGBP-C.

A fim de tentar descartar a possibilidade da IGBP-C estar exibindo uma atividade anti-complementar direta e não por “competição” pelo sítio de ligação do C1q à porção Fc do anticorpo (ação propiciada pela incubação de 30 minutos, tempo talvez suficiente para a possível ocupação da IGBP-C na porção Fc e competição com C1q), foi também realizado o ensaio hemolítico cinético, cujos resultados estão apresentados na **Figura 58 B**. Mais uma vez, foi possível ver uma clara interferência da IGBP-C na atividade da via clássica do complemento, quando observamos no decorrer da cinética um atraso no tempo em que as amostras tratadas com IGBP-C (62,5 ug/mL) foram lisadas em relação ao controle não

tratado. O tempo médio ($t_{1/2}$) para lise de 50% das hemácias nas reações tratadas ou não com a IGBP-C está na **Figura Suplementar 4**.

Figura 58. IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* modula a atividade da via clássica do sistema complemento. Um volume total de 200 μ L (A) ou 240 μ L (B) foram utilizados para os ensaios hemolíticos. Adicionou-se solução de eritrócitos-anticorpo e soro humano para avaliar os efeitos da IGBP-C no processo de hemólise para a via clássica do complemento. Em (A), ensaio hemolítico estático, onde diferentes concentrações da IGBP-C foram testadas (4,5; 22,5; 45,0 ou 225 μ g/mL). A inibição da atividade do complemento foi expressa em (%) de inibição de hemólise. Em (B), ensaio hemolítico cinético, com amostras tratadas com IGBP-C (62,5 μ g/mL) – vermelho, ou o volume correspondente da proteína em PBS - azul, e amostras sem tratamento (controle positivo da reação) – preto. O tempo médio ($t_{1/2}$) para lise de 50% das hemácias nas reações tratadas ou não com a IGBP-C, foi calculado e está na **Figura Suplementar 4**.

Com os resultados obtidos, torna-se claro que IGBP-C modula negativamente a atividade da via clássica do complemento, sendo um mecanismo adicional dessa proteína na evasão da resposta imune do hospedeiro. Entretanto, torna-se necessária uma investigação mais criteriosa da possível atividade anticomplementar direta da IGBP-C em proteínas que participam da cascata de ativação da via clássica.

4.13 Modelo da IGBP-C de *R. microplus*

Por fim, para uma melhor compreensão da função do IGBP-C, conseguimos fazer a modelagem por homologia desta proteína utilizando o *software* Modeller e posterior visualização pelo *software* Pymol, a fim de entendermos os possíveis sítios de interação presentes em sua superfície.

Figura 59. Composição atômica do modelo prospoto para a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus*. Foi feita modelagem por homologia da IGBP-C de *R. microplus* pelo *software* Modeller e visualização pelo *software* Pymol. Na figura, segue a composição atômica. Estruturas em azul: átomos de nitrogênio, vermelho: oxigênio, amarelo: enxofre e em branco: hidrogênio.

Figura 60. Composição de alfa hélices e folhas beta no modelo prospoto para a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus*. Foi feita modelagem por homologia da IGBP-C de *R. microplus* pelo *software* Modeller e visualização pelo *software* Pymol. Na figura, segue a composição de alfa hélice e folhas beta. Estruturas em formato de seta: folhas beta e em formato de cordão: alfa hélices.

Figura 61. Potencial eletrostático do modelo proposto para a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus*. Foi feita modelagem por homologia da IGBP-C de *R. microplus* pelo *software* Modeller e visualização pelo *software* Pymol. Na figura, o potencial eletrostático. Estruturas em azul: carga positiva, em vermelho: carga negativa e em branco: carga neutra.

Para validação do modelo gerado, por meio do programa PROCHECK foi feita análise em gráfico de Ramachandran. Na cadeia polipeptídica a definição do enovelamento da proteína depende dos ângulos de torção anterior ao carbono alfa, chamado de ângulo Φ (phi), e do ângulo de torção após o carbono alfa, chamado ângulo Ψ (psi).

Assim, o gráfico de Ramachandran por meio de um diagrama bidimensional, pela análise da rotação desses ângulos, identifica e aponta as regiões permitidas para determinados resíduos de aminoácidos, onde não há choques entre os átomos, e regiões não-permitidas, onde há choque entre os átomos. Nas **Figuras 62 e 63**, podemos observar que 94% dos resíduos de aminoácidos presentes no modelo proposto para a IGBP-C, estão distribuídos em regiões ditas como “favorecidas”. Essa porcentagem de resíduos distribuídos em locais “favorecidos” é representativa e demonstra a qualidade do modelo proposto para a IGBP-C de *R. microplus*.

Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 141 (94.0%)
 Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 6 (4.0%)
 Number of residues in outlier region : 3 (2.0%)

Figura 62. Validação do modelo proposto para a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* pelo gráfico de Ramachandran.

Figura 63. Validação do modelo proposto para a IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* pelo gráfico de Ramachandran, representação adicional.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Conforme revisado por NUTTALL (1998), RIBEIRO (1989) e WIKEL (1996), o sucesso da infestação por carrapatos é mediado por interações moleculares resultantes da coevolução carrapato-hospedeiro. Entre os bovinos existem raças resistentes (animais da subespécie *Bos taurus indicus*, zebuínos) e suscetíveis (animais da subespécie *B. t. taurus*, taurinos) ao carrapato *Rhipicephalus microplus*, conhecido como o carrapato do boi, sendo que o cruzamento entre esses dois grupos (raças taurinas e zebuínas) resulta em níveis variados de resistência, indicando que essa característica possui uma base hereditária e poligênica (BLANKENSHIP; MAY; HEDGECOCK, 2002).

Na espécie bovina (MAZENGERA et al., 1985), assim como em humanos, já é bem documentado que níveis de IgG2 são altamente herdáveis (OXELIUS, 1993) e que a distribuição dos alótipos de IgG2 (IgG2a e IgG2b) difere significativamente entre raças taurinas e zebuínas (KACSKOVICS et al., 1995; CARVALHO et al., 2011). Além disso, os níveis de imunoglobulinas totais diferem significativamente entre raças zebuínas e taurinas (REHAV, 1987; GARCIA et al., 2017). Desencadeando por sua vez, uma imunorreação que danifica as células desse parasita, prejudicando o seu repasto sanguíneo (SINGH; GIRSCHICK, 2003).

Adicionalmente, já foi visto que a transferência passiva de plasma de animais resistentes para hospedeiros suscetíveis a carrapatos conferiu proteção e resistência ao desafio com infestações posteriores (TRAGER, 1939a; b; ROBERTS e KERR, 1976). Esse achado sugere, portanto, que entre os genes envolvidos na resistência a carrapatos, encontram-se aqueles codificantes para imunoglobulinas.

No presente trabalho, por meio do sequenciamento dos genes codificantes para a região CH1-CH3 de IgG1 e IgG2, encontramos SNPs que geram cinco haplótipos distintos de IgG1, sendo dois deles exclusivos de bovinos Nelore (zebuínos) e dois de bovinos da raça Holandesa – HPB (taurinos). Já para IgG2, dos cinco haplótipos descritos, um foi encontrado exclusivamente em Nelores e dois em bovinos HPB. Este estudo também corroborou os dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (CARVALHO et al., 2011) em relação a haplótipos e respectiva distribuição nas diferentes raças.

Em consonância com nossa hipótese, observamos que os haplótipos de IgG1 e IgG2 mais frequentes na população de animais suscetíveis a carrapato aqui estudada (HPB) estão associados significativamente ao escore 4 de infestação. O escore 4 representa o nível máximo de infestação a carrapato de acordo com o método utilizado nesse estudo. A carga de

carrapatos nos animais apresentava-se menor quando os haplótipos em questão estavam em heterozigose nos hospedeiros e menor ainda quando estavam ausentes. Os principais haplótipos de IgG1 e IgG2 em bovinos HPB foram representados pelos resíduos de aminoácidos “TIP” e “SPNH” (esse último, codificante para o alótipo IgG2a), correspondentes aos SNPs encontrados na região de dobradiça.

O contrário foi verificado para os haplótipos mais frequentes na raça Nelore (bovinos resistentes a carrapato), quando avaliamos os fenótipos de infestação em HPB. Haplótipos “RDP” de IgG1 (que, apesar de não ser o haplótipo mais frequente, está mais presente em Nelore) e “IHP” de IgG2 (que codifica o alótipo IgG2b), quando em homozigose, estão associados a escores de infestação mínimos, que aumentam quando esses haplotipos estão em heterozigose ou ausentes nos bovinos.

Desse modo, os resultados obtidos com as análises de alo-haplótipos de IgG2 bovina e fenótipos de infestação sobrelevam mais uma vez os dados relatados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (CARVALHO et al., 2011). Além disso, a associação de alo-haplótipos de IgG1 de bovinos com cargas de carrapatos foi observada pela primeira vez neste estudo.

É importante salientar que durante a análise da frequência dos haplótipos de IgG1 na população de bovinos estudada (raças Nelore e HPB) nos chamou a atenção o fato desses animais apresentarem numerosos InDel (inserções e deleções) na região de dobradiça. Além disso, outro achado importante foi que cerca de 95% dos bovinos Nelore eram heterozigotos para os alótipos de IgG1 (lembrando que o gene da IgG é expresso em co-dominância mendeliana).

É digno de nota que a estrutura genética das cadeias pesadas gama de imunoglobulinas de artiodáctilos (ordem de animais biungulados, em que se incluem os bovinos) difere da de outros mamíferos e por isso, apresentam estratégias distintas para geração de repertórios variáveis de imunoglobulinas.

Relatos sobre a estrutura de imunoglobulinas com cadeia gama e sobre a organização de genes de cadeia gama dos camelídeos (pertencentes à mesma subordem filogenética de bovinos), mostram que além de apresentarem IgGs tetraméricas convencionais, com duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, apresentam abundantes quantidades de IgGs que não possuem o primeiro domínio constante CH1 (ACHOUR et al., 2008; HAMERS-CASTERMAN et al., 1993). Isso decorre devido a uma mutação de ponto no exon codificante para o domínio CH1, acarretando a deleção de região que promoveria a formação de ponte dissulfeto entre a cadeia leve e pesada gama, bem como a aproximação dos dois tipos de

cadeia por cargas. Assim, ocorre a formação de cadeias pesadas gama homodiméricas que não possuem as cadeias leves.

