

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**CLONAGEM, CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO DE cDNAs SIMILARES A
CALRETICULINA E PARAMIOSINA ISOLADOS DE GLÂNDULA SALIVAR DO
CARRAPATO *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887)**

CARLOS ALEXANDRE SANCHEZ FERREIRA

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor.

Orientador: Dra. Aoi Masuda

Porto Alegre
2002

Dissertação defendida e aprovada, em 11 de julho de 2002, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Departamento de Bioquímica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Odir Antônio Dellagostin

Centro de Biotecnologia

Universidade Federal de Pelotas

Dra. Aparecida Sadae Tanaka

Departamento de Bioquímica

Universidade Federal do Estado de São Paulo

AGRADECIMENTOS

A Dra. Aoi Masuda pela orientação e oportunidade.

A todos os colegas e amigos do laboratório e do Centro de Biotecnologia pela amizade e apoio.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Centro de Biotecnologia pela ajuda de sempre.

Aos meus pais e irmão, pela solidariedade e companheirismo que nunca faltaram.

A Marta, por tudo, principalmente paciência.

A todas as outras pessoas que de alguma forma auxiliaram para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com apoio financeiro da CAPES, PADCT/CNPq, CNPq, FAPERGS e PRONEX.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO.....	8
1.1 O Carrapato <i>Boophilus microplus</i>	8
1.2 Ciclo de Vida.....	8
1.3 Importância Econômica.....	10
1.4 Métodos de Controle.....	10
1.4.1 Controle Químico.....	10
1.4.2 Controle Biológico.....	11
1.4.3 Controle Imunológico.....	13
1.4.3.1 Resistência “Natural” e Interações Parasita- Hospedeiro.....	13
1.4.3.2 Resistência Induzida Artificialmente.....	17
1.5 Antígenos Salivares.....	22
1.5.1 Calreticulina.....	23
1.5.2 Paramiosina.....	25
1.6 Objetivos.....	26
ARTIGO 1.....	28
Abstract.....	29
Introduction.....	29
Material and Methods.....	31
Results.....	37
Discussion.....	41

Figures.....	46
References.....	54
ARTIGO 2.....	60
Abstract.....	61
Introduction.....	61
Material and Methods.....	63
Results.....	68
Discussion.....	71
Figures.....	75
References.....	82
DISCUSSÃO.....	89
CONCLUSÕES.....	100
PERSPECTIVAS.....	102
BIBLIOGRAFIA.....	103
ANEXO – ARTIGO 3.....	118
Abstract.....	119
Introduction.....	119
Material and Methods.....	120
Results and Discussion.....	121
References.....	125

RESUMO

O carrapato *Boophilus microplus* é um dos mais importantes ectoparasitas dos rebanhos bovinos, estando em todas as áreas tropicais e subtropicais entre o paralelo 32 °N e 32 °S, abrangendo regiões que se dedicam à pecuária na América, África, Ásia e Oceania. O controle do carrapato *B. microplus* é realizado principalmente com o uso de acaricidas, entretanto devido a crescente preocupação com os problemas criados pela poluição química do ambiente, ao alto custo e toxicidade das drogas e ao aparecimento de carrapatos resistentes aos acaricidas, alternativas para o controle do *B. microplus* devem ser encontradas. A sobrevivência dos carrapatos depende grandemente da sua capacidade de evadir o sistema imunológico dos hospedeiros, portanto antígenos da glândula salivar poderiam ser alvos para intervenção imunoprolifática. Neste trabalho foram isolados cDNAs não previamente descritos correspondentes a antígenos presentes na glândula salivar. cDNAs que codificam para proteínas similares a paramiosina e calreticulina foram seqüenciados, expressos em *Escherichia coli* e as proteínas recombinantes purificadas, tendo sido produzidos soros policlonais contra as proteínas recombinantes em coelhos. As seqüências foram caracterizadas e alinhamentos múltiplos com outras seqüências foram determinados. O gene da calreticulina mostrou ser expresso em todos os estágios e tecidos testados, tanto em experimentos de RT-PCR quanto de Western blot, tendo sido demonstrado também a sua secreção pela saliva. Análise filogenética indica o agrupamento do gene de *B. microplus* com seqüências de outros artrópodos. Soros de bovinos infestados não reconhecem a calreticulina recombinante, apesar dela ser reconhecida pelo soro de cães infestados pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. A paramiosina mostrou-se, em ensaios de Western blot, também estar presente em todos os estágios testados, porém não na saliva. A paramiosina recombinante foi capaz de ligar colágeno e IgGs. Ambas as proteínas correspondem a proteínas multi-funcionais possivelmente envolvidas na imunomodulação do hospedeiro, tendo sido sugeridas como imunógenos protetores contra outros parasitas.

ABSTRACT

The tick *Boophilus microplus* is one of the most important ectoparasite of cattle, present in tropical and subtropical areas of America, Asia, Africa and Oceania. Control methods rely mainly on the use of acaricides. However, these methods are expensive due to costs of both drugs and labor required to apply the treatment. Moreover, there are observations of tick isolates resistant to the acaricides. In view of these problems other alternatives are being studied. Tick survival depends largely on its capacity to evade the immunologic system of their hosts, so salivary gland antigens are promising targets to immunoprophylactic intervention. In this work it was isolated cDNAs corresponding to salivary gland antigens not yet described in *B. microplus*. Two cDNAs coding for proteins similar to paramyosin and calreticulin, were sequenced, expressed in *Escherichia coli*, and the recombinant proteins purified. Polyclonal antisera against the recombinant proteins were raised in rabbits. The sequences obtained were characterized and multiple alignments with other sequences were performed. Expression analyses of the calreticulin gene in different developmental stages and tissues were performed by RT-PCR and Western blot, which indicated a ubiquitous expression of the gene and demonstrated its presence in saliva. A phylogenetic analysis indicates the clustering of the *B. microplus* sequence with those of other arthropods. Infested bovine sera do not recognize the recombinant calreticulin, although it is recognized by sera of *Rhipicephalus sanguineus* infested dogs. Paramyosin also showed, in a Western blot assay, to be present in all developmental stages and tissues tested, but not in saliva. The recombinant paramyosin was able to bind collagen and IgGs. Both proteins are multifunctional proteins possibly involved in the host immunomodulation, being suggested as protective immunogens against other parasites.

INTRODUÇÃO

1.1 O Carrapato *Boophilus microplus*

O carrapato *Boophilus microplus* é um ectoparasita hematófago de mamíferos (família Ixodidae - carrapatos duros) que se constitui em um dos grandes problemas para a criação extensiva de bovinos. Sua distribuição no mundo inclui os grandes rebanhos comerciais da América, África, Ásia e Oceania, entre os paralelos 32 °N e 32 °S (GONZALES, 1995), sendo considerado o carrapato de maior significado econômico e o principal alvo em programas de controle e erradicação nos rebanhos da América do Sul (NARI, 1995). Além do bovino, o *B. microplus* pode eventualmente completar seu ciclo em outros animais, como a ovelha, o cavalo, o búfalo e o veado (GONZALES, 1995), sempre completando o seu desenvolvimento em apenas um hospedeiro.

1.2 Ciclo de Vida

O ciclo de vida do *B. microplus* pode ser dividido em duas fases: a fase de vida livre e a fase de vida parasitária.

