

PERFIL DE PROTEÍNAS DE OVO DE CARRAPATO *Boophilus microplus*

Janaína Aparecida Gonçalves Ramos¹
Rafaela Ribeiro de Oliveira¹
Marcelo de Paiva Bechtluft²

Resumo

O carrapato *Boophilus microplus* causa grandes prejuízos econômicos à exploração pecuária brasileira em função da espoliação dos bovinos e do alto custo operacional das técnicas atuais de controle. Proteínas extraídas a partir de ovos de carrapatos podem ser usadas como ferramentas no controle dos mesmos. Com o objetivo de avaliar o potencial imunoprotetor de antígenos do carrapato foram realizados estudos de extração de proteínas de ovos do carrapato *B. microplus*. Os ovos usados nos experimentos foram provenientes de uma colônia de carrapatos mantida no Laboratório de Genética da FAPAM. Os antígenos foram isolados por suas massas moleculares avaliadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Os ovos de *B. microplus* apresentaram um perfil bem variado de proteínas com vários pesos moleculares, as quais serão purificadas para análise imunoprotetoras no próximo trabalho.

Palavras-chave: carrapato; antígeno; vacina; *Boophilus microplus*.

1. INTRODUÇÃO

Desenvolver novos métodos para manipular o sistema imune no controle de doenças infecciosas e parasitárias tem sido um objetivo constante de diferentes grupos de pesquisadores em várias partes do mundo, uma vez que a prevenção de doenças através do uso de vacinas é a prática com a melhor relação custo-benefício na medicina humana e veterinária. Na realidade, a utilização de vacinas é uma prática há muito estabelecida e corriqueira para o controle de várias doenças bacterianas e virais. Apesar do esforço constante nas pesquisas para desenvolver vacinas, o controle de parasitas pela estimulação do sistema imune é uma meta ainda não atingida para praticamente todas as parasitoses humanas e veterinárias, pois, até hoje, só existem comercialmente vacinas para o controle do carrapato bovino *Boophilus microplus*. Esse carrapato é um dos principais parasitas que afetam economicamente a bovinocultura, ocasionando um custo anual estimado em 1 bilhão de dólares na pecuária sul-americana. O controle desse parasita tem sido feito com o uso de acaricidas. A introdução dessas drogas, que permitiram o controle do carrapato, foi um dos fatores preponderantes no desenvolvimento da pecuária em várias regiões (HORN, 1987).

¹ Alunas do curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Pará de Minas – FAPAM

² Orientador e Professor de Genética, Bioquímica e Imunologia do Curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Pará de Minas - FAPAM

Entre as vantagens do uso de vacinas estão a segurança, que é maior, tanto para o aplicador como para o consumidor, e a ausência de período de carência após a aplicação, fator de importância fundamental na pecuária de leite. A utilização de micro-organismos visando ao controle de carrapatos é, ainda, pouco estudada. Entretanto, o sucesso, no uso de vírus (*Baculovirus*), bactérias (*Bacillus thuringiensis*) e fungos (*Metarhizium anisopliae*) no controle de pragas da agricultura indica que o controle biológico dos ácaros parasitas de animais pode ser viável (ALVES, 1986).

A vantagem estratégica do uso de vacinas com antígenos ocultos é a de evitar os principais mecanismos que os parasitas apresentam para escapar da resposta imune do hospedeiro. Entre os mecanismos descritos para diferentes espécies de carrapatos encontram-se fatores de imunossupressão, inibidores do sistema complemento, da citotoxicidade, da resposta inflamatória e interleucinas e competição antigênica (BARRIGA, 1999; WILLADSEN, 1999). Obviamente, essa eficiência em evitar os mecanismos de proteção dos hospedeiros desenvolveu-se gradualmente durante o longo tempo em que ocorreu a coevolução dos parasitas e seus hospedeiros. A resposta imune do hospedeiro e os mecanismos de escape do parasita estão em um equilíbrio extremamente refinado, que permite a sobrevivência de ambas as espécies. Como os carrapatos, não tiveram oportunidade de desenvolver estratégias de escape da resposta imune contra antígenos ocultos devido à falta de contato entre esses antígenos e o sistema imune do bovino, essa resposta seria, teoricamente, mais eficaz que uma resposta imune natural (WILLADSEN, 1988).