Em bovinos curiosamente é descrito que no processo de geração de repertório de imunoglobulinas contribui a heterogeneidade de tamanho de CDR3H ultralongo (9 a 56 codons) e ainda mutações somáticas na ausência de exposição ao antígeno (SAINI; KAUSHIK, 2002). Dessa forma, uma vez que entre os Artiodactyla pelo menos *Bos taurus taurus* e todos os Camelidae têm estruturas de anticorpos e mecanismos para gerar repertórios de anticorpos que já são bem caracterizados e que diferem tanto do "convencional" visto em ratos e homens, seria um problema fascinante se *Bos indicus* acrescentasse um novo mecanismo. Esse fato poderia lançar luz sobre a evolução de Artiodactyla e também sobre as pressões seletivas para esses diferentes anticorpos e sobre seus alvos.

Vale comentar melhor, que bovinos apresentam relativamente poucos genes V e o CDR H3 (região hipervariável da cadeia pesada formador do sítio de ligação com antígenos e determinante de complementariedade estrutural dessa ligação) ser ultralongo, cerca de seis vezes maior que o tamanho do CDR correspondente em humanos e camundongos (BERENS, WYLIE e LOPEZ, 1997; SAINI et al., 1999, 2003; ZHAO, JACKSON e AITKEN, 2006). Apesar da limitação aparente do repertório de imunoglobulinas em bovinos e camelídeos, esses animais não apresentam nenhuma deficiência na imunidade humoral (revisado por WANG et al., 2013). Além disso, o repertório de imunoglobulinas nos bovinos é, na verdade, altamente diversificado.

O mecanismo que garante a compensação da diversidade do repertório de imunoglobulinas bovinas foi descrito recentemente por WANG e colaboradores (2013) que mostraram que o CDR codifica uma grande quantidade de resíduos de cisteínas, resultando em pontes dissulfeto formadas ao acaso com grande diversidade de dobramentos. Isso expande o processo de geração de diversidade e representa um novo paradigma para a formação da arquitetura estrutural de imunoglobulinas. Os autores sugerem ainda que anticorpos apresentando CDR H3 ultralongos cheios de botões protuberantes conseguiriam, por exemplo, acessar o interior de poros de membranas e sítios ativos de enzimas.

Sendo assim, os trabalhos descritos corroboram que o mecanismo de geração de repertório diverso, bem como a estrutura de IgGs de artiodáctilos difere do convencionalmente descrito para murinos e humanos. Assim, os indels encontrados em zebuínos sugerem que talvez outras características estruturais e mecanismos de geração de estruturas de imunoglobulinas e respectivas diversidades, podem estar presentes e operantes nesta subespécie (ou espécie) do gênero *Bos*. Cabe ainda ressaltarmos, que até o momento

todos os trabalhos envolvendo um estudo mais detalhado da genética de imunoglobulinas em bovinos foram realizados em animais taurinos e a maioria foca apenas a região variável.

Desse modo, o estudo inicial objetivando descrever a frequência de haplótipos de IgG1 bovina, tomou proporções maiores, uma vez que após análise das sequências obtidas em animais Nelore, a nossa hipótese é a de que podem existir também, diferenças na geração da região constante da imunoglobulina entre bovinos taurinos e zebuínos. Como informado na seção Material e Métodos, realizamos a alotipagem por meio de sequenciamento Sanger de *amplicons* da região de interesse (CH1-CH3). Entretanto, por causa da grande quantidade de InDels, do nível de heterozigosidade e por causa da baixa resolução do sequenciamento Sanger nesses casos, temos que partir para genotipagem por sequenciamento mais profundo (ou seja, que gere mais reads para aumentar a probabilidade de acerto de atribuição de bases) e assim, utilizarmos mais um meio de confirmarmos os genótipos aqui obtidos. Ressaltamos ainda que uma vez confirmados os genótipos, talvez encontremos haplótipos de IgG1 e 2 bovina anteriormente nunca descritos.

No caso, recorreremos ao sequenciamento de nova geração (NGS), em plataforma Illumina MiSeq. E como não acarreta em custo adicional, iremos abranger mais regiões codificantes das cadeias gama de IgGs bovinas. Essa estratégia não foi tão simples, já que as regiões flangeadoras de genes que codicam a região constante da cadeia pesada das subclasses de IgG bovina (IGHC1, IGH2 e IGH3) onde gostaríamos de colocar os iniciadores, se apresentavam incrivelmente homólogas, quando analisamos os genomas bovinos de *Bos taurus* nas regiões IGH. Foi onde descobrimos erros na montagem desses genes tanto no genoma depositado como Bos_taurus_UMD_3.1, quanto Btau_4.2, e em seguida, com pesquisas na literatura nos deparamos com um trabalho que também relata isso (NIKU et al., 2012).

Um colaborador nosso sequenciou o genoma de um Nelore e ao montar as regiões de IGH com grande cuidado, reassembleou os genomas bovinos de *Bos taurus* nas regiões IGH, também encontrando erros nos genomas de *Bos taurus* já depositados, provavelmente devido a grande homologia (confirmada em sua análise com o genoma de Nelore) entre as regiões que flanqueiam esses genes IGH. Graças ao seu trabalho, obtivemos as regiões flangeadoras de IGH1, IGH2 e IGH3 e com muito custo desenhamos primers específicos baseados neles, uma vez que IGH1 e IGH2, eram praticamente idênticas entre si. A confirmação para a especificidade dos iniciadores foi então realizada pelo sequenciamento de *amplicons* gerados por amplificação teste.

As amostras já foram amplificadas com os novos iniciadores desenhados e estão no momento, aguardando licença de exportação para a Universidade de Illinois onde serão sequenciadas. Os dados obtidos serão comparados com os genomas de oito bovinos da raça Nelore sequenciados pelo pesquisador da Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnológicos, nosso colaborador Dr. Alexandre Rodrigues Caetano, em conjunto com a Universidade de Yale (dados não publicados e em processo de anotação).

Outra investigação feita no presente trabalho e que também resultou em dados muito interessantes, foi a respeito do estudo da interação de alótipos de IgG1 e IgG2 bovina de raças geneticamente resistente e suscetível a carrapatos, com a proteína ligante de IgG (IGBP-C) da saliva do carrapato *R. microplus*.

Durante o repasto sanguíneo uma grande quantidade de imunoglobulinas do hospedeiro é ingerida pelo carrapato (revisto em GUDDERRA et al., 2002), e ainda permanecem com a atividade preservada na hemolinfa (VAZ JUNIOR IDA et al., 1996; JASINSKAS, JAWORSKI e BARBOUR, 2000). Desse modo, anticorpos específicos podem se ligar a antígenos expressos na superfície de órgãos internos como a glândula salivar ou ovário do carrapato (ACKERMAN et al., 1981). Assim, podem interferir com as funções fisiológicas normais desse parasita (BROWN e ASKENASE, 1986) ou mesmo neutralizar os componentes salivares que são inoculados na pele do hospedeiro, durante o repasto sanguíneo (RIBEIRO, 1995; WIKEL, 1996).

Em contrapartida, já é bem documentado que diversas espécies de carrapatos produzem e secretam proteínas ligantes de imunoglobulina G - IGBPs (WANG e NUTTALL, 1994, 1995a; GARCIA, 2013; GONG et al., 2014). WANG e NUTTALL (1994) sugeriram ser a secreção das IGBPs pelo carrapato uma forma de promover a depuração da imunoglobulina do hospedeiro via saliva durante a sua alimentação, representando um mecanismo de proteção contra os efeitos potencialmente nocivos das IgGs desse hospedeiro.

Como os carrapatos, diversos patógenos também produzem proteínas ligantes de IgG, as quais sabidamente se ligam de maneira não-imune pela região Fc (DE MIRANDA-SANTOS e CAMPOS-NETO, 1981; LANGONE, 1982) interferindo desse modo na ligação específica de anticorpos com o patógeno, na ativação do sistema complemento e no processo de fagocitose (LANGONE, 1982; WIDDERS, 1990). Ao mesmo tempo, pesquisas demonstram que de acordo com o alótipo de IgG existe associação com resistência a diferentes micróbios (KACSKOVICS et al., 1995; CORBEIL et al., 1997; GIHA et al., 2009).

Como já discutido, com base em resultados previamente obtidos pelo nosso grupo (CARVALHO et al., 2011) e de acordo com a associação que encontramos no presente

estudo, foi possível associar haplótipos de IgG1 e IgG2 que codificam para a região constante da cadeia pesada da IgG de bovinos aos diferentes fenótipos de infestação pelo carrapato *R. microplus*. Em conjunto, todos esses fatores justificaram a nossa iniciativa em estudar a natureza da interação entre uma IGBP presente na saliva do carrapato do boi, *R. microplus*, e os alótipos de IgG1 e 2 bovina (gerados pelos diferentes haplótipos) mais frequentes em raças suscetível e resistente a carrapato como é o caso de bovinos HPB e da raça Nelore, respectivamente. Optamos pela IGBP-C, uma IGBP abundantemente secretada pelo macho, face a importância já relatada de uma proteína homóloga a ela em outra espécie de carrapato no auxílio ao respasto sanguíneo realizado pelas fêmeas e no desfecho da infestação.

Nossos resultados iniciais obtidos por ELISA demonstraram que existe ligação diferencial da IGBP-C e as subclasses de IgG- IgG1 e 2 bovina totais, apresentando preferência de ligação à IgG2 quando comparado com IgG1. Dados em seguida confirmados por ensaio de Ressonância Plasmônica de Superfície – Biacore, técnica que além de avaliar a ligação, *binding*, em tempo real entre moléculas calcula a força de interação entre elas (afinidade). Pelo Biacore, vimos que a IGBP-C também possui afinidade maior de ligação pelos alótipos de IgG2 mais frequentes em ambas as raças bovinas estudadas, em relação aos alótipos de IgG1 presentes nesses animais.

Para a nossa surpresa, a proteína do carrapato interagiu mais com os alótipos de IgG1 e de IgG2 mais frequentes em bovinos Nelore, raça resistente a esse ectoparasita. Ao analisarmos os sensorgramas gerados, as unidades de respostas (RU), grandeza que representa as diferenças de massa presentes na superfície do *chip*, foi quase 20 vezes maior quando comparadas com os sensorgramas da interação com os alótipos dos bovinos suscetíveis a carrapato (HPB). *Bindings* com RU intermediários foram observados quando a IGBP-C interagiu com as subclasses de IgG - IgG1 e 2 bovina totais (Bethyl), provavelmente pelo fato de serem pool de anticorpos purificados a partir de bovinos que poderiam apresentar diferentes alótipos para essas subclasses.