A fase de vida livre inicia-se quando o carrapato fêmea adulto e ingurgitado se desprende do hospedeiro e cai ao solo. Após um período inicial de pré-postura, o qual dura entre 2 e 3 dias, dependendo do volume de sangue ingerido (NAGAR, 1968) e da temperatura ambiente (OLIVEIRA et al, 1974), o carrapato fêmea inicia a postura que pode chegar a 3.000 ovos (GONZALES, 1995), morrendo logo após o término do processo. Em condições ideais de temperatura (28 °C) e umidade relativa (85 %) a postura e eclosão dos ovos ocorrem em aproximadamente 18 dias. As larvas migram por geotropismo

negativo para as extremidades da vegetação, onde localizam o hospedeiro pelo odor, vibrações, sombreamento, estímulo visual (WALADDE & RICE, 1982) e dióxido de carbono expirado (SONENSHINE, 1993). As larvas têm seu tempo de sobrevivência influenciado pelas condições de temperatura e umidade a que estiverem submetidas (LONDT & WHITEHEAD, 1972). A fase de vida livre termina quando a larva encontra o hospedeiro.

A fase de vida parasitária do *B. microplus* dura em média 21 dias, onde passa pelos estágios de larva, ninfa e adulto em um único hospedeiro. As larvas migram para determinadas regiões corporais, como a região posterior das coxas e as regiões perianal e perivulvar, as quais são mais propícias para o seu desenvolvimento em virtude da espessura, vascularização e temperatura da pele, bem como pela dificuldade de “grooming” do hospedeiro (WAGLAND, 1978; CORDOVÉS, 1996). Em aproximadamente 7 dias sofrem uma ecdise transformando-se em ninfas. Em mais 8 dias ocorre uma nova ecdise dando origem a carrapatos adultos com dimorfismo sexual. Após o acasalamento a fêmea começa a alimentar-se até o seu ingurgitamento total e queda ao solo, enquanto que o macho permanece no hospedeiro à procura de novas fêmeas (ROBERTS, 1968b). Os carrapatos adultos machos recebem a denominação de neandros logo após a ecdise e, de gonandros quando atingem o seu tamanho máximo. Já as fêmeas adultas são denominadas de neóginas (logo após a ecdise), partenóginas (parcialmente ingurgitadas) e teleóginas (ingurgitadas) (GONZALES, 1995).

1.3 Importância Econômica

O *B. microplus* causa, com sua distribuição em regiões tropicais e subtropicais, os maiores impactos econômicos nos rebanhos bovinos da América do Sul, América Central e Oceania (COBON & WILLADSEN, 1990). Sua ação expoliativa, que corresponde a perda pelo bovino de 2 a 3 ml de sangue por fêmea do carrapato (GONZALES, 1995), causa queda na produção de leite e carne, com perda média anual de 0,24 kg de peso vivo por carrapato (SUTHERST et al, 1983). São também transmissores dos parasitas protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e de riquetsias do gênero *Anaplasma*, que são os agentes causadores da doença denominada tristeza parasitária bovina (HORN & ARTECHE, 1985). Além disso, o *B. microplus* causa danos ao couro dos bovinos pelas reações inflamatórias provocadas no local de fixação (SEIFERT et al, 1968; HORN & ARTECHE, 1985). Estima-se que, anualmente, as perdas decorrentes da infestação pelo *B. microplus* cheguem a 1 bilhão de dólares americanos no Brasil (GOMES, 1998).

1.4 Métodos de Controle

1.4.1 Controle Químico

O controle do carrapato tem sido praticamente dependente do uso de acaricidas, e o aparecimento de isolados resistentes a estas drogas representa um sério problema para a saúde e produção animal em várias partes do mundo (SOLOMON, 1983). Foram utilizados seqüencialmente, a partir da década de 30, acaricidas baseados em compostos arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidinas e piretróides. Atualmente, as drogas mais utilizadas como carrapaticidas são os derivados de piretróides, de

ivermectinas e, mais recentemente, a benzoil fenil uréia (HÄUSERMANN et al, 1992). O aparecimento de populações resistentes a diferentes princípios químicos (SOLOMON, 1983; NOLAN et al, 1989; GONZALES, 1995) tem dificultado o controle do carrapato, sendo que desde 1989 já há descrição de isolados resistentes aos piretróides (ALVES BRANCO et al, 1992), o princípio ativo dos produtos mais utilizados atualmente. Devido ao rápido aparecimento de resistência, o alto custo das drogas e da mão-de-obra na aplicação destes produtos, além da permanência de resíduos nos alimentos de origem bovina e no meio ambiente, torna-se necessária à procura de outras formas de controle (NOLAN, 1985).

1.4.2 Controle Biológico

O *B. microplus*, assim como qualquer organismo vivo, tem sua viabilidade condicionada às condições de estresse a que estiver submetido. Portanto, fatores ambientais não favoráveis, principalmente com relação à temperatura e à umidade relativa do ar, podem reduzir consideravelmente o número de larvas viáveis e, conseqüentemente, os índices de infestação dos bovinos (GONZALES, 1995).

O tipo de vegetação é um dos fatores importantes capazes de influenciar o tamanho das populações de carrapatos. Pastagens nativas com vegetação arbustiva proporcionam abrigo a fêmeas em postura, enquanto que algumas pastagens, por serem tóxicas, repelentes ou por imobilizarem as larvas através de secreções ou estruturas da planta, podem limitar bastante o número de carrapatos. Em especial, o plantio de gramíneas do gênero *Stylosanthes* (SUTHERST et al, 1982) e do capim gordura (*Melinis minutiflora*) (FARIAS et al,

1986) podem contribuir consideravelmente para o controle do carrapato. Uma estratégia que pode ser viável utilizando os conhecimentos sobre o ciclo biológico do carrapato é a rotatividade de pastagens (NORTON et al, 1983). ELDER et al (1980) concluíram que, apesar deste método ser utilizado principalmente devido à necessidade do manejo do solo para atividades agrícolas, pode também ser empregado com relativo sucesso nas práticas de controle do parasita.

Os carrapatos são alvo de uma série de predadores, dentre os quais deve-se salientar a garça vaqueira (*Egretta ibis*), a qual pode comer até 450 fêmeas por dia (ALVES-BRANCO et al, 1983) e formigas carnívoras que devoram fêmeas no solo (GONZALES, 1995). Pequenos roedores também podem destruir ovos e larvas nas pastagens (HOLM & WALLACE, 1989). Vários microorganismos potencialmente patogênicos podem ser encontrados em carrapatos (MEGAW, 1978; BRUM, 1988), tendo sido utilizada a bactéria *Cedecea lapagei* em experimentos de infecção “in vitro” de teleóginas, verificando-se uma diminuição de 47,7 % no número de ovos postos. Nas fêmeas que não realizaram postura foi observada a destruição de epitélio vaginal (BRUM, 1988). O uso de fungos no controle biológico de carrapatos também tem sido abordado (KAAYA et al, 1996; ZHIOUA et al, 1997). Especificamente em relação ao *B. microplus*, FRAZZON et al (2000) relataram mortalidade de até 100 % dos carrapatos infectados com esporos de *Metarhizium anisopliae*.

Estudos sobre a ecologia dos carrapatos também auxiliam a otimizar os tratamentos químicos, a manipulação ambiental e as estratégias que utilizam a imunidade dos hospedeiros, baseando-se principalmente nas flutuações dos picos sazonais de abundância destes parasitas (SPICKETT, 1994).

1.4.3 Controle Imunológico

1.4.3.1 Resistência “Natural” e Interações Parasita-Hospedeiro

Os sistemas parasitários existentes refletem em maior ou menor grau o sucesso da relação parasita/hospedeiro, cujo último grau é a simbiose, pois nesta tanto o parasita (simbionte) como o hospedeiro estão em um estado ideal de sobrevivência. Com relação ao *B. microplus* e seu hospedeiro preferencial, o bovino, a história entre eles explica muito da resistência encontrada nos rebanhos comerciais. Originário do sudeste asiático, parasitando artiodáctilos de florestas, o *B. microplus* acabou adaptando-se ao gado *Bos indicus*, o qual, por sua vez, sugere-se ter evoluído a um considerável grau de resistência. Com a difusão deste carrapato para outros continentes ocorreu o contato com o gado *Bos taurus* iniciando uma nova relação parasitária. Os novos hospedeiros mostraram possuir um grau de resistência bem menor possivelmente devido à falta de um contato evolutivo prévio (TATCHELL, 1987).