Este trabalho visa isolar o maior número possível de antígenos de ovos de *Boophilus microplus* para serem utilizados posteriormente em uma imunização.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Colônia de carrapatos *Boophilus microplus*

Os carrapatos usados nos experimentos foram provenientes de uma Fazenda em Pequi/MG. A fase de vida parasitária do carrapato foi desenvolvida em bovinos cruzados mantidos em pastos, e a fase de vida livre foi desenvolvida em laboratório com temperatura e umidade controladas entre 27-29° C e 70– 90%, respectivamente. Durante o período de 16 dias, as teleóginas foram incubadas para realização da postura e, posteriormente, os ovos foram pesados e separados para uma nova fase de extração de antígenos.

Preparação do extrato bruto de ovos

Foi pesado 1 g de ovos de *B. microplus* e homogeneizado em 5 mL de tampão tris-HCl 5 mM, pH 7,4, contendo 20 mM de NaCl. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g durante 30 minutos. O sobrenadante resultante (4,2 mL) foi filtrado, usando filtros de 0,45 µm, e disponibilizado para uso em eletroforese em gel de poliacrilamida.

Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

Neste trabalho utilizou-se gel de poliacrilamida de separação de 15%. As placas de vidro foram limpas com álcool comercial e secadas para a montagem do gel. O gel de separação (15% acrilamida) foi preparado em tampão tris-HCl 0,4 M pH 8,0 contendo SDS 0,1%, 10m l de TEMED e 40 m l de persulfato de amônio (200 mg/mL) em volume final de 5 ml. Após a polimerização do gel de separação, foi preparado o gel superior contendo acrilamida 5% em tampão tris-HCl 0,1 M pH 6,8.

As amostras foram preparadas em tampão tris-HCl 0,06 M pH 6,8, contendo SDS 2%, glicerina 10%, bromofenol 0,02% e adição ou não de ditiotreitol (200 mg/mL) para amostras reduzidas ou não reduzidas, respectivamente.

A corrida de eletroforese foi realizada em tampão tris-HCl 0,025 M, glicina 0,18 M, pH 8,3 SDS 1% por aproximadamente 2 horas, à temperatura ambiente, em corrente de 70 mA. Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi colocado em uma solução de nitrato de prata até o aparecimento nítido das bandas de proteínas.

3. RESULTADOS

Os organismos são constituídos de proteínas de vários tamanhos. Eles apresentam proteínas grandes de alto peso molecular e proteínas pequenas de baixo peso molecular. Em eletroforese em gel de poliacrilamida as proteínas de alto peso molecular são as proteínas que ficam na parte superior do gel, as de médio peso molecular se localizam na parte mediana do gel e as de baixo peso molecular são observadas na parte inferior do gel. A partir do extrato de ovo de *B. microplus*, foi feito eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (15%) e o resultado apresentou um perfil de várias proteínas, tanto de baixo peso molecular quanto de alto peso molecular, como mostrado na figura 1.