Em relação as consequências funcionais da interação de um IGBP de patógeno ou parasita com as IgGs de seus hospedeiros, já foi constatado que a IGBP de *H. somnus*, um patógeno microbiano, liga-se mais ao alótipo de IgG presente em bovinos mais suscetíveis à doença causada pelo patógeno (revisto por CORBEIL, 2002). LEWIS e colaboradores (2008), em estudo feito com uma proteína ligante de IgG de *Streptococcus equi* subespécie *equi*, verificaram que, por se ligar à porção Fc da IgG4 e IgG7 de equinos, essa IGBP prejudica a ligação do C1q ao anticorpo impedindo a ativação da via clássica do complemento. Além disso, já foi determinado que IGBPs interferem nas funções efectoras da imunoglobulina do

hospedeiro por se ligarem de maneira não imune à porção Fc (LANGONE, 1982; WIDDERS, 1990). Neste estudo constatamos que, embora a IGBP-C do *R. microplus* liga-se a mais moléculas de IgG de alótipos mais frequentes nos bovinos resistentes a carrapatos, ela apresentou afinidade até seis vezes maior por alótipos de IgG dos bovinos que são suscetíveis.

Assim sendo, para entender melhor esse resultado aparentemente contraditório, colocamos aqui algumas características dos alótipos de IgG2 bovina que nos são conhecidas até o momento: 1) a frequência de haplótipos difere significativamente entre bovinos Nelore e HPB; 2) os diferentes haplótipos se associam significativamente com as diferentes cargas de carrapatos nos bovinos HPB; 3) a IgG2 foi a subclasse de IgG bovina à qual a IGBP-C de *R. microplus* apresentou maior afinidade; 4) em ensaios feitos com a IGBP-C em Biacore, o haplótipo de IgG2 mais frequente em Nelores apresentou *binding* (medido por RU) vinte vezes maior quando comparado com aquele observado com o haplótipo mais frequente de IgG2 em bovinos HPB; e, por fim, 5) ensaios feitos com a IGBP-C em Biacore mostraram, em contrapartida, que o haplótipo de IgG2 mais frequente em HPBs apresentou constantes de dissociação em equilíbrio seis vezes menores, ou seja maior afinidade para o IGBP-C, quando comparado com aquela constante obtida com o haplótipo mais frequente de IgG2 em bovinos Nelores, resistentes a carrapatos. Resultados similares foram obtidas para IgG1 bovina.

Conforme citamos na introdução desse estudo, IgG2 bovina é uma opsonina melhor que a IgG1 e também ativa a via clássica do complemento (MCGUIRE; MUSOKE; KURTTI, 1979). Nesse sentido, o alótipo IgG2b ativa o sistema complemento com cerca de duas vezes mais eficiência do que a IgG2a (BASTIDA-CORCUERA et al., 1999). É digno de nota que a ativação do sistema complemento, é deletério ao carrapato (WIKEL, 1996) e está envolvido no desenvolvimento da imunidade contra esse ectoparasita (WIKEL e ALLEN, 1977; WIKEL, 1979) e o alótipo de IgG2 mais frequente em bovinos zebuínos, resistentes a carrapatos (KACSKOVICS et al., 1995; CARVALHO et al., 2011) é o alótipo IgG2b.

Essas características sugerem, portanto, que um dos diversos mecanismos de resistência exercidos por zebuínos frente às infestações por carrapato envolve o sistema complemento e variantes genéticas das regiões constantes das IgG2s. A IGBP-C, apesar de ligar em mais moléculas de alótipo IgG2b, o faz com força menor, possivelmente permitindo mais disponibilidade de IgG2b para ativar o sistema complemento em bovinos resistentes (Nelores).

Desse modo, levando em consideração essas observações, acreditamos que o fato da IGBP-C de *R. microplus* se ligar com maior afinidade ao alótipo IgG2a em relação a IgG2b, justifica-se talvez por possivelmente ser um mecanismo selecionado no carrapato pelos

mesmos motivos que levaram bovinos zebuínos a selecionarem características que os auxiliem na resistência a esse parasita – evolução carrapato/hospedeiro (que se dá, portanto, dos dois lados). Diferente de bovinos *B. taurus*, em decorrência do carrapato *R. microplus* ser originado na Ásia, o gado *B. indicus*, foi domesticado em ambientes onde provavelmente a presença de *R. microplus* era endêmica (MACHUGH et al., 1997; BRADLEY et al., 1998; ESTRADA-PENA et al., 2006).

Sendo de suma importância destacar, que mesmo havendo uma tentativa aparente de escape e subversão da resposta imune do hospedeiro exercida pela IGBP-C secretada pelo carrapato *R. microplus* (nosso grupo inclusive já viu que essa proteína é mais produzida em carrapatos que se alimentam no hospedeiro resistente), bovinos zebuínos por possuírem como alótipo de IgG2 mais frequentemente expresso na sua população, o alótipo mais importante quanto a função efetora em processos que auxiliem na resistência, continuam sendo desse modo resistentes. Isso tudo, claro, resultante de todos os demais mecanismos físicos e imunológicos relatados que diferenciam bovinos zebuínos de taurinos.

Assim, por se ligar com uma afinidade menor em alótipos IgG2 de Nelore, em vista da importância supracitada da IgG2b, a porção Fc dessa IgG provavelmente pode ainda continuar disponível para o exercício de suas funções. Em contrapartida, em bovinos HPB, a IGBP por se ligar fortemente ao alótipo de IgG2 mais frequente (pelo menos, na população aqui estudada) e somado ao fato dela pertencer a subclasse de IgG que melhor ativa o complemento, (ainda que alguém da ativação observada pela IgG2b) em conjunto, parece-nos que o carrapato afeta substancialmente desse modo, o hospedeiro que já é suscetível por diversos mecanismos genéticos por ele apresentados.

Tendo em vista a importância do sistema complemento no processo de resistência ao carrapato, parasita que possui, por sua vez, moléculas de escape a essa resposta (JORE et al., 2016; SILVA et al., 2016), torna-se necessária uma investigação mais sistematizada da dosagem e atividade de fatores que compõem as cascatas do complemento em bovinos que apresentam fenótipos contrastantes de infestação. Somente assim teremos um panorama da real interferência provocada pela ligação da IGBP-C em alótipos de IgG sabidamente bons ativadores da via clássica, em competir pelo mesmo sítio que a molécula C1q.

Comprovamos que o sítio preferencial de interação da IGBP-C é na porção Fc da IgG de bovinos por meio da análise feita em Biacore de interação entre essa proteína e fragmentos de IgG bovina (Fc, Fab e F(ab')₂) obtidos comercialmente (Rockland). Nossos resultados demonstraram que a IGBP-C também se ligou ao fragmento Fab apesar de *binding* menor que o observado com o fragmento Fc (a afinidade parece ser um pouco maior na ligação com o

fragmento Fab). No entanto, como desconhecemos a especificidade do pool de IgGs bovinas que geraram esses fragmentos, daí o nosso cuidado em avaliarmos a interação da IGBP-C com anticorpos anti-DNP, assim, acreditamos que possivelmente a ligação observada entre IGBP-C e fragmentos Fab pode ser cognata, ou seja, pelo reconhecimento da Fab de bovinos que tenham entrado em contato com carrapato (já que em sua grande maioria são utilizados bovinos taurinos para a produção de imunobiológicos) à IGBP-C de *R. microplus*.

Apesar da região de dobradiça, localizada entre CH1 e CH3 e onde estão presentes a maior quantidade de SNPs que geram os alótipos de IgGs, estar presente também no fragmento F(ab')₂, no ensaio de interação desse fragmento com a IGBP-C não se detectou ligação. Contudo esse resultado não afasta a possibilidade de ocorrer interação de fato entre IGBP-C e a dobradiça das IgGs porque talvez essa interação dependa de uma certa estabilidade gerada pela carga e natureza química de resíduos de aminoácidos ali próximos, na região CH2, os quais estando ausentes na fração F(ab')₂ explicaria por que não registramos interação. Nesse domínio, SNPs também são encontrados e podem resultar em trocas de aminoácidos.

Em vista da ligação da IGBP-C ocorrer na região Fc das IgGs, somado ao fato de que diversos estudos mostraram que salivas e moléculas salivares de carrapatos inibem o sistema complemento (RIBEIRO, 1987; OLIVER et al., 1993; VALENZUELA et al., 2000; TYSON, ELKINS e DE SILVA, 2008; SCHROEDER et al., 2009; JORE et al., 2016), dentre eles que recentemente descreveu essa atividade na saliva de *R. microplus* (SILVA et al., 2016), passamos a verificar se a IGBP-C interfere na ativação da via clássica do sistema complemento.

Por meio de ensaios hemolíticos estáticos e cinéticos observamos que a IGBP-C inibiu a via clássica do sistema complemento de modo dependente da concentração de IGBP-C. Essa inibição possivelmente foi indireta por meio do bloqueio pelo IGBP-C da porção Fc da IgG que ocuparia o sítio de ligação do C1q na imunoglobulina. Como empregamos IgG de coelho anti-hemácia de carneiro nos ensaios hemolíticos para estudar a ativação da via clássica do complemento, avaliamos se a IgG de coelho liga-se a IGBP-C de *R. microplus* (dados não apresentados). Contudo, os ensaios no Biacore ainda precisam ser melhor padronizados porque havia TRIS na IgG de coelho de fonte comercial, composto que interfere nas interações proteína-proteína. Apesar dessa possibilidade, o papel anti-complementar direto da IGBP-C precisa ser avaliado estudando as interações entre as diferentes proteínas da cascata da via clássica e a IGBP-C do carrapato *R. microplus*.

Pesquisas envolvendo diferentes espécies de carrapatos (FRANCISCHETTI, MATHER e RIBEIRO, 2005; ISLAM et al., 2009 e inclusive, mais recentemente o *R. microplus* (SOARES et al., 2016), vêm mostrando que suas proteínas salivares podem modular a angiogênese do hospedeiro. A inibição da formação de vasos, prejudica por sua vez, a cicatrização de feridas e assim possibilita ao carrapato um repasto sanguíneo ininterrupto (SOARES et al., 2016). Dessa forma, outro papel possivelmente exercido pela IGBP-C de *R. microplus* seria o de também modular a angiogênese. Ao testar essa hipótese fomos surpreendidos por uma grande atividade modulatória da angiogênese mediada pela IGBP-C: a adição de apenas 7 μ M da IGBP-C foi suficiente para impedir 100% da formação de vasos por células endoteliais derivadas da aorta de coelho em relação ao controle experimental não tratado. Destaca-se, ainda, o fato da inibição pela IGBP-C não ser devido a um possível efeito citotóxico, uma vez que as células endoteliais visualizadas por microscópio parecem estar com morfologia normal. Essa proteína interfere, de fato, no processo de ativação da neovasculogênese por algum mecanismo ainda desconhecido, mas que está sendo melhor investigado pelo nosso grupo de pesquisa juntamente com a equipe do Professor Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol da UNIFESP-SP.