É reconhecida a existência de condições de resistência ao carrapato em bovinos e que sua origem não é inata, e sim adquirida durante as sucessivas infestações pelo parasita (ALLEN, 1994). A expressão da resistência nos bovinos em relação a infestações de carrapatos é demonstrada de várias formas. As reações de hipersensibilidade no local de fixação do carrapato geram uma série de comportamentos no hospedeiro como lambar, roçar e friccionar estas regiões (“grooming”), causando a queda ou esmagamento dos parasitas. Reações celulares de defesa no local da lesão também diminuem a percentagem de carrapatos que sobrevivem após fixação (DE CASTRO & NEWSON, 1993). Foi demonstrado, entretanto, que uma grande parte da

resistência se manifesta durante as primeiras 24 horas de fixação das larvas no hospedeiro (ROBERTS, 1968b). Animais muito resistentes conseguem rejeitar 99 % das larvas (ALLEN, 1994), enquanto que animais suscetíveis conseguem rejeitar somente entre 80 % e 85 % das larvas (TATCHELL, 1987).

Essa resistência dita “natural” foi inicialmente especulada como decorrente de um mecanismo fisiológico inato, como secreções sebáceas repelentes, tipos de pele e pelos e/ou substratos não compatíveis com enzimas digestivas dos carrapatos (ROBERTS, 1968a). Entretanto vários experimentos comprovaram que esta resistência envolve reações imunológicas. Foi observado por TRAGER (1939) que cobaias e coelhos infestados com o carrapato *Dermacentor variabilis* adquiriram resistência, e que esta era parcialmente transferível com a inoculação do soro de animais resistentes em animais suscetíveis. Já a transferência de células de linfonodos de cobaias, tornadas resistentes por repetidas infestações com *Dermacentor andersoni*, para cobaias suscetíveis, produziu uma resistência significativamente maior do que a inoculação do soro, levando a conclusão que, além da resposta humoral, a resposta celular também está presente e aparentemente é mais eficiente (WIKEL & ALLEN, 1976a). Também foi demonstrado que a resistência pode ser eliminada com o uso do imunossupressor ciclofosfamida (WIKEL & ALLEN, 1976b). Parte desta resistência também é perdida em cobaias utilizando-se o fator de veneno de cobra, indicando o envolvimento também do sistema complemento na resposta contra o carrapato (WIKEL & ALLEN, 1977). Com relação a bovinos, a resistência ao *B. microplus* foi inicialmente indicada como decorrente de reações imunológicas por ROBERTS (1968a). Posteriormente foi comprovado que tanto o *B. taurus* como o *B. indicus*, não previamente expostos

ao carrapato, eram igualmente suscetíveis na primeira infestação (WAGLAND, 1975). Uma das diferenças entre estes animais quanto à resistência ao carrapato é, portanto, ao nível da resposta imunológica, a qual é mais eficaz no *B. indicus* do que no *B. taurus*.

As infecções parasitárias freqüentemente são caracterizadas pelo aparecimento de anticorpos e imunidade celular contra vários antígenos do parasita, os quais são muitas vezes imunodominantes e não essenciais à sua sobrevivência. Os parasitas desenvolveram, portanto, maneiras de evadir ou suprimir respostas imunes contra moléculas essenciais a sua sobrevivência (WIKEL et al, 1994). A saliva de artrópodos hematófagos, neste sentido, possui propriedades anti-hemostáticas, vasodilatatórias, antiinflamatórias e imunossupressoras, facilitando a sua alimentação e a aquisição e transmissão de patógenos (RIBEIRO, 1989; LAW et al, 1992; CHAMPAGNE, 1994). Portanto não é surpreendente que os carrapatos, possivelmente por se manterem fixos ao hospedeiro por um período extenso, tenham desenvolvido maneiras de reduzir a competência imune do hospedeiro (WIKEL et al, 1994; CHAMPAGNE, 1994). A resposta imunológica dos hospedeiros contra carrapatos envolve células apresentadoras de antígenos, citocinas, linfócitos B e T, anticorpos, granulócitos, entre outras células e moléculas. Os carrapatos, por sua vez, conseguem inibir respostas humorais, ativação do sistema complemento, proliferação de linfócitos T e a produção de citocinas por macrófagos e linfócitos (WIKEL, 1999). A saliva do carrapato *Ixodes dammini* inibe várias funções de neutrófilos, como agregação induzida por anafilatoxina, secreção de grânulos enzimáticos, secreção de superóxidos e a fagocitose de espiroquetas *Borrelia burgdorferi* (RIBEIRO et al, 1990). A saliva dos carrapatos do gênero *Ixodes* também é

capaz de inibir o sistema complemento de diversos hospedeiros (RIBEIRO, 1987; LAWRIE et al, 1999; VALENZUELA et al, 2000), tendo as diferentes capacidades de inibição sido correlacionadas com a amplitude de hospedeiros que uma espécie é capaz de parasitar (LAWRIE et al, 1999). Já foi descrito em várias espécies de carrapatos a presença de prostaglandinas (vasodilatadores) (revisado por LAW et al, 1992 e CHAMPAGNE, 1994), as quais aparentemente auxiliam a reverter o efeito dos vasoconstritores liberados pelas plaquetas e/ou aumentar o fluxo sanguíneo na pele (LAW et al, 1992). Infestações com o *B. microplus*, tanto de baixa densidade como muito intensas, causam uma resposta menor dos linfócitos periféricos de bovinos a fitohemaglutinina (mitógeno de linfócitos T). O mesmo resultado é obtido “in vitro” utilizando-se saliva e extrato de glândula salivar do *B. microplus*, sugerindo a existência de imunossuppressores de linfócitos T no aparato salivar do carrapato (INOKUMA et al, 1993). A maioria das espécies de carrapato estudadas apresenta inibidores do fator Xa e/ou trombina da cascata da coagulação (SAUER et al, 2000), tendo sido descrito um inibidor de trombina no *B. microplus* (HORN et al, 2000). Já foi isolado em carrapatos um inativador de bradicinina (RIBEIRO & MATHER, 1998) e proteínas ligantes de histamina (PAESEN et al, 1999), que tendem a diminuir a dor e coceira no local de fixação e, portanto, minimizar o “grooming” do hospedeiro. Já foram descritas também a inibição da atividade de células NK (KUBES et al, 2002), atividade anti-interleucina 8 (HAJNICKA et al, 2001) e inibição da produção de interferon- γ (KOPECKY et al, 1999) por extratos de glândulas salivares de várias espécies de carrapato.

Entre os mecanismos de evasão dos carrapatos também deve-se citar a aparente secreção de imunoglobulinas no hospedeiro. É sugerido um

mecanismo de seqüestro de imunoglobulinas no intestino e transporte até as glândulas salivares, onde elas seriam excretadas pela saliva (WANG & NUTTALL, 1994, 1995, 1999).