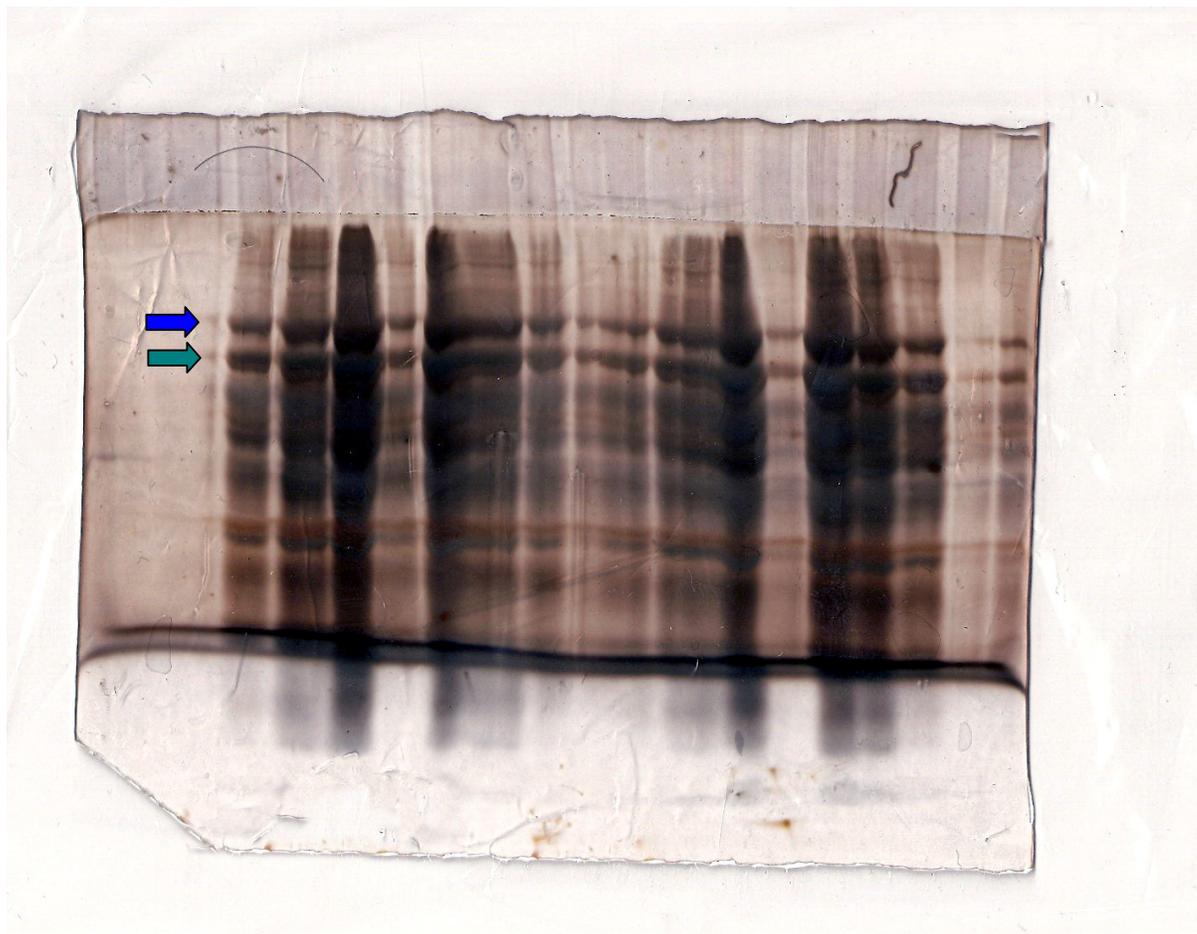


Figura 1 – Perfil de proteínas de alto e baixo peso molecular de ovo do carrapato *Bophilus microplus*
Fonte: Dados da pesquisa

Os extratos de ovo, quando analisados em SDS-PAGE, mostraram padrões de bandas protéicas similares para todas as amostras, com duas bandas majoritárias, seta azul e verde. Essa alta concentração de proteínas de alto peso molecular, como destacado com as setas azul e verde nos mostra que são proteínas que estão presentes no ovo em grande quantidade e podem ser um bom exemplo de antígenos protetores.

4. DISCUSSÃO

O *Boophilus microplus*, artrópode hematófago, é um ectoparasita de bovinos, importante vetor do complexo conhecido como "tristeza parasitária bovina", que, dependendo da intensidade da infestação parasitária, pode levar à morte do animal causando sérios prejuízos ao sistema de produção (HORN, 1987).

O uso de acaricidas vem sendo a medida de controle profilático e terapêutico mais comum contra esses ectoparasitos. Os principais problemas relacionados a essa prática dizem respeito ao desenvolvimento de linhagens resistentes de carrapatos, ao aparecimento de resíduos químicos nos produtos de origem animal (principalmente leite e carne) e à poluição ambiental proveniente do uso dos acaricidas no controle (BULLMAN *et. al* (1996).

Características bioquímicas de muitas moléculas produzidas por carrapatos já foram obtidas, no entanto, o seu complexo papel na interação entre os parasitos e hospedeiros ainda não foi completamente descrito. Os conhecimentos disponíveis permitem identificar uma série de mecanismos utilizados pelo carrapato para se alimentar com sucesso, contornando a homeostasia e a resposta inflamatória do hospedeiro bem como as ações deste para evitar a infestação pelos carrapatos (RIBEIRO, 1995; QIAN *et. al*, 1998; SAUER *et. al*, 2000).