O perfil de glicosilação da porção Fc das imunoglobulinas afeta a resposta mediada por essas moléculas frente a diferentes patógenos (GARDINASSI et al., 2014; MEHTA et al., 2008; PAREKH et al., 1989). Em vista desse fato e por termos demonstrado que a IGBP-C de *R. microplus* se liga à porção Fc da IgG, também realizamos experimentos para investigar se a IGBP-C possui atividade lectínica. Contudo, corroborando os resultados do grupo de WANG e NUTTALL (1995b), concluímos que a IGBP-C não apresenta comportamento lectínico, mas se liga fracamente à heparina. A interação de glicosaminoglicanos do tipo heparina com diferentes proteínas, controlam diversos processos biológicos, tais como atividade do fator de crescimento, homeostase e adesão celular, bem como infecções parasitárias (DEL NERY et al., 1997). Mesmo assim, é possível que, por meio de impedimento estérico, os diferentes perfis de glicosilação de Fcs de IgGs interfiram em grau maior ou menor com a ligação da IGBP-C à região Fc. Tal hipótese deve ser testada.

Adicionalmente, alguns testes pilotos foram também feitos para verificar se a IGBP-C interfere no processo de coagulação, tendo em vista que a trombina é capaz de gerar C5 na ausência de C3 e que artrópodes hematófagos, incluindo os carrapatos, possuem moléculas que intereferem nos diferentes processos de hemostasia do hospedeiro (HORN; DOS SANTOS; TERMIGNONI, 2000; MANS et al., 1998; NIENABER; GASPAR; NEITZ, 1999)(MANS et al., 1998; NIENABER et al., 1999; HORN, DOS SANTOS, TERMIGNONI,

2000). Os resultados preliminares sugerem que, apesar de não interferir na via intrínseca e extrínseca da coagulação, a proteína do carrapato possivelmente prolongou o tempo de coagulação da trombina (dados não mostrados). A presença de moléculas com atividade de inibição da trombina já foi documentada em carrapatos (KOH et al., 2007). Essa hipótese será agora melhor investigada e os testes melhor padronizados com diferentes concentrações da IGBP-C em colaboração com a Dra Anita Mitico Tanaka Azevedo, do laboratório de herpetologia do Instituto Butantan.

Por fim, para um melhor entendimento das interações realizadas pela IGBP-C de *R. microplus*, também realizou-se com sucesso a modelagem por homologia dessa proteína de acordo com a sua composição atômica, potencial eletrostático e presença de alfa hélices e folhas beta em sua estrutura. Com o modelo proposto, foi possível observar que essa proteína apresenta um sulco em sua estrutura, possivelmente um sítio de ligação para as moléculas as quais ela interage, e assim como já sabíamos por meio de informação do ponto isoelétrico dessa proteína teórico ser alto, por volta de 9, vimos que ela é mais positivamente carregada, auxiliando dessa forma, na interação iônica (i.e. auxiliada regida pela atração de cargas opostas) com moléculas com cargas mais negativamente carregadas que a IGBP-C como é o caso, por exemplo, das imunoglobulinas que possuem pI por volta de 6,0 (GÓMES SILVA et al., 2004).

Em suma, o presente estudo abriu um vasto caminho da pesquisa sobre as proteínas ligantes de imunoglobulina G do carrapato *R. microplus*, mas ainda não bem caracterizadas devido à atividade multifatorial encontrada para IGBP-C em diferentes mecanismos de do carrapato frente à resposta imunológica do hospedeiro.

Nossos resultados também podem compor estudos aplicados como o de melhoramento genético de bovinos, justificado pela associação encontrada entre haplótipos de IgG e fenótipos de infestação a carrapato, assim como também sobrelevando a importância do potencial antígeno vacinal que a IGBP-C se faz, uma vez estudos feitos com imunizações de bovinos pelo nosso grupo, fora observado que essa proteína se apresentou como um dos melhores candidatos para estimular a reposta de anticorpos, além de estimular a produção de IgG1/IgG2 quando os animais estavam infestados, mostrando a indução de resposta imunológica de memória, re-estimulada com o antígenos presente na saliva do carrapato (MARUYAMA, 2012).

Finalmente, a IGBP-C de *R. microplus* talvez compor uma futura aplicação biotecnológica decorrente do seu papel em modular negativamente o processo de angiogênese e a atividade da via clássica do complemento. De maneira interessante, e em virtude dos sítios

de ligação do receptor Fc neonatal (FcRn) e IGBP-C (como descrito no presente estudo) às IgGs parecem ser os mesmos – porção Fc da imunoglobulina (LANGONE, 1982; MARTIN et al., 2001), talvez a IGBP-C possa também interferir na ligação entre as IgGs e o FcRn. Caso comprovada essa intervenção, poderá ter um grande potencial terapêutico na modulação da resposta imune humoral (face ao catabolismo e manutenção da meia vida de anticorpos IgG promovido pelo FcRn), afetando os níveis de IgGs totais ou antígenos específicas do hospedeiro, culminando desse modo, com os diferentes desfechos de infestações com carrapatos ou mesmo futuramente num estudo mais direcionado, no tratamento de doenças autoimunes humanas por aumentar o turnover de IgGs em bloquear e impedir a ligação delas ao FcRn.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- A frequência e distribuição de haplótipos codificantes para a região CH1-CH3 de IgG1 e IgG2 é diferente entre bovinos da raça Nelore (resistentes a carrapato) e HPB (suscetíveis a carrapato),
- Genótipos da região constante da cadeia pesada de IgG1 e 2 bovina estão associados a distintos fenótipos de infestação por carrapato *R. microplus*,
- A ligação da IGBP-C de *R. microplus* é maior na subclasse IgG2 que IgG1 bovina e apesar de se ligar mais em alótipos de IgG1 e IgG2 de Nelore (bovinos resistentes a carrapatos), se liga com maior afinidade em alótipos de IgG1 e IgG2 de HPB (bovinos suscetíveis a carrapatos),
- A IGBP-C de *R. microplus* se liga na região Fc da IgG de bovinos e está presente em extrato de glândula salivar de carrapatos *R. microplus* machos,
- Apesar de não possuir atividade lectínica a IGBP-C de *R. microplus* se liga fracamente à heparina,
- A IGBP-C de *R. microplus* modula negativamente o processo de angiogênese IGBP-C e a atividade da via clássica do sistema complemento.

Referências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., Lichtman, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABATEPAULO, A. R. R. **Imunobiologia das infestações de bovinos pelo carrapato *Boophilus microplus*: estudo dos correlatos histológicos e moleculares de resistência e de susceptibilidade**. 2007. (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ACHOUR, I. et al. Tetrameric and homodimeric camelid IgGs originate from the same IgH locus. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 3, p. 2001–9, 1 ago. 2008.

ACKERMAN, S. et al. Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis* (Say). **The Journal of parasitology**, v. 67, n. 5, p. 737–40, out. 1981.

ALMAZÁN, C. et al. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. **Vaccine**, v. 21, n. 13–14, p. 1492–501, 28 mar. 2003.

ALMAZÁN, C. et al. Identification and characterization of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p. 471–479, 27 jan. 2010.

AMBROSINO, D. M. et al. Correlation between G2m(n) immunoglobulin allotype and human antibody response and susceptibility to polysaccharide encapsulated bacteria. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, n. 6, p. 1935–1942, 1 jun. 1985.

BARCA, D.; OCHOA, J. L.; VALENCIA, M. E. Effect of the Extraction of a Hemagglutinin Nutritive Value of *Amaranthus leucocarpus* on the Seeds. v. 50, 1985.

BASTIDA-CORCUERA, F. D. et al. Differential complement activation by bovine IgG2 allotypes. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 71, n. 2, p. 115–23, 18 out. 1999.

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, p. 570–5, 2000.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida : Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, n. 1, p. 52–61, jul. 1974a.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). II. Influence of temperature, humidity and light. **Acarologia**, v. 16, n. 2, p. 251–7, out. 1974b.

BEN-YAKIR, D., FOX, C. J., HOMER, J. T. & BARKER, R. W. Quantification of host immunoglobulin in the hemolymph of ticks. **J. Parasitol.** 73, 669–71 (1987).

BERENS, S. J.; WYLIE, D. E.; LOPEZ, O. J. Use of a single VH family and long CDR3s in the variable region of cattle Ig heavy chains. **International immunology**, v. 9, n. 1, p. 189–99, jan. 1997.

BLAKESLEE, D.; BUTLER, J. E.; STONE, W. H. Serum antigens of cattle. II. Immunogenetics of two immunoglobulin allotypes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 107, n. 1, p. 227–35, jul. 1971.

BLANKENSHIP, S. M.; MAY, B.; HEDGECOCK, D. Evolution of a perfect simple sequence repeat locus in the context of its flanking sequence. **Molecular biology and evolution**, v. 19, n. 11, p. 1943–51, nov. 2002.

BRADLEY, D. G. et al. Genetics and domestic cattle origins. **Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews**, v. 6, n. 3, p. 79–86, 1998.

BROSSARD, M. [Immunologic relations between cattle and ticks, specifically between cattle and *Boophilus microplus*]. **Acta tropica**, v. 33, n. 1, p. 15–36, 1976.

BROWN, S. J.; ASKENASE, P. W. *Amblyomma americanum*: requirement for host Fc receptors in antibody-mediated acquired immune resistance to ticks. **Experimental parasitology**, v. 59, n. 2, p. 248–56, abr. 1985.

BROWN, S. J.; ASKENASE, P. W. *Amblyomma americanum*: physiochemical isolation of a protein derived from the tick salivary gland that is capable of inducing immune resistance in guinea pigs. **Experimental parasitology**, v. 62, n. 1, p. 40–50, ago. 1986.

BRUM, J. G. W., P. R. P. Costa, and P. B. Ribeiro. "Flutuação Sazonal de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) no município de Pelotas, RS." **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 39.6, 891-896, 1987.

CAMENISCH, G. et al. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1alpha. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 13, n. 1, p. 81–8, jan. 1999.

CARLANDER, D. **Avian IgY Antibody**. [s.l: s.n.].

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. 587–591, 2008.

CARVALHO, W. A. et al. Haplotypes of the bovine IgG2 heavy gamma chain in tick-resistant and tick-susceptible breeds of cattle. **Immunogenetics**, v. 63, n. 5, p. 319–324, 2011.

CHINZEI, Y.; MINOURA, H. Host immunoglobulin G titre and antibody activity in haemolymph of the tick, Ornithodoros moubata. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 1, n. 4, p. 409–416, out. 1987.

CORBEIL, L. B. et al. Bovine IgG2a antibodies to Haemophilus somnus and allotype expression. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire**, v. 61, n. 3, p. 207–13, jul. 1997.

CORBEIL, L. B. Antibodies as effectors. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 87, n. 3–4, p. 169–75, 10 set. 2002.

DE LA FUENTE, J. et al. Vaccination against ticks (Boophilus spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Genetic analysis : biomolecular engineering**, v. 15, n. 3–5, p. 143–8, nov. 1999.