1.4.3.2 Resistência Induzida Artificialmente

Uma vez demonstrada a natureza imunológica da resistência foram realizados muitos trabalhos relatando experimentos de imunização de hospedeiros contra carrapatos. Porém, comparando os resultados das imunizações com os de infestações sucessivas na indução da resistência é possível notar diferenças marcantes. Enquanto grande parte da resistência adquirida por infestações se deve à rejeição das larvas pelo hospedeiro, na sua maior parte mediada por hipersensibilidade imediata, após imunizações com extratos de intestino ou de fêmeas adultas inteiras praticamente não se verifica qualquer tipo de dano nas larvas. Por outro lado os estágios adultos são bem mais afetados quando são utilizados animais vacinados, notando-se, além de maior mortalidade, efeitos no grau de ingurgitamento, na proporção peso corporal das fêmeas/peso dos ovos e viabilidade dos ovos (WILLADSEN, 1987; KEMP et al, 1986). Também é observada a presença de danos físicos. AGBEDE & KEMP (1986) utilizando extratos proteicos de fêmeas adultas de *B. microplus* na imunização de bovinos, estudaram a histopatologia dos carrapatos ingurgitados nestes animais. O intestino foi o primeiro sítio onde foram verificados danos nos carrapatos, ocorrendo a destruição ou escarificação para o lúmen das células digestivas, permanecendo somente a lâmina basal e a camada muscular. Com a ruptura do intestino ocorre a passagem de eritrócitos e/ou hemoglobina para a hemolinfa, dando um aspecto avermelhado aos

carrapatos. Com o vazamento de elementos do sistema imune do hospedeiro para a hemolinfa outros tecidos são atacados, como músculos e túbulos de Malpighi, não ocorrendo danos às glândulas salivares. Os machos, além da mortalidade aumentada, apresentaram danos no intestino e na glândula reprodutiva acessória. Esses efeitos não foram observados nos casos de resistência adquirida por infestações.

Com relação ao tipo de resposta apresentada por animais vacinados, utilizando parasitas alimentados “in vitro” com o soro destes animais, com e sem a adição de leucócitos, foi mostrado que a resistência é mediada por anticorpos, com nenhuma ou pouca participação do sistema imune celular (WILLADSEN, 1987). Entretanto análises histológicas indicam que os danos aos músculos e túbulos de Malpighi das fêmeas e glândula reprodutiva acessória dos machos de *B. microplus* são causados por granulócitos, sendo sugerido que estes tenham alguma função no sucesso da vacinação (AGBEDE & KEMP, 1986). KEMP et al (1986) demonstram “in vitro” que o sistema complemento é essencial para os efeitos da vacinação.

Antígenos de glândula salivar de *D. andersoni* foram utilizados para imunizar cobaias por diferentes vias, com ou sem adjuvantes, induzindo um considerável grau de resistência, o qual foi expresso como uma diminuição do número e peso das larvas ingurgitadas (WICKEL, 1981). Cobaias imunizadas com glândula salivar e cemento de *A. americanum* apresentaram um grau de resistência, quando desafiadas, similar à obtida por cobaias infestadas repetidamente. Foi sugerido que uma proteína de 20 kDa presente na glândula salivar seria a responsável pela maior parte desta proteção (BROWN et al, 1984).

Inoculações com antígenos de membrana extraídos do intestino médio de *B. microplus* induziram uma proteção média de 91 %, calculada pelo peso médio dos ovos dos carrapatos de animais vacinados e o peso médio dos ovos dos carrapatos de animais controles (OPDEBEECK et al, 1988). Porém, a imunização de gado Hereford com antígenos de carrapatos adultos e larvas de *B. microplus*, purificados por cromatografia de imunoafinidade utilizando como ligantes imunoglobulinas geradas por imunização de bovinos com antígenos de intestino, resultou em uma proteção menor, correspondente a 83 % e 85 %, respectivamente (OPDEBEECK et al, 1989). A partir destes resultados OPDEBEECK et al (1989) sugerem que: 1) antígenos protetores podem estar presentes no carrapato em vários estágios de desenvolvimento e/ou 2) que haja epitopos comuns entre proteínas larvais e de carrapatos adultos.

Foi demonstrado que o nível de anticorpos contra antígenos de intestino, induzidos por imunização artificial, era significativamente maior em animais protegidos que os encontrados em animais não protegidos (OPDEBEECK et al, 1988). Entretanto JOHNSTON et al (1986) não conseguiram correlacionar, por radioimunoensaios, as respostas humorais com proteção e JACKSON & OPDEBEECK (1995), estudando o efeito de vários adjuvantes nas respostas imunes humorais contra antígenos de membrana de intestino, concluíram que a relação entre os níveis de anticorpos contra o carrapato e a proteção induzida não parece ser de causa e efeito. Imunizações com antígenos de membrana de ovos de *B. microplus* não resultaram em proteção significativa de bovinos ao desafio, apesar de induzirem altos níveis de anticorpos nos animais vacinados e destes reconhecerem antígenos de membrana do intestino (KIMARO & OPDEBEECK, 1994).

WILLADSEN & KEMP (1988), referindo os antígenos do intestino, conceituaram o termo vacinação contra “antígenos ocultos” em carrapatos. Estes “antígenos ocultos” teriam duas características principais: 1) não estimulariam respostas imunes durante infestações naturais, pois ficariam “ocultos” do sistema imune do hospedeiro devido a sua localização no parasita; 2) porém, no hospedeiro vacinado contra estes antígenos, os anticorpos e outros fatores imunológicos que estariam presentes no sangue ingerido causariam danos e inibição de sua(s) função(ões) (WILLADSEN & KEMP, 1988; WILLADSEN et al, 1993). Preenchendo os requisitos deste conceito o primeiro “antígeno oculto” isolado em carrapatos foi a proteína Bm86, uma glicoproteína ligada a membrana, com peso molecular aparente de 89 kDa e ponto isoelétrico entre 5,1 e 5,6, presente no intestino e que foi denominada Bm86 (WILLADSEN et al, 1989). O cDNA correspondente a esta proteína foi clonado e seqüenciado, tendo mostrado similaridade com o fator de crescimento epidérmico (RAND et al, 1989). Foi demonstrado que o soro de bovinos vacinados com Bm86 inibe fortemente a endocitose de células digestivas (WILLADSEN et al, 1989). Porém, utilizando técnicas de imunocitoquímica foi mostrado que a Bm86 se localiza principalmente nas microvilosidades intestinais e não, como seria esperado se a Bm86 fosse um receptor envolvido na endocitose, junto às vesículas e fendas de pinocitose. A inibição da endocitose, portanto não é um indicativo da função da Bm86 (GOUGH & KEMP, 1993). A seqüência de nucleotídeos codificante da Bm86 vem sendo utilizada para a produção de diferentes versões da proteína recombinante, no intuito do desenvolvimento de maiores graus de proteção. O gene da Bm86 foi clonado e expressado em *Escherichia coli* (RAND et al, 1989), em fungos filamentosos (*Aspergillus nidulans* e *A. niger*) (TURNBULL et al,

1990), em baculovírus (RICHARDSON et al, 1993) e *Pichia pastoris* (RODRÍGUEZ et al, 1994). Atualmente, existem no mercado duas vacinas baseadas no antígeno Bm86. Em 1993, foi lançada a GAVAC[®], pela Heber Biotec (Cuba), desenvolvida pelo Centro de Ingeniería Genética e Biotecnología, de Havana (Cuba) e, em 1994, foi lançada, pela Biotech Australia Pty Ltd (Austrália), a TickGARD[®], desenvolvida pela Divisão de Ciência de Animais Tropicais do CSIRO. O índice de proteção induzido por ambas varia de 55% a 87%, dependendo do isolado de carrapato presente na região. Entretanto as vacinas contendo a Bm86, apesar de conferirem proteção parcial aos bovinos contra futuras infestações por *B. microplus*, não asseguram ao rebanho o grau de proteção desejado e necessário na produção bovina (WILLADSEN et al, 1996).