O controle do carrapato por meio de vacina, baseado na observação de ocorrência de resistência natural do bovino, adquirida depois de repetidas infestações com o ectoparasita é uma alternativa com base nos resultados já alcançados (ROBERTS, 1968; WAGLAND, 1975; WILLADSEN *et. al*, 1989; BARRIGA *et. al*, 1993). Dentro deste cenário, a indução da resposta imune em bovinos contra moléculas ou proteínas relacionadas com a fixação das larvas do carrapato pode dificultar a fixação das larvas no hospedeiro, impedindo o seu desenvolvimento.

Os ovos de carrapatos *B. microplus* são fontes ricas em proteínas. As concentrações dos antígenos no ovo do carrapato *B. microplus* diminuem rapidamente no início da fase de vida parasitária, sugerindo que os antígenos seriam secretados no interior do hospedeiro após a fixação da larva no hospedeiro (WILLADSEN e RIDING, 1980).

CONCLUSÕES

O ovo do carrapato *Boophilus microplus* contém várias proteínas de massas moleculares (baixo e alto peso molecular).

1. Em todas as amostras estavam presentes proteínas da fase de vida livre do *B. microplus* e são processadas durante o seu desenvolvimento.
2. As proteínas com alta massa molecular apresentam uma maior concentração em relação às de baixo peso molecular, indicando que poderiam ser consumidas durante o desenvolvimento embrionário.

Abstract

The tick engorged female cause major economic damage to Brazilian cattle farm according to the plundering of cattle and the high operational cost of current techniques of control. Proteins extracted from eggs, ticks can be used as tools to control them. To evaluate the potential of antigens imunoprotector of tick studies have been conducted for extraction of proteins from eggs of tick *B. microplus*. The eggs used in experiments were from a colony of ticks maintained in the Laboratory of Genetics of FAPAM. The antigens were isolated by their molecular weight evaluated by gel electrophoresis, SDS-polyacrylamide. The eggs of *B. microplus* presented a profile of protein and varied with different molecular weights, which will be purified for analysis imunoprotectors the next job.

World-Key: tick; antigen; vaccine; *Boophilus microplus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**, Editora Manole Ltda, 1986.

BARRIGA OO, Silva SS, Azevedo JSC. *Inhibition and recovery of tick functions in cattle repeatedly infested with Boophilus microplus*. J Parasitol 1993;79(5):710-15.

BARRIGA, O.O. *Evidence and mechanisms of immunosuppression in tick infestations*. **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering** 15: 139-142, 1999.

BULLMAN GM, Muños Cabenas ME, Ambrústolo, RR. *El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa*. Veterinária Argentina 1996;8 (127):3-15.

HORN, S. *Ectoparasites of animals and their impact on the economy of South America*. In: **World Veterinary Congress**, Proceedings 23 Montreal, 1987.

QIAN Y, Yuan J, Essenberg RC, Bowman AS, Shook AL, Dillwith JW, Sauer JR. *Prostaglandin E2 in the salivary glands of the female tick, Amblyomma americanum (L.): calcium mobilization and exocytosis*. Insect Biochem Mol Biol. 1998;28(4):221-8

RIBEIRO JM. **How ticks make a living**. Parasitology Today 1995;11 (3)91-3.

ROBERTS JA. *Acquisition by the host of resistance to the cattle tick, Boophilus microplus (Canestrini)*. Journal Parasitol 1968;54(4):657-62.

SAUER JR, Essenberg RC, Bowman AS. **Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion.** J Insect Physiol 2000; 46:1069-78.

WAGLAND BM. *Host resistance to cattle tick (Boophilus microplus) in Brahman (Bos Indicus) cattle. I Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20.000 larvae.* Aust J Agric Res 1975;26:1073-80.

WILLADSEN P, Riding GA. *On the biological role of a proteolytic-enzyme inhibitor from the ectoparasitic tick Boophilus microplus.* Biochem J 1980;189:295-303.

WILLADSEN, P. and KEMP, D.H. **Vaccination with "concealed" antigens for tick control.** Parasitology Today 4: 196-198, 1988.

WILLADSEN P, Riding GA, McKenna RV, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN et al. *Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from Boophilus microplus.* J Immunology 1989; 143:1346-51.

WILLADSEN, P and JONGEJAN, F. **Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases.** Parasitology Today 15: 258-262, 1999.