DE MIRANDA-SANTOS, I. K.; CAMPOS-NETO, A. Receptor for immunoglobulin Fc on pathogenic but not on nonpathogenic protozoa of the Trypanosomatidae. **The Journal of experimental medicine**, v. 154, n. 6, p. 1732–42, 1 dez. 1981.

DEL NERY, E. et al. Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 41, p. 25713–8, 10 out. 1997.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 34–50, 15 jan. 2010.

ELSHIRE, R. J. et al. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e19379, 4 maio 2011.

EMBRAPA, 2000 (GADO DE CORTE-CNPGC). Carrapato-de-Boi: prejuízos e controle-Campo Grande, MS, dez. 2000 n°42 [online], 2000. Disponível em: <http://www.cnpgec.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD42.html>. Acesso em: 18 de novembro. 2011.

ESTRADA-PENÑA, 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, fev. 2006.

EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. ARLEQUIN (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evol Bioinform Online** 1:47–50, 2005.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175–85, mar. 1998.

FAO. **World Livestock 2011: Livestock in Food Security World**.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; N. MATHER, T.; RIBEIRO, J. M. C. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Thrombosis and Haemostasis**, 4 jun. 2005.

FRANZIN, A. M., BARIZON, G. C.; MORÉ, D. D.; MAIA, A. A. M.; BISHOP, R.; FERREIRA, B. R.; DE MIRANDA SANTOS, I. K. F. **Global gene expression profiling of bovine skin: insights into mechanisms of resistance to ticks**. Zaragoza: TTP7: Ticks and Tick-borne pathogens International Conference. 2011.

FRISCH, J. E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 1, p. 57-71–5, jan. 1999.

FURLONG, J.; CHAGAS, A. C. DE S.; NASCIMENTO, C. B. Comportamento e ecologia de larvas do carrapato *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 39, n. 4, p. 213–217, 2002.

FURLONG, J. Controle dos carrapatos dos bovinos na região sudeste do Brasil. **Caderno técnico da Escola de Veterinária-UFMG**, Belo Horizonte, v. 8, p. 49-61, 1993.

GARCIA, G.R.. Estudo do proteoma e imunoproteoma salivar do carrapato de bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, para identificação e caracterização de antígenos silenciosos. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada. 2013:241p.

GARDINASSI, L. G. et al. Clinical Severity of Visceral Leishmaniasis Is Associated with Changes N-glycosylation, Immunoglobulin G Fc. v. 5, n. 6, p. 1–12, 2014.

GASPARIN, G. et al. Mapping of quantitative trait loci controlling tick [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. **Animal Genetics**, v. 38, n. 5, p. 453–459, 10 ago. 2007.

GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVEY, R. B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**, v. 129 Suppl, p. S353-66, 2004.

GIHA, H. A. et al. Antigen-specific influence of GM/KM allotypes on IgG isotypes and association of GM allotypes with susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 306, 2009.

GODDARD, E. A.; BEATTY, D. W.; HOFFMAN, E. B. Immunoglobulin allotypes and genetic susceptibility to invasive *Haemophilus influenzae* type b and *Staphylococcus aureus* infections in South African children. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 15, n. 5, p. 419–24, maio 1996.

GÓMES SILVA, A. et al. Immunoblotting analyses using two-dimensional gel electrophoresis of *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens por immunoblotting em gel bidimensional. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, n. 6, p. 454–459, 2004.

GONG, H. et al. Immunoglobulin G binding protein (IGBP) from *Rhipicephalus haemaphysaloides*: identification, expression, and binding specificity. **Parasitology Research**, v. 113, n. 12, p. 4387–4395, 9 dez. 2014.

GONZALES, J.C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. Mestre Jou. 1974:101p, 1974.

GONZALES, J.C. **O controle dos carrapatos dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 104 p., 1975.

GOUDSWAARD, J. et al. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. **Scandinavian journal of immunology**, v. 8, n. 1, p. 21–8, 1978.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8–10, 2002.

GRUBHOFFER, L.; KOVÁŘ, V.; RUDENKO, N. Tick lectins: structural and functional properties. **Parasitology**, v. 129, n. 7, p. S113–S125, out. 2004.

GUDDERRA, N. P. et al. Hemolymph proteins in ticks. **Journal of insect physiology**, v. 48, n. 3, p. 269–278, mar. 2002.

HAJDUSEK, O. et al. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. **Vaccine**, v. 28, n. 17, p. 2993–2998, abr. 2010.

HAMERS-CASTERMAN, C. et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. **Nature**, v. 363, n. 6428, p. 446–448, 3 jun. 1993.

HATTA, H. et al. Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 57, n. 7, p. 1077–81, jul. 1993.

HIENDLEDER, S.; LEWALSKI, H.; JANKE, A. Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intra-species variation, taxonomy and domestication. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, n. 1–2, p. 150–156, 2008.

HOGARTH, P. M. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity. **Current opinion in immunology**, v. 14, n. 6, p. 798–802, dez. 2002.

HORN, F.; DOS SANTOS, P. C.; TERMIGNONI, C. Boophilus microplus anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 384, n. 1, p. 68–73, 1 dez. 2000.

IMAMURA, S. et al. Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. **Vaccine**, v. 24, n. 13, p. 2230–2237, mar. 2006.

ISLAM, M. K. et al. The Kunitz-Like Modulatory Protein Haemangin Is Vital for Hard Tick Blood-Feeding Success. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 7, p. e1000497, 10 jul. 2009.

JASINSKAS, A.; JAWORSKI, D. C.; BARBOUR, A. G. Amblyomma americanum: specific uptake of immunoglobulins into tick hemolymph during feeding. **Experimental parasitology**, v. 96, n. 4, p. 213–21, dez. 2000.

JONSSON, N. N.; DAVIS, R.; DE WITT, M. An estimate of the economic effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on Queensland dairy farms. **Australian veterinary journal**, v. 79, n. 12, p. 826–31, dez. 2001.

JONSSON, N. N.; PIPER, E. K.; CONSTANTINOIU, C. C. Host resistance in cattle to infestation with the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 11, p. 553–559, 2014.

JORE, M. M. et al. Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 23, n. 5, p. 378–386, 28 mar. 2016.

KACSKOVICS, I. et al. The heterogeneity of bovine IgG2. VII. The phenotypic distribution of the A1 and A2 allotypes of IgG2a among beef cows with known clinical history. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 48, n. 1–2, p. 89–96, set. 1995.

KACSKOVICS, I.; BUTLER, J. E. The heterogeneity of bovine IgG2--VIII. The complete cDNA sequence of bovine IgG2a (A2) and an IgG1. **Molecular immunology**, v. 33, n. 2, p. 189–95, fev. 1996.

KASHINO, S. S. et al. Boophilus microplus: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 1, p. 12–21, 2005.

KELLER, A. et al. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical chemistry**, v. 74, n. 20, p. 5383–92, 15 out. 2002.

KEMP, D. H.; STONE, B.F.; BINNINGTON, K.C. Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feedings apparatus, salivary gland secretions and the host response. . In: OBECHAIN, F. D., GALUN, R. (Ed.). **Physiology of ticks**. 1 st. Oxford: Pergamon, 1982. p.119-167.

KENNEDY, D. G.; CANNAVAN, A.; MCCRACKEN, R. J. Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues. **Journal of chromatography. A**, v. 882, n. 1–2, p. 37–52, 16 jun. 2000.

KLEINMAN, H. K. Preparation of Basement Membrane Components from EHS Tumors. In: **Current Protocols in Cell Biology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

KNIGHT, K. L.; SUTER, M.; BECKER, R. S. Genetic engineering of bovine Ig. Construction and characterization of hapten-binding bovine/murine chimeric IgE, IgA, IgG1, IgG2, and IgG3 molecules. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 140, n. 10, p. 3654–9, 15 maio 1988.

KOH, C. Y. et al. Variegins, a Novel Fast and Tight Binding Thrombin Inhibitor from the Tropical Bont Tick. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 40, p. 29101–29113, 15 ago. 2007.

KUNZ, S. E.; KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 13, n. 4, p. 1249–86, dez. 1994.

LABRUNA, M. B. et al. Ticks (Acari : Ixodidae) from the state of Rondônia , western Amazon , Brazil. v. 10, n. 1, p. 17–32, 1995.

LANGONE, J. J. Applications of immobilized protein A in immunochemical techniques. **Journal of immunological methods**, v. 55, n. 3, p. 277–96, 30 dez. 1982.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.

LEENAARS, P. P. et al. The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 35. **Alternatives to laboratory animals : ATLA**, v. 27, n. 1, p. 79–102, [s.d.].

LEWIS, M. J. et al. A common theme in interaction of bacterial immunoglobulin-binding proteins with immunoglobulins illustrated in the equine system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 25, p. 17615–17623, 2008.

LOVELL, S. C. et al. Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation. **Proteins-Structure Function and Genetics**, v. 50, n. August 2002, p. 437–450, 2003.

MACHUGH, D. E. et al. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, v. 146, n. 3, p. 1071–86, jul. 1997.

MACLEAN, B. et al. General framework for developing and evaluating database scoring algorithms using the TANDEM search engine. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 22, n. 22, p. 2830–2, 15 nov. 2006.

MALHOTRA, R. et al. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. **Nature Medicine**, v. 1, n. 3, p. 237–243, mar. 1995.

MANS, B. J. et al. Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Experimental & applied acarology**, v. 22, n. 6, p. 353–66, jun. 1998.

MARTIN, W. L. et al. Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding. **Molecular cell**, v. 7, n. 4, p. 867–77, abr. 2001.

MARUFU, M. C. et al. Tick loads in cattle raised on sweet and sour rangelands in the low-input farming areas of South Africa. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 2, p. 307–313, 22 fev. 2011.

MARUYAMA, S. R. C. **Estudo dos transcriptomas de glândulas salivares do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, alimentados em bovinos resistentes ou suscetíveis para obtenção de catálogo de genes afetados pela resposta imune do hospedeiro**. 2008. 159. (Mestrado). Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Mestrado, Ribeirão Preto-SP.

MARUYAMA, S. R. C. Antígenos salivares recombinantes de *Rhipicephalus microplus* selecionados por imunovacinologia reversa: efeito da vacinação de bovinos no controle das infestações por carrapatos. 2012.

MASSARD, C. L., FONSECA, A.H.; BITTENCOURT,V.R.; OLIVEIRA, J.B.; SILVA, K.M. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm 86- “GAVAC” contra o carrapato *Boophilus microplus* no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, p. 167-173, 1995.

MAZENGERA, K. E. et al. Genetic Parameters of Bovine Serum Immunoglobulins. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 9, p. 2309–2314, set. 1985.

MCGUIRE, T. C.; MUSOKE, A. J.; KURTTI, T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. **Immunology**, v. 38, n. 2, p. 249–56, out. 1979.