Outro antígeno protetor isolado de *B. microplus* é a proteína Bm91. Esta proteína é glicosilada, possui uma massa molecular aparente de 86 KDa e um ponto isoelétrico entre 4,8 e 5,2, sendo encontrada em baixa concentração nas glândulas salivares e intestino de fêmeas adultas. Seqüências parciais da proteína mostram uma similaridade considerável com enzimas conversoras de angiotensina de mamíferos, sugerindo que ela tenha função enzimática. Esta proteína não é reconhecida por soros de animais cuja resistência foi adquirida por infestações sucessivas de carrapatos em condições naturais, sugerindo que ela representa outro exemplo de “antígeno oculto” (RIDING et al, 1994). Willadsen et al (1996) demonstraram a capacidade da Bm91 recombinante de aumentar a proteção induzida pela vacinação com a Bm86 recombinante. Apesar deste aumento ter sido pequeno, observou-se que a resposta produzida

contra a Bm91 não interfere na resposta contra a Bm86, indicando a possibilidade do uso de uma vacina poliantigênica.

Outros antígenos têm sido estudados, identificados e caracterizados quanto a suas potencialidades de induzirem proteção, já tendo sido descritos uma provável aspartato-endopeptidase (BYC-“*Boophilus* Yolk Cathepsin”; LOGULLO et al, 1998; DA SILVA VAZ et al, 1998), uma cisteína –endopeptidase (RENARD et al, 2000), uma proteína semelhante a mucina de vertebrados (MCKENNA et al, 1998) e a proteína de reserva do ovo, vitelina (TELLAM et al, 2002).

1.5 Antígenos Salivares

A saliva dos carrapatos, como já mencionado, possui várias atividades imunossupressoras e anti-hemostáticas que possibilitam a sua alimentação nos seus hospedeiros (RIBEIRO, 1995; BOWMAN et al, 1997; SAUER et al, 2000). Dessa forma, o uso de antígenos naturalmente expostos ao sistema imune como vacinas poderia elevar o nível das respostas imunológicas, eliminando a imunossupressão que normalmente acompanha a alimentação de ectoparasitas sugadores de sangue (OPDEBEECK, 1994). Poderia também impedir a transmissão de patógenos para os bovinos, como os indutores da tristeza parasitária bovina (BARRIGA, 1994; KAY & KEMP, 1994; BILLINGSLEY, 1994). Entretanto a identidade e função da maioria das moléculas associadas à glândula salivar ainda não foram elucidadas. A caracterização molecular e a expressão de versões “in vitro” dos antígenos naturais é um pré-requisito essencial para o estabelecimento de suas funções na fisiologia dos carrapatos e determinação de seus potenciais como imunógenos (MULENGA et al, 2000).

Com a finalidade de identificar e caracterizar antígenos de glândula salivar do *B. microplus* neste trabalho foi sintetizado uma biblioteca de cDNA a partir do RNA poli-A⁺ glândulas salivares de fêmeas parcialmente ingurgitadas (partenóginas). Esta biblioteca foi sondada com um anti-soro produzido contra extrato protéico de glândulas salivares de partenóginas. Em um primeiro experimento foram identificados três cDNAs, os quais revelaram-se corresponder a seqüências similares a glutathione-S-transferases (GSTs), paramiosinas e calreticulinas de outras espécies. O cDNA similar a GSTs foi expresso e caracterizado, conforme o(s) artigo(s) em anexo, porém não fez parte do tema central deste trabalho. A seguir uma descrição resumida das principais características das famílias das proteínas codificadas pelos outros dois cDNAs.

1.5.1 Calreticulina

A calreticulina é uma proteína capaz de ligar-se a cálcio, encontrada em um grande número de espécies e em todas as células nucleadas de mamíferos (MICHALAK et al, 1992), tendo sido demonstrado sua participação em uma ampla gama de funções celulares (MICHALAK et al, 1999). Ela apresenta-se subdividida em três domínios. O domínio N-terminal (domínio N) corresponde à região mais conservada entre as proteínas das diferentes espécies e é somente encontrada nesta família de proteínas (KRAUSE & MICHALAK, 1997). O domínio P é o domínio interno, o qual apresenta um sítio de ligação a cálcio de alta afinidade e baixa capacidade, apresenta sinal de localização nuclear e é encontrado em outras proteínas como a calnexina (BAKSH & MICHALAK, 1991; KRAUSE & MICHALAK, 1997). O domínio C-terminal (domínio C) é composto majoritariamente por resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico, sendo

altamente ácido. Apresenta alta capacidade / baixa afinidade de ligação a cálcio e também é encontrado em outras proteínas (MICHALAK et al, 1999). No carrapato *A. americanum* foi demonstrado a secreção de calreticulina pela saliva diretamente no hospedeiro, sendo sugerido que atue modulando o sistema imune e/ou hemostase do hospedeiro (JAWORSKI et al, 1995). Também foi citado que neste carrapato a calreticulina pode ser utilizada como biomarcador e que os níveis de anticorpos contra esta proteína podem estar diretamente relacionados com índices de ingurgitação do parasita (SANDERS et al, 1998; SANDERS et al, 1999).

A porção N-terminal da calreticulina humana, denominada vasostatina, mostrou-se capaz de inibir a proliferação de células endoteliais sem afetar outras linhagens, suprimir angiogênese in vivo, além de reduzir significativamente o linfoma de Burkitt e o carcinoma de cólon humano (PIKE et al, 1998). Foi demonstrado posteriormente que a calreticulina completa apresenta as mesmas atividades, que foram mapeados como presentes na região entre os aminoácidos 120 e 180 da porção N-terminal, confirmando seu potencial como inibidor da angiogênese patológica e na supressão de tumores (PIKE et al, 1999).

O uso potencial da calreticulina como imunógeno em parasitas já foi sugerido contra *Necator americanus* (PRITCHARD et al, 1999) e *Schistosoma* spp (HAWN et al, 1993; KHALIFE et al, 1994; HUGGINS et al, 1995; GENGEHI et al, 2000), além do carrapato *A. americanum* (JAWORSKI et al, 1995).

1.5.2 Paramiosina

Paramiosina é uma proteína muscular encontrada em todas as espécies de invertebrados estudados (MAROTO et al, 1995; BECKER et al, 1992), não possuindo nenhum homólogo conhecido em vertebrados. Apresenta similaridade com a cadeia pesada de miosina, tanto em seqüência como na estrutura. Esta proteína é uma molécula em forma de bastão, sendo formada em sua maior parte por uma α -hélice, através da qual dois monômeros, normalmente em torno de 95-103 kDa, interagem na formação de um dímero (KAGAWA et al, 1989). A função da paramiosina em músculo de invertebrados não é totalmente conhecida. Em moluscos, altos níveis de paramiosina no músculo têm sido relacionados com o estado fisiológico conhecido como “catch mechanism”. Esta condição permite longos períodos de tensão muscular com uma quantidade reduzida de energia. Porém a paramiosina está também presente em músculos de invertebrados que não apresentam este mecanismo (LEVINE et al, 1983; HINKEL-AUST et al, 1990). Em *Caenorhabditis elegans* a paramiosina é essencial para a montagem correta e funções da musculatura de sua parede corporal (WATERSON et al, 1977). A presença de isoformas tem sido relatada, em especial a denominada miniparamiosina (BECKER et al, 1992), a qual foi descrita como o resultado de transcritos alternativos do gene da paramiosina, e, apesar de compartilhar a maior parte de sua seqüência com ela apresenta um pI maior (7,8 em *Drosophila melanogaster*; a paramiosina apresenta um pI em torno de 5,4) e uma massa molecular menor (ao redor de 55 kDa em *D. melanogaster*) (BECKER et al, 1992; MAROTO et al, 1995).