MEHTA, A. S. et al. Increased Levels of Galactose-Deficient Anti-Gal Immunoglobulin G in the Sera of Hepatitis C Virus-Infected Individuals with Fibrosis and Cirrhosis. **Journal of Virology**, v. 82, n. 3, p. 1259–1270, 1 fev. 2008.

MILLER MP(1997) R x C:A program for the analysis of contingency tables via the metropolis algorithm. <http://www.marksgeneticsoftware.net/rxc.htm>. Accessed on 10 July 2014.

MUKKUR, T. K.; FROESE, A. Isolation and characterization of IgM from bovine colostral whey. **Immunochemistry**, v. 8, n. 3, p. 257–64, mar. 1971.

MUKKUR, T. K.; TEWARI, U. J. Physico-chemical and biological properties of the subunits of bovine colostral anti-DNP immunoglobulin M (IgM). **Immunochemistry**, v. 10, n. 7, p. 477–9, jul. 1973.

NANSEN, P. Selective immunoglobulin deficiency in cattle and susceptibility to infection. **Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and immunology**, v. 80, n. 1, p. 49–54, 1972.

NESVIZHSKII, A. I. et al. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646–58, 1 set. 2003.

NICKERSON, D. A.; TOBE, V. O.; TAYLOR, S. L. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 14, p. 2745–51, 15 jul. 1997.

NIENABER, J.; GASPAR, A. R. ; NEITZ, A. W. . Savignin, a Potent Thrombin Inhibitor Isolated from the Salivary Glands of the Tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). **Experimental Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 82–91, out. 1999.

NIH. Image J: Image processing and Analysis in Java. 1997.

NIKU, M. et al. The bovine genomic DNA sequence data reveal three IGHV subgroups, only one of which is functionally expressed. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 37, n. 3–4, p. 457–461, jul. 2012.

NUTTALL, P. A. Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 289, n. 5–7, p. 492–505, 1999.

OLIVER, J. H. et al. Conspecificity of the ticks *Ixodes scapularis* and *I. dammini* (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 30, n. 1, p. 54–63, jan. 1993.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*D. hominis*). **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v.42, n.2, p.127-35. 1990.

OXELIUS, V. A. Serum IgG and IgG subclass contents in different Gm phenotypes. **Scandinavian journal of immunology**, v. 37, n. 2, p. 149–53, fev. 1993.

PANDEY, J. P. et al. Genetic Markers of IgG Influence the Outcome of Infection with Hepatitis C Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 9, p. 1334–1336, nov. 2008.

PAREKH, R. et al. A comparative analysis of disease-associated changes in the galactosylation of serum IgG. **Journal of autoimmunity**, v. 2, n. 2, p. 101–14, abr. 1989.

PARK SDE. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Ph.D. thesis, University of Dubli, 2001.

PETERKOVÁ, K. et al. Immunomodulatory arsenal of nymphal ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 22, n. 2, p. 167–171, jun. 2008.

PIMENTA, D. C. et al. Interaction of heparin with internally quenched fluorogenic peptides derived from heparin-binding consensus sequences, kallistatin and anti-thrombin III. **Biochemical Journal**, v. 366, n. 2, p. 435–446, 1 set. 2002.

PIPER, E. K. et al. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, n. 1–2, p. 110–119, nov. 2008.

PIPER, E. K. et al. Immunological Profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* Cattle Infested with the Cattle Tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 7, p. 1074–1086, 1 jul. 2009.

PIPER, E. K. et al. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 4, p. 431–441, 2010.

PIPER, E. K. et al. Peripheral cellular and humoral responses to tick infestation in Santa-Getrúdis cattle exhibiting divergent tick-resistance phenotypes. **Int J Parasitol**, v. 4067, p. Submitted, 2016.

PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography. **Protein expression and purification**, v. 3, n. 4, p. 263–81, ago. 1992.

POWELL, R.T.; REID, T.J. Project tick control. **Queensland Agricultural Journal**. 1982;108:279-300, 1982.

PRUETT, J. H. Immunological control of arthropod ectoparasites--a review. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 1, p. 25–32, jan. 1999.

RABBANI, H. et al. Polymorphism of the IGHG3 gene in cattle. **Immunogenetics**, v. 46, n. 4, p. 326–31, 1997.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Advances in protein chemistry**, v. 23, p. 283–438, 1968.

RATCLIFFE, N. A. et al. Invertebrate Immunity: Basic Concepts and Recent Advances. **International Review of Cytology**, v. 97, p. 183–350, 1985.

RECHAV, Y. Resistance of Brahman and Hereford Cattle to African ticks with reference to serum gamma globulin levels and blood composition. **Experimental & Applied Acarology**, v. 3, n. 3, p. 219–232, 1987.

RIBEIRO, J. M. How ticks make a living. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 11, n. 3, p. 91–3, mar. 1995.

RIBEIRO, J. M. C. Role of Saliva in Blood-Feeding by Arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 463–478, jan. 1987.

ROBERTS, J. A.; KERR, J. D. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. **The Journal of parasitology**, v. 62, n. 3, p. 485–8, jun. 1976.

RODRÍGUEZ, M. et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. **Veterinary parasitology**, v. 57, n. 4, p. 339–49, abr. 1995.

SAGE, H. J. et al. Quantitative Studies of a Conglutinating System in Normal Bovine Serum : I . Isolation of Conglutinin , Antibody and Components of Complement Information about subscribing to The Journal of. 2014.

SAINI, S. S. et al. Exceptionally long CDR3H region with multiple cysteine residues in functional bovine IgM antibodies. **European Journal of Immunology**, v. 29, n. 8, p. 2420–2426, 1999.

SAINI, S. S. et al. Bovine IgM antibodies with exceptionally long complementarity-determining region 3 of the heavy chain share unique structural properties conferring restricted VH + Vlambda pairings. **International immunology**, v. 15, n. 7, p. 845–53, jul. 2003.

SAINI, S. S. et al. Structural evidence for a new IgG1 antibody sequence allele of cattle. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 65, n. 1, p. 32–38, 2007.

SAINI, S. S.; KAUSHIK, A. Extensive CDR3H length heterogeneity exists in bovine foetal VDJ rearrangements. **Scandinavian journal of immunology**, v. 55, n. 2, p. 140–8, fev. 2002.

SALI, A; BLUNDELL, T.L.Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of molecular biology**, v. 234, n 3, p. 779-815, 5 dez. 1993.

SCHADE, R.; HLINAK, A. Egg Yolk Antibodies, State of the Art and Future Prospects. **ALTEX**, v. 13, n. 5, p. 5–9, 1996.

SCHROEDER, H. et al. Subversion of complement by hematophagous parasites. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 1, p. 5–13, jan. 2009.

SCHUIJT, T. J. et al. Identification and Characterization of Ixodes scapularis Antigens That Elicit Tick Immunity Using Yeast Surface Display. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e15926, 5 jan. 2011.

SEIFERT, G. W. Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of the cattle tick (Boophilus Microplus). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 22, n. 1, p. 159–168, 1971.

SHINJO, S. K. et al. Heparin and Heparan Sulfate Disaccharides Bind to the Exchanger Inhibitor Peptide Region of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger and Reduce the Cytosolic Calcium of Smooth Muscle Cell Lines: REQUIREMENT OF C4-C5 UNSATURATION AND 1 -> 4 GLYCOSIDIC LINKAGE FOR ACTIVITY. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 50, p. 48227–48233, 13 dez. 2002.

- SILVA, N. C. S. et al. Saliva of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 445, 11 dez. 2016.
- SINGH, S. K.; GIRSCHICK, H. J. Tick-host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases. **Current Science**, v. 85, n. 9, p. 1284–1298, 2003.
- SOARES, T. S. et al. BmTI-A, a Kunitz type inhibitor from *Rhipicephalus microplus* able to interfere in vessel formation. **Veterinary Parasitology**, v. 219, p. 44–52, mar. 2016.
- SPICKETT, A. M. et al. Resistance of Nguni, Bonsmara and Hereford cattle to ticks in a Bushveld region of South Africa. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, v. 56, n. 4, p. 245–50, dez. 1989.
- STATON C, LEWIS C, BICKNELL R. *Angiogenesis Assays: A Critical Appraisal of Current Techniques*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2006.
- STEVENSON, G. T. et al. Conjugation of human Fc gamma in closed-hinge or open-hinge configuration to Fab'gamma and analogous ligands. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 158, n. 5, p. 2242–50, 1 mar. 1997.
- STUDIER, F. W. et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods in enzymology**, v. 185, p. 60–89, 1990.
- SVITEL, J. et al. Combined Affinity and Rate Constant Distributions of Ligand Populations from Experimental Surface Binding Kinetics and Equilibria. **Biophysical Journal**, v. 84, n. 6, p. 4062–4077, jun. 2003.
- SYMONS, D. B.; CLARKSON, C. A.; BEALE, D. Structure of bovine immunoglobulin constant region heavy chain gamma 1 and gamma 2 genes. **Molecular immunology**, v. 26, n. 9, p. 841–50, set. 1989.
- TAN, L. K. et al. Influence of the hinge region on complement activation, C1q binding, and segmental flexibility in chimeric human immunoglobulins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 1, p. 162–6, jan. 1990.
- TEWARI, U. J.; MUKKUR, T. K. Isolation and physico-chemical characterization of bovine serum and colostral immunoglobulin G (IgG) subclasses. **Immunochemistry**, v. 12, n. 12, p. 925–30, dez. 1975.
- THOME, C. H. et al. Linker for Activation of T-cell Family Member2 (LAT2) a Lipid Raft Adaptor Protein for AKT Signaling, Is an Early Mediator of Alkylphospholipid Anti-leukemic Activity. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 12, p. 1898–1912, 1 dez. 2012.

TORPIER, G.; CAPRON, A.; OUAISSI, M. A. Receptor for IgG(Fc) and human beta2-microglobulin on *S. mansoni* schistosomula. **Nature**, v. 278, n. 5703, p. 447–9, 29 mar. 1979.

TRAGER, W. Acquired Immunity to Ticks. **The Journal of Parasitology**, v. 25, n. 1, p. 57, fev. 1939a.

TRAGER, W. Further Observations on Acquired Immunity to the Tick *Dermacentor variabilis* Say. **The Journal of Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 137, abr. 1939b.

TYSON, K. R.; ELKINS, C.; DE SILVA, A. M. A novel mechanism of complement inhibition unmasked by a tick salivary protein that binds to properdin. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 6, p. 3964–8, 15 mar. 2008.

VALENZUELA, J. G. Purification, Cloning, and Expression of a Novel Salivary Anticomplement Protein from the Tick, *Ixodes scapularis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 25, p. 18717–18723, 16 jun. 2000.

VAZ JÚNIOR, I. DA S. et al. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. **Veterinary parasitology**, v. 62, n. 1–2, p. 155–60, mar. 1996.

VERÍSSIMO, C. J. et al. Haircoat characteristics and tick infestation on GYR (Zebu) and crossbred (Holstein x GYR) cattle. **Archivos de Zootecnia**, v. 51, p. 389–392, 2002.

VERÍSSIMO, C. J. et al. Length and density of filiform tongue papillae: differences between tick-susceptible and resistant cattle may affect tick loads. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 594, 2015.

WANG, F. et al. Reshaping Antibody Diversity. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1379–1393, jun. 2013.

WANG, H. et al. No Title. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 753–754, 19 fev. 1998.

WANG, H.; NUTTALL, P. A. Immunoglobulin G binding proteins in male *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. **Parasite immunology**, v. 17, n. 10, p. 517–524, 1995a.

WANG, H.; NUTTALL, P. A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. **Parasitology**, v. 109 (Pt 4, p. 525–30, nov. 1994.

WANG, H.; NUTTALL, P. A. Immunoglobulin-G binding proteins in the ixodid ticks, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* and *Ixodes hexagonus*. **Parasitology**, v. 111 (Pt 2, p. 161–5, ago. 1995b.

WANG, H AND P. A. NUTTAL. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. **Cell. Mol. Life Sci.** 56, 286–295, 1999.

WATSON, D. L. Immunologically-specific resistance to infection with particular reference to staphylococcal mastitis. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 137, p. 579–90, 1981.

WHITTINGHAM, S.; PROPERT, D. N. Gm and Km allotypes, immune response and disease susceptibility. **Monographs in allergy**, v. 19, p. 52–70, 1986.

WIDDERS, P.R. Fc receptors and the pathogenesis of bacterial infections in animals. In: Boyle MDP (Ed.), *Bacterial Immunoglobulin Binding Proteins: Microbiology, Chemistry, and Biology*. **Academic Press, Inc.** San Diego, CA, p. 375-95, 1990.

WIKEL, S. K. Acquired resistance to ticks: expression of resistance by C4-deficient guinea pigs. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 28, n. 3, p. 586–90, maio 1979.

WIKEL, S. K. Host Immunity to Ticks. **Annual Review of Entomology**, v. 41, n. 1, p. 1–22, jan. 1996.

WIKEL, S. K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 6, p. 851–9, jun. 1999.

WIKEL, S. K.; ALLEN, J. R. Acquired resistance to ticks. iii. Cobra venom factor and the resistance response. **Immunology**, v. 32, n. 4, p. 457–65, abr. 1977.

WILLADSEN, P. et al. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 110 Suppl, p. S43-50, 1995.

WORMS, M. J.; ASKENASE, P. W.; BROWN, S. J. Requirement for host Fc receptors and IgG antibodies in host immune responses against *Rhipicephalus appendiculatus*. **Veterinary parasitology**, v. 28, n. 1–2, p. 153–61, abr. 1988.

YARNALL, M.; WIDDERS, P. R.; CORBEIL, L. B. Isolation and characterization of Fc receptors from *Haemophilus somnus*. **Scandinavian journal of immunology**, v. 28, n. 2, p. 129–37, ago. 1988.

YEATON, R. W. Invertebrate lectins: II. Diversity of specificity, biological synthesis and function in recognition. **Developmental and comparative immunology**, v. 5, n. 4, p. 535–45, 1981a.

YEATON, R. W. Invertebrate lectins: I. Occurrence. **Developmental and comparative immunology**, v. 5, n. 3, p. 391–402, 1981b.

ZAUNER, G. et al. Glycoproteomic Analysis of Antibodies. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 4, p. 856–865, 1 abr. 2013.

ZHAO, Y.; JACKSON, S. M.; AITKEN, R. The bovine antibody repertoire. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 30, n. 1–2, p. 175–186, jan. 2006.

Apêndices

Figura Suplementar 3. IGBP-C utilizada nos ensaios de investigação de outras funções exercidas por essa proteína que não a ligação a IgG de boi. IGBP-C expressa em *Pichia pastoris* e sintetizada por empresa especializada, submetida a SDS-PAGE 12%, posteriormente corado com coomassie blue.

Figura Suplementar 4. Tempo médio ($t_{1/2}$) para lise de 50% das hemácias em ensaio hemolítico cinético para a via clássica do complemento. Tempo médio ($t_{1/2}$) calculado para lise de 50% das hemácias em ensaio hemolítico cinético para a via clássica do complemento, nas reações tratadas ou não com a IGBP-C. Controle: Reação sem tratamento de inibidor. IGBP-C: reação tratada com 62,5ug/mL de IGBP-C.

Tabela Suplementar 1. Classificação dos fenótipos de infestação a carrapato em bovinos suscetíveis (HPB) que apresentam diferentes haplótipos de IgG1.

Haplótipo IgG1 (aa região de dobradiça) [#]	ID*	Fenótipo de infestação					
		Escore funcionário	Escore veterinária	Escore Fotos	Média (3 escores)**	Escore final (escala 0-4)	Categoria (baixa/inter e alta)
(TIP/RDP)	HPB-10	4	4	3	3,67	4	alta
	HPB-13	3	3	3	3,00	3	alta
	HPB-15	2	3	3	2,67	3	alta
	HPB-28	3	3	3	3,00	3	alta
	HPB-43	3	2	2	2,33	2	baixa/inter
	HPB-45	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-46	2	2	1	1,67	2	baixa/inter
	HPB-58	2	3	3	2,67	3	alta
	HPB-59	1	2	2	1,67	2	baixa/inter
	HPB-647	4	4	4	4,00	4	alta
	HPB-663	3	4	3	3,33	3	alta
	HPB-704	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-82	2	2	2	2,00	2	baixa/inter
	HPB-85	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-89	3	3	3	3,00	3	alta
	HPB-11	3	2	2	2,33	2	baixa/inter
	HPB-12	4	4	4	4,00	4	alta
	HPB-14	2	1	1	1,33	1	baixa/inter
	HPB-17	2	3	3	2,67	3	alta
	HPB-717	3	3	3	3,00	3	alta
	HPB-86	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-32	3	2	2	2,33	2	baixa/inter

Haplótipo IgG1 (aa região de dobradiça) [#]	ID*	Fenótipo de infestação					
		Escore funcionário	Escore veterinária	Escore Fotos	Média (3 escores)**	Escore final (escala 0-4)	Categoria (baixa/inter e alta)
(TIP/TIP)	HPB-25	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-42	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-44	2	3	3	2,67	3	alta
	HPB-33	4	4	4	4,00	4	alta
	HPB-51	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-660	4	4	4	4,00	4	alta
	HPB-705	2	2	2	2,00	2	baixa/inter
	HPB-712	1	2	2	1,67	2	baixa/inter
	HPB-714	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-88	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-91	2	3	3	2,67	3	alta
(TIP/TIR)	HPB-646	1	1	1	1,00	1	baixa/inter
(RDP/RDP)	HPB-40	3	3	2	2,67	3	alta
(RDR/RDR)	HPB-52	1	2	2	1,67	2	baixa/inter
	HPB-27	1	1	1	1,00	1	baixa/inter
	HPB-36	2	1	1	1,33	1	baixa/inter
	HPB-48	2	3	3	2,67	3	alta
	HPB-50	2	2	2	2,00	2	baixa/inter

[#] Resíduos de aminoácidos resultantes dos SNPs identificados na posição dos nucleotídeos 795, InDel 803-809 e 954 para IgG1

* Número de identificação dos bovinos HPB

**Média aritmética dos três escores obtidos (escore funcionário, escore veterinária e escore fotos)

Tabela Suplementar 2. Classificação dos fenótipos de infestação a carrapato em bovinos suscetíveis (HPB) que apresentam diferentes haplótipos de IgG2.

Haplótipo IgG2 (aa região de dobradiça) [#]	ID*	Fenótipo de infestação					
		Escore funcionário	Escore veterinária	Escore Fotos	Média (3 escores)**	Escore final (escala 0-4)	Categoria (baixa/inter e alta)
(SPNH/SPNH) ^a	HPB-14	2	1	1	1,33	1	baixa/inter
	HPB-17	2	3	3	2,67	3	alta
	HPB-25	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-33	4	4	4	4,00	4	alta
	HPB-44	2	3	3	2,67	3	alta
	HPB-51	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-646	1	1	1	1,00	1	baixa/inter
	HPB-660	4	4	4	4,00	4	alta
	HPB-705	2	2	2	2,00	2	baixa/inter
	HPB-712	1	2	2	1,67	2	baixa/inter
	HPB-714	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-85	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-88	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-89	3	3	3	3,00	3	alta
	HPB-91	2	3	3	2,67	3	alta
(SPNH/SRNH)	HPB-46	2	2	1	1,67	2	baixa/inter
(SPNH/ICHP) ^b	HPB-10	4	4	3	3,67	4	alta
	HPB-11	3	2	2	2,33	2	baixa/inter
	HPB-12	4	4	4	4,00	4	alta
	HPB-13	3	3	3	3,00	3	alta
	HPB-28	3	3	3	3,00	3	alta
	HPB-32	3	2	2	2,33	2	baixa/inter

Haplótipo IgG2 (aa região de dobradiça) [#]	ID*	Fenótipo de infestação					
		Escore	Escore	Escore	Média	Escore final	Categoria
	HPB-36	2	1	1	1,33	1	baixa/inter
	HPB-40	3	3	2	2,67	3	alta
	HPB-43	3	2	2	2,33	2	baixa/inter
	HPB-45	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-48	2	3	3	2,67	3	alta
	HPB-50	2	2	2	2,00	2	baixa/inter
	HPB-58	2	3	3	2,67	3	alta
	HPB-59	1	2	2	1,67	2	baixa/inter
	HPB-647	4	4	4	4,00	4	alta
	HPB-663	3	4	3	3,33	3	alta
	HPB-704	3	4	4	3,67	4	alta
	HPB-717	3	3	3	3,00	3	alta
	HPB-86	3	4	4	3,67	4	alta
(IChP/IChP) ^c	HPB-27	1	1	1	1,00	1	baixa/inter
	HPB-52	1	2	2	1,67	2	baixa/inter
	HPB-82	2	2	2	2,00	2	baixa/inter

[#]Resíduos de aminoácidos resultantes dos SNPs identificados na posição dos nucleotídeos 753, 767, 768, 770, para IgG2.

*Número de identificação dos bovinos HPB

**Média aritmética dos três escores obtidos (escore funcionário, escore veterinária e escore fotos)

^a Animais homozigotos para o alótipo definido sorologicamente IgG2γ2a

^b Animais heterozigotos para os alótipos definidos sorologicamente IgG2γ2a e IgG2γ2b

^c Animais homozigotos para o alótipo definido sorologicamente IgG2γ2b

Tabela Suplementar 3. Relação de açúcares e glicosaminoglicanos testados em ensaio de interação com IGBP-C de *Rhipicephalus microplus* em Biacore.