Além da sua presença na musculatura de invertebrados, a paramiosina também é encontrada no tegumento de *S. mansoni* e *S. japonicum*

(MATSUMOTO et al, 1988, GOBERT, 1998). Este fato tem sido correlacionado com o desenvolvimento de imunidade protetora quando testada como imunógeno em experimentos de vacinação (PEARCE et al, 1988; FLENIGAN et al, 1989; McMANUS et al, 1998; McMANUS et al, 2002). As funções sugeridas para esta proteína fora do músculo estão relacionadas com imunossupressão, ao menos em parasitas (GOBERT, 1998).

1.6 Objetivos

Este trabalho teve como foco central à identificação de antígenos de glândula salivar do *Boophilus microplus*, como estratégia de obtenção de possíveis candidatos a comporem uma vacina contra este parasita. Ele faz parte de um programa mais abrangente de seleção de proteínas deste carrapato que poderiam ser utilizadas, através da sua produção em uma forma recombinante, na indução de proteção em rebanhos comerciais de bovinos. Desta forma determinou-se como objetivos específicos:

- 1- Síntese de bibliotecas de expressão em vetores procarióticos de glândula salivar de partenóginas;
- 2- Padronização da metodologia de sondagem imunológica na identificação de candidatos potenciais a partir das bibliotecas de expressão sintetizadas;
- 3- Identificação e caracterização das seqüências de cDNA obtidas;
- 4- Expressão dos cDNAs obtidos em *E. coli* e purificação das proteínas recombinantes dos candidatos com potencial para comporem uma vacina contra o carrapato;

- 5- A produção de anticorpos policlonais contra as proteínas recombinantes;
- 6- A determinação do(s) local(ais) de presença do antígeno e/ou expressão do gene nos tecidos e estágios do desenvolvimento do carrapato;
- 7- A análise da imunogenicidade das proteínas recombinantes em bovinos;
- 8- Caracterização de possíveis atividades apresentadas pelas proteínas recombinantes e análise de suas possíveis relações com a função biológica de cada antígeno na fisiologia do carrapato e interação carrapato-bovino.

ARTIGO 1

Artigo aceito para publicação no periódico *Experimental Parasitology*.

“Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin”.

Carlos Alexandre Sanchez Ferreira^a; Itabajara Da Silva Vaz Jr.^{a,f}; Sérgio Silva da Silva^{a,d}; Karen L. Haag^{a,c}; Jesus G. Valenzuela^e; Aoi Masuda^{a,b}

^aCentro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, ^bDepartamento de Biologia Molecular e Biotecnologia and ^cDepartamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ^dDepartamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brazil. ^eLaboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. ^fFaculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

ABSTRACT

We report the cloning, sequence characterization and expression analysis of a calreticulin (CRT) coding cDNA of *Boophilus microplus*. CRT is a calcium binding protein involved in multiple cell functions and possibly implicated in parasites host immune system evasion. The CRT cDNA sequence and its molecular characterization are described. Sequence similarity and phylogenetic analyses indicate a close relationship to other arthropod CRT sequences. The CRT cDNA was also expressed in a procariotic system and the recombinant protein (rBmCRT) was used to raise antibodies in a rabbit. Expression analyses of the corresponding gene in different developmental stages and tissues were performed by RT-PCR and western-blot, which indicated a ubiquitous expression of the *B. microplus* calreticulin gene and demonstrated its presence in saliva. Sera of tick-infested bovines suggested that this protein may not be able to induce an IgG-based humoral response in its natural host.

Index Descriptors and Abbreviations: *Boophilus microplus*; tick; gene expression; parasite-host relationship; CRT, calreticulin; PBS, phosphate buffered saline; SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; RT, reverse transcription; PCR, polymerase chain reaction; pfu, plaque forming units; ER, endoplasmic reticulum; IgG, immunoglobulin G.

INTRODUCTION

Ticks are blood-sucking arthropods that infest a wide array of species (Sauer *et al.* 1995), including humans and some animals of economic importance, and cause important losses to livestock production (Bowman *et al.*

1996). One-host ixodidae ticks, in particular, expend most of their life feeding on the host, therefore they must be able to deal with all problems of haemostatic and immunologic origin the vertebrate blood may bring to a parasite (Ribeiro 1989; Sauer *et al.* 1995). Salivary secretions are well recognized to perform such modulatory events in the tick-host relationship (Ribeiro 1989; Ribeiro 1995; Wikel 1999), but the purification and further characterization of these activities are many times unfeasible due to the small amounts of saliva that are available from ticks. An alternative approach would be the identification of tick salivary genes in bacterial expression systems and search for their biological functions using recombinant proteins.

Calreticulin (CRT) is a calcium-binding protein, known to perform several functions in mammals (Michalak *et al.* 1999). CRT is also secreted by ticks into their hosts (Jaworski *et al.* 1995) and its involvement in host immune system modulation has been suggested (Jaworski *et al.* 1995; Kovacs *et al.* 1998). The protein is divided in three domains: a N-terminal domain (N-domain), which is the most conserved domain among all CRTs (Michalak *et al.* 1999); an internal domain (P-domain), which binds Ca^{+2} with high affinity (Baksh and Michalak 1991); and a C-terminal domain (C-domain), which is highly acidic and exhibits a high capacity of Ca^{+2} binding (Baksh and Michalak 1991).

Boophilus microplus is a one-host tick that usually infests cattle and is responsible for economic losses ranging around billions of dollars per year (Bowman *et al.* 1996). However, as to how this parasitic relationship is accomplished, very little is known. The characterization of salivary gland-associated molecules may improve our knowledge on the mechanisms involved in tick-host interaction and how they could be inhibited. We report here the

isolation, sequence characterization and, expression analysis of a salivary calreticulin coding cDNA of *B. microplus*. We have also tested the immunogenicity of the corresponding protein (BmCRT) under infestations, and by immunization with the recombinant protein.

MATERIAL AND METHODS

Ticks and harvest of saliva

B. microplus females, eggs and larvae (Porto Alegre strain) were maintained in an incubator at 28 °C and 85 % relative humidity, and their parasitic life was completed in calves, housed in individual pens on slatted floors. Partially engorged adult female ticks were obtained by direct detachment from the calves, kept in a wet chamber and salivation was induced by injection of 5 µl of 2 % pilocarpine solution. Saliva was then collected for a period of 2 h directly from tick mouthparts and stored at -70 °C until use.

Antigen preparation

Fully and partially engorged female ticks were washed with phosphate buffered saline pH 7.2 (PBS) plus 500 IU penicillin.ml⁻¹. The dorsal surface was dissected with a scalped blade. Salivary glands, guts, ovaries and fat bodies were separated with fine-tipped forceps and washed in PBS. These materials were kept frozen at -70 °C until use.

The frozen tissues were thawed and protein extracts prepared according to Da Silva Vaz Jr. *et al.* (1994). The protein concentrations of the extracts were measured using the Bradford method (1976) with bovine serum albumin as standard.

Antibody production

Antibodies against salivary gland were raised in a rabbit by inoculation of 100 µg salivary gland extract emulsified with an equal volume of Freund's complete adjuvant. Three additional boosters were given every three weeks with 100 µg of antigen emulsified in Freund's incomplete adjuvant. Fifteen days after the last booster serum was collected.

Synthesis and screening of the salivary gland cDNA library

An unidirectional cDNA library was synthesized from salivary gland poly A⁺ RNA of partially engorged adult females using the UNIZAP[®] vector (Stratagene), according to the instructions of the manufacturer. The poly A⁺ RNA was obtained using the Micro-Fast Track[™] Kit (Invitrogen). The immunological screening was performed using the anti-salivary gland serum. Nine thousand recombinant cDNA clones were screened on nitrocellulose membranes (Schleicher & Schüll) resulting in a single positive CRT-similar clone, named Bmsg1. Membranes were blocked with blotto (5 % cow non-fat dry milk in PBS) for 1h at room temperature, and then incubated with anti-salivary gland antibodies at room temperature for 18 h. After three washes with blotto, goat anti-rabbit IgG antibody conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) diluted 1:5000 in blotto was incubated for 1h at room temperature. After three washes with PBS and once with development buffer (5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 100 mM Tris, pH 9.5), membranes were stained with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT).