Natureza do composto testado	Identificação
Açúcares	α - D(+) glucose
	β - D(+) glucose
	L- fucose
	α - D(+) – fucose
	melibiose
	α - D – melibiose
	α - D (+) - melibiose
	D – (+) – melibiose
	α - lactose
	β - lactose
	D- (+) lactose
	rhaminose
	D- (+) – galactose
	D (+) – maltose
	D (+) – manose
	D- manitolol
	sucrose
	α - D- methyl manopiramosídio
Glicosaminoglicanos	heparina
	heparan sulfato
	condroitin sulfato

Tabela Suplementar 4. Descrição de *matches* com proteínas ligantes de imunoglobulina G presentes na base dados de proteína NCBI NR para transcritos de *Rhipicephalus microplus*.

ID#	Número de aminoácidos	Melhores <i>matches</i> presentes na base dados NCBI NR	Número de acesso	E-value dos <i>matches</i>
Rm-nr-52657	286	immunoglobulin G binding protein A	gi 2352270	1E-119
Rm-nr-52658	535	immunoglobulin G binding protein A	gi 2352270	1E-140
Rm-nr-36761	637	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative	gi 241681415	1E-090
Rm-nr-61915	300	putative immunoglobulin G binding protein A	gi 260175592	2E-037
Rm-nr-359	262	immunoglobulin G binding protein A	gi 2352270	4E-049
Rm-nr-25241	359	putative immunoglobulin G binding protein A	gi 260175592	1E-179
Rm-nr-23921	460	immunoglobulin G binding protein A	gi 2352270	1E-070
Rm-nr-23925	460	immunoglobulin G binding protein A	gi 2352270	2E-070
Rm-nr-25240	359	putative immunoglobulin G binding protein A	gi 260175592	1E-179
Rm-nr-24420	414	immunoglobulin G binding protein A	gi 2352270	8E-020
Rm-nr-118866	497	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative	gi 241681415	1E-106
Rm-nr-23924	213	immunoglobulin G binding protein A	gi 2352270	4E-050
Rm-nr-23923	201	immunoglobulin G binding protein A	gi 2352270	7E-052
Rm-nr-121277	439	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative	gi 241681415	2E-011
Rm-nr-52656	208	immunoglobulin G binding protein A	gi 2352270	2E-078
Rm-nr-175688	134	immunoglobulin-binding protein, putative	gi 241812868	3E-036
Rm-tb2-25244	400	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative.	gi 241681415	6E-006
Rm-nr-20978	178	immunoglobulin G binding protein B	gi 145693007	3E-084
Rm-nr-21408	178	immunoglobulin G binding protein B	gi 145693007	1E-082
Rm-nr-20979	178	immunoglobulin G binding protein B	gi 145693007	1E-082
Rm-nr-20983	178	immunoglobulin G binding protein B	gi 145693007	3E-083
Rm-nr-25946	172	immunoglobulin G binding protein C	gi 2352274	4E-084
Rm-nr-104428	184	immunoglobulin-binding protein, putative	gi 241812868	2E-022
Rm-nr-104429	167	immunoglobulin-binding protein, putative	gi 241812868	1E-014
Rm-nr-83742	184	immunoglobulin-binding protein, putative	gi 241812868	1E-026
Rm-tb2-25242	464	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative	gi 241681415	1E-012

número de acesso no sialotranscriptoma de *R. microplus*.

Destacada em vermelho, a proteína IGBP-C de *R. microplus*.

Tabela Suplementar 5. Análise comparativa de proteínas ligantes de imunoglobulina G presentes no sialotranscriptoma de *Rhipicephalus microplus* de acordo com o estágio de desenvolvimento do carrapato.

ID#	Descrição	Bibliotecas de Nelore**				Bibliotecas de HPB**				p<0.05? *
		Larva NA	Macho GS	Fêmea GS	Ninfa GS	Larva NA	Macho GS	Fêmea GS	Ninfa GS	
<u>Rm-nr-52657</u>	immunoglobulin G binding protein A	2	36				12			S
<u>Rm-nr-52658</u>	immunoglobulin G binding protein A	9	1038				586		1	S
<u>Rm-nr-36761</u>	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative	1	387	1			294			
<u>Rm-nr-61915</u>	putative immunoglobulin G binding protein A	1	191				110			S
<u>Rm-nr-359</u>	immunoglobulin G binding protein A	1	258			1	118			S
<u>Rm-nr-25241</u>	putative immunoglobulin G binding protein A		129				66			S
<u>Rm-nr-23921</u>	immunoglobulin G binding protein A	2	105				76			
<u>Rm-nr-23925</u>	immunoglobulin G binding protein A		90				55			S
<u>Rm-nr-25240</u>	putative immunoglobulin G binding protein A		59				30			S
<u>Rm-nr-24420</u>	immunoglobulin G binding protein A		38				29			
<u>Rm-nr-118866</u>	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative		10				10			
<u>Rm-nr-23924</u>	immunoglobulin G binding protein A		11				9			
<u>Rm-nr-23923</u>	immunoglobulin G binding protein A		16							S
<u>Rm-nr-121277</u>	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative		5				8			
<u>Rm-nr-52656</u>	immunoglobulin G binding protein A		11				12			
<u>Rm-nr-175688</u>	immunoglobulin-binding protein, putative			4				1		
<u>Rm-tb2-25244</u>	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative.		64				28			S
<u>Rm-nr-20978</u>	immunoglobulin G binding protein B	2	474				94			S
<u>Rm-nr-21408</u>	immunoglobulin G binding protein B		102				9			S
<u>Rm-nr-20979</u>	immunoglobulin G binding protein B		476				173			S
<u>Rm-nr-20983</u>	immunoglobulin G binding protein B		118				16			S
<u>Rm-nr-25946</u>	immunoglobulin G binding protein C	3	918				141			S
<u>Rm-nr-104428</u>	immunoglobulin-binding protein, putative		13				24			S
<u>Rm-nr-104429</u>	immunoglobulin-binding protein, putative		6				4			
<u>Rm-nr-83742</u>	immunoglobulin-binding protein, putative	1	5				3			
<u>Rm-tb2-25242</u>	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative		64				44			
“Somatória”		22	4624	5		1	1951	1	1	

número de acesso no sialotranscriptoma de *R. microplus*.

* valor de *p* de acordo com o teste qui-quadrado; S: sim, *p*<0,05

** número de *reads*

NA: não alimentada; GS: glândula salivar

Destacada em vermelho, a proteína IGBP-C de *R. microplus*.

Tabela Suplementar 6. Análise comparativa de proteínas ligantes de imunoglobulina G presentes no sialotranscriptoma de *Rhipicephalus microplus* de acordo com o tipo de hospedeiro em que o carrapato foi alimentado.

ID"	Descrição	É secretada?*	Nelore		HPB		p<0.05?*
			Observado#	Esperado#	Observado#	Esperado#	
<u>Rm-nr-52657</u>	immunoglobulin G binding protein A	N	38	26,75	12	23,25	S
<u>Rm-nr-52658</u>	immunoglobulin G binding protein A	N	1047	874,23	587	759,77	S
<u>Rm-nr-36761</u>	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative	N	389	365,42	294	317,58	
<u>Rm-nr-61915</u>	putative immunoglobulin G binding protein A	N	192	161,58	110	140,42	S
<u>Rm-nr-359</u>	immunoglobulin G binding protein A	<u>N</u>	259	202,24	119	175,76	S
<u>Rm-nr-25241</u>	putative immunoglobulin G binding protein A	N	129	104,33	66	90,67	S
<u>Rm-nr-23921</u>	immunoglobulin G binding protein A	<u>N</u>	107	97,91	76	85,09	
<u>Rm-nr-23925</u>	immunoglobulin G binding protein A	N	90	77,58	55	67,42	S
<u>Rm-nr-25240</u>	putative immunoglobulin G binding protein A	<u>N</u>	59	47,62	30	41,38	S
<u>Rm-nr-24420</u>	immunoglobulin G binding protein A	<u>N</u>	38	35,85	29	31,15	
<u>Rm-nr-118866</u>	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative	<u>N</u>	10	10,70	10	9,30	
<u>Rm-nr-23924</u>	immunoglobulin G binding protein A	<u>N</u>	11	10,70	9	9,30	
<u>Rm-nr-23923</u>	immunoglobulin G binding protein A	<u>N</u>	16	8,56	0	7,44	S
<u>Rm-nr-121277</u>	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative	<u>N</u>	5	6,96	8	6,04	
<u>Rm-nr-52656</u>	immunoglobulin G binding protein A	<u>N</u>	11	12,31	12	10,69	
<u>Rm-nr-175688</u>	immunoglobulin-binding protein, putative	<u>S</u>	4	2,68	1	2,32	
<u>Rm-tb2-25244</u>	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative.	<u>S</u>	64	49,22	28	42,78	S
<u>Rm-nr-20978</u>	immunoglobulin G binding protein B	S	476	304,96	94	265,04	S
<u>Rm-nr-21408</u>	immunoglobulin G binding protein B	<u>S</u>	102	59,39	9	51,61	S
<u>Rm-nr-20979</u>	immunoglobulin G binding protein B	<u>S</u>	476	347,23	173	301,77	S
<u>Rm-nr-20983</u>	immunoglobulin G binding protein B	<u>S</u>	118	71,69	16	62,31	S
<u>Rm-nr-25946</u>	immunoglobulin G binding protein C	<u>S</u>	921	568,20	141	493,80	S
<u>Rm-nr-104428</u>	immunoglobulin-binding protein, putative	<u>S</u>	13	19,80	24	17,20	S
<u>Rm-nr-104429</u>	immunoglobulin-binding protein, putative	<u>S</u>	6	5,35	4	4,65	
<u>Rm-nr-83742</u>	immunoglobulin-binding protein, putative	<u>S</u>	6	4,82	3	4,18	
<u>Rm-tb2-25242</u>	double sized immunoglobulin G binding protein A, putative	S	64	57,78	44	50,22	

" número de acesso no sialotranscriptoma de *R. microplus*

* S: sim, possui peptídeo sinal na sequência (ou seja, a sequência pode ser secretada); N: não possui peptídeo sinal

#resultados baseados no número total de *reads* obtidas a partir de 8 bibliotecas de glândulas salivares de *R. microplus* (larva não alimentada, glândula salivar de macho, glândula salivar de fêmea e glândula salivar de ninfa de *R. microplus* alimentados em bovinos Nelore ou HPB)

** valor de *p* de acordo com o teste chi-quadrado. S: Sim, *p*<0,05

Destacada em vermelho, a proteína IGBP-C de *R. microplus*.