The Bmsg1 cDNA was used to screen the same cDNA library in order to obtain the full cDNA coding region of BmCRT. Nine-thousand recombinant plaque forming units (pfu) were screened on nitrocellulose membranes

(Schleicher & Schüll) using the Nucleic Acids ECL Kit (Amersham-Pharmacia), according to the instructions of the manufacturer.

All positive clones isolated were excised into the pBluescript[®] II (Stratagene) plasmid and their inserts analyzed by sequencing and digestion with restriction enzymes.

DNA sequencing and analysis

DNA sequencing of all cDNAs isolated was performed on an ABI-PRISM 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer) at Molecular Genetics Facility, University of Georgia, Athens - Georgia, USA.

The FASTA algorithm (Pearson *et al.* 1988) was used to analyze the nucleotide and deduced amino acid sequence homologies with previously reported sequences within databases. Multiple alignment of CRT sequences was performed with CLUSTALW (Thompson *et al.* 1994).

Phylogenetic analysis

CRT sequences were aligned with the BmCRT deduced protein sequence using the CLUSTALW program (Thompson *et al.* 1994). An unrooted neighbor-joining phylogenetic tree (Saitou and Nei 1987) was created with the proportion of pair-wise nucleotide differences (p-distances) using the MEGA program (Kumar *et al.* 1993). Bootstrap support was assessed using 500 replicates. The Genbank accession numbers are: *Amblyomma americanum*, AAC79094; *Aplysia californica*, JH0795; *Arabidopsis thaliana*, O04151; *Beta vulgaris*, O81919; *Bos taurus* (bovine brain isoform 2), S36799; *Caenorhabditis elegans*, P27798; *Chlamydomonas reinhardtii*, Q9STD3; *Danio rerio*, AAF13700; *Dictyostelium discoideum*, Q23858; *Dirofilaria immitis*, AAD03405; *Drosophila melanogaster*, P29413; *Euglena gracilis*, Q9ZNY3; *Homo sapiens* (human), NP_004334;

Leishmania donovani, U49191.1; *Litomosoides sigmodontis*, CAA04877; *Mus musculus* (mouse), NP_031617; *Necator americanus*, CAA07254; *Onchocerca volvulus*, P11012; *Oryctolagus cuniculus* (rabbit), P15253; *Oryza sativa*, Q9SLY8; *Prunus armeniaca*, Q9XF98; *Rana rugosa*, S71343; *Rattus norvegicus* (rat), NP_071794; *Ricinus communis*, P93508; *Schistosoma japonicum*, AAC00515; *Schistosoma mansoni*, Q06814; *Strongylocentrotus purpuratus*, AAD55725; *Trypanosoma cruzi*, AAD22175; *Tritrichomonas suis*, CAB92410; *Zea mays*, S58170.

Construction of a plasmid expressing the mature BmCRT

The coding region of mature BmCRT was subcloned into the pGEX-4T1 vector (Amersham-Pharmacia), using the restriction sites of *Bst*Z17 (nucleotides 79-84; indicated in figure 1) and *Xho*I (pBluescript). As there is a site for *Xho*I within Bmcrct, a partial cleavage was performed to obtain the correct fragment to be cloned, which produces a recombinant protein that lacks the signal peptide plus four amino acids of the mature protein (see figure 1). The fragment was cloned within the sites of *Xho*I and *Sma*I of pGEX-4T1. Correct cloning was confirmed by sequencing, and the recombinant plasmid named pGEX-CRT.

The Glutathione-Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia) affinity chromatography was used to purify rBmCRT. Lysogens of BL21/pGEX-CRT were prepared after growth in Luria-Bertani medium. Recombinant protein expression was induced with IPTG 0.1 mM. Cell pellet from 2,000 ml culture were suspended in 20 ml of PBS and frozen at -70°C . Cells were thawed and disrupted in a French press. Triton X-100 was added to the supernatant to a final concentration of 1 %. The supernatant was then loaded on the column that had been equilibrated and washed with buffer A (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM

Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄), and the fusion protein was then incubated with thrombin overnight at 23.5 °C. The GST portion and the remaining fusion protein in the column were eluted with buffer B (50 mM Tris-HCl + 10 mM glutathione, pH 8.0). Protein purity was monitored by a 10 % SDS-PAGE (Laemmli 1970) stained with Coomassie Blue G-250.

RNA poly A⁺ purification and RT-PCR

RNA poly A⁺ was purified from *B. microplus* tissues and bovine blood collected with citrate, and stored at -70 °C. The RNA poly A⁺ purification was performed with the Quick Prep Micro mRNA Purification Kit (Amersham-Pharmacia), as described by the manufacturer. Five hundred ng of RNA poly A⁺ were submitted to reverse transcription (RT) at 37 °C in the presence of oligo-dT (Amersham-Pharmacia) and M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco-Life Technologies) also according to the instructions of the manufacturer. PCR amplifications were performed using 1/20 of the RT reaction, 10 pmol of each primer (pfsg1 and prsg1) and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Cenbiot) in a final volume of 50 µl. Samples were denatured for 10 min at 94 °C and amplification was achieved through 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 52 °C and 30 s at 72 °C, with a final extension cycle of 30 s at 52 °C and 10 min at 72 °C. Negative controls for the RT reactions and PCR amplifications were always included into the assay. Amplicons were visualized by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

Immunogenicity of rBmCRT

rBmCRT was further purified by 10 % SDS-PAGE electrophoresis and one rabbit was subcutaneously inoculated with four doses of approximately 100 µg of

protein emulsified in Freund's incomplete adjuvant. Fifteen days after the last booster serum was collected. One bovine was also immunized with the same rBmCRT preparation. In the initial four inoculations 150 µg of rBmCRT were used; in the following boosters the amount of protein were raised to 250 µg (5th booster), 350 µg (6th booster) and 400 µg (7th and 8th boosters).

Six bovines were artificially infested repeatedly 12 times: 6 times with 18,000 *B. microplus* larvae followed by 6 times with 800 larvae, and sera were collected after each infestation. *Rhipicephalus sanguineus* infested- and non-infested dog sera were obtained at the Veterinary Hospital of Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Western-blot

For western-blot analysis, tissue extracts and purified rBmCRT were resuspended in sample buffer containing 2 % SDS, 250 mM Tris pH 6.8, 0.025 % bromophenol blue, 5 % glycerol, 10 % β-mercaptoethanol and 5 M urea, separated in SDS-PAGE 10 % gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose at 70 V for 1 h at 4 °C in 12 mM carbonate buffer pH 9.9 (Dunn 1986). The nitrocellulose sheet was blocked with blotto for 2 h at room temperature. In the western-blot shown in figure 5, the anti-rBmCRT rabbit serum (1:2,000) was incubated in blotto overnight at 4 °C, and the secondary antibody conjugated to alkaline phosphatase and development procedure was the same used in the immunological screening.

In the western-blots shown in figure 6 the protocol for the SDS-PAGE, protein transfer to nitrocellulose and blocking were the same as described above. In figures 6a and 6c the antigen used was rBmCRT at a concentration of 12 µg

per nitrocellulose strip (strips of 4 mm; 30 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$), and in figure 6b the antigen used was a partially engorged salivary glands extract at a concentration of 44 μg per strip (110 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$). The *B. microplus* infested bovines sera were diluted 1:20, the *R. sanguineus* infested dog sera 1:50 and the anti-rBmCRT rabbit serum 1:400. Prior to the overnight incubation at 4 °C with the antigens, all sera were diluted in an *E. coli* BL21 strain lysate expressing the pGEX-4T1 vector and incubated for 2 h at room temperature for absorption of anti-*E. coli* and anti-vector derived protein antibodies. Preparation of the *E. coli* BL21 strain lysate was performed according to Rott *et al.* (2000). The secondary antibodies used were conjugated to peroxidase (anti-bovine IgG, Sigma, diluted 1:2,000; anti-dog IgG, Sigma, diluted 1:2,000), and after the one-hour incubation three washes with PBS were performed and the development buffer (5 mg 3,3'-diaminobenzidine in 30 ml PBS plus 150 μl H₂O₂ 30 % and 100 μl CoCl₂ 1 %) was added.

RESULTS

1. Isolation of the cDNA clones

A cDNA clone (Bmsg1) was obtained by immunological screening from a salivary gland library using a rabbit anti-salivary gland serum (as described in Material and Methods). The Bmsg1 sequence was determined, which encodes a 1 kbp cDNA fragment with a 254 amino acids ORF with high similarity to CRT sequences. As no ATG codon that could code for an initiating methionine was evident and a N-terminal region was apparently missing (deduced from sequence comparison), Bmsg1 DNA was then used to screen the same library in order to obtain a full-length coding sequence cDNA. Twenty-four positive clones were

obtained out of 9,000 recombinant pfu, and four of them were sequenced at their ends based on insert size and restriction endonucleases digestion pattern. All of them presented the same sequence, which were identical to Bmsg1 at the C-terminus. One of them, named Bmcr1, was then fully sequenced and its deduced protein sequence also was shown to be highly similar to CRTs from other organisms (figure 2), and to contain a putative full length coding sequence. Figure 1 shows the 1,502 bp sequence of Bmcr1 and its deduced amino acid sequence.

2. Sequence, similarity and phylogenetic analysis

Bmcr1 possesses an ORF of 1,233 bp that encodes a protein of 47.7 kDa. A probable signal peptide of 16 predominantly hydrophobic amino acids is present at the N-terminus, which begins at a putative initiation codon (figure 1). The presence of the signal peptide was corroborated by the N-terminal microsequencing of a native salivary BmCRT-similar protein, which showed that the mature protein began at the aspartic residue 17 (Carlos Termignoni, personal communication). The predicted molecular mass and pI for the mature protein are 46 kDa and 4.48, respectively. BmCRT possesses 6 potential human-like C1q-binding regions, at positions 37-45, 58-64, 147-153, 158-165, 218-225 and 272-278. A consensus nuclear localization signal is found at position 202-211 (figure 1). Three CRT family repeat-motif signature patterns (IXDXDXKKPEDWD; Michalak *et al.* 1992) are present at residues 207-219, 225-236 and 241-253, with an alteration from K to T in the third repeat. The last four residues comprise a modified endoplasmic reticulum (ER) retention signal (HEEL). A 235 nucleotides long 3' untranslated region follows the termination codon, with a putative polyadenylation signal positioned 21 bp from the poly-A tail.

Based on sequence similarity, the three domains of BmCRT were deduced: N-terminal domain (N, residues 17-196), the internal domain (P, residues 197-306) and the C-terminal domain (C, residues 307-411). Figure 2 shows the alignment of BmCRT deduced sequence with CRTs of bovine, rabbit, the tick *A. americanum* and the hookworm *N. americanus*. It can be seen that BmCRT shares the high conservation observed among the CRT sequences, mainly within the N and P-domains. The C-domain is more variable, but a high content of acidic residues is conserved in all sequences. Two isoform sequences of bovine CRT were included in the alignment, and the isoform 2 (bovine 2) showed a N-terminal sequence that diverges from all other CRTs. The identity shared by BmCRT and mammalian CRTs (mouse, rat, human, rabbit, bovine-isoform1) lies in the range of 67-70%, while identities with CRTs of the other arthropods *A. americanum* and *D. melanogaster* are, respectively, of 90% and 67% (data not shown). The identities shared with other parasites are smaller, as can be seen with *N. americanus* (63%) and *S. japonicum* (52%) (data not shown).

The neighbor-joining phylogeny constructed with CRT sequences is shown in figure 3. Considering the generally high bootstrap values, a monophyletic origin of the vegetal CRTs can be inferred. Within the animal kingdom CRTs seem to be paraphyletic, due to the independent and intermediate positions of the *Schistosoma* spp and protozoan clades. However, the tree strongly supports a common origin of all arthropod CRT sequences.

3. RT-PCR analysis of Bmcrct expression

The expression analysis of the Bmcrct gene was performed by RT-PCR using one primer annealing in the untranslated 3' end region of the gene (prsg1),

to ensure Bmcrct specific amplification, and a primer annealing within the coding region (pfsg1) (figure 1), generating an amplicon of 588 bp. All tissues and developmental stages tested showed the predicted fragment amplification (figure 4), indicating that Bmcrct is ubiquitously expressed in *B. microplus*. The same fragment size was obtained when Bmcrct was amplified from genomic DNA, indicating that this region of the gene does not possess introns, or if it does, they must be small.

4. Identification of BmCRT within tick tissues and developmental stages

The Bmcrct cDNA was subcloned into the pGEX-4T1 vector (Amersham-Pharmacia) and expressed in *E. coli*. rBmCRT, cleaved out from the fusion protein, was used to raise a hyperimmune serum on a rabbit.

The anti-rBmCRT serum was used in a western-blot analysis of tick tissues/developmental stages, as can be seen in figure 5. The predicted band corresponding to BmCRT was present in all samples tested, corroborating the data from the RT-PCR. The presence of BmCRT in the saliva is also shown, indicating that it is secreted into the host while feeding.

5. Immunogenicity of BmCRT

In order to evaluate if natural hosts produce antibodies against tick secreted BmCRT, sera from six bovines collected after eight consecutive artificial infestations were tested for the presence of anti-rBmCRT antibodies by western blot assay. The six sera did not recognize rBmCRT (figure 6a), but they recognized numerous bands when a salivary gland extract was used as antigen, and none of them corresponded to BmCRT (figure 6b). The same results were found in similar experiments using a more sensitive development system (alkaline phosphatase conjugated to the secondary antibody) with the same sera,

with sera from the same animals after different numbers of infestations, and from naturally infested bovines (data not shown). We have also made 8 intramuscular immunizations on a bovine with rBmCRT (using 150 µg to 400 µg in each inoculation), but specific antibodies were not produced (data not shown). On the other hand, *R. sanguineus* infested dog sera recognized rBmCRT (figure 6c), while non-infested dog sera did not, suggesting that *R. sanguineus* also secretes a CRT-like protein into the host, producing a humoral response against epitopes that are present in rBmCRT.

Discussion

We have isolated and characterized a full coding *B. microplus* cDNA sequence that encodes a 47.7 kDa protein. The deduced sequence of BmCRT shows a high similarity with full length CRT sequences from other organisms. At least three other lines of evidence suggest that Bmcrct encodes the entire coding sequence: (i) the presence of a putative initiation codon, (ii) a probable signal peptide, and (iii) the isolation of three other independent cDNA clones with same size and sequence at their ends. Furthermore, the predicted size and pI of BmCRT lies within the range found for CRTs (Fliegel *et al.* 1989; Khalife *et al.* 1993; Huggins *et al.* 1995; Tsuji *et al.* 1998). The highly acidic C-domain is the cause of the anomalous migration of CRTs in SDS-PAGE (Coppolino and Dedhar 1998), and can explain why rBmCRT and BmCRT appears as 55-60 kDa proteins in western-blot. As expected, BmCRT showed higher sequence conservation with arthropod CRTs, but tick CRTs showed a phylogenetic relation closer to mammalian sequences than to any other invertebrate parasite sequence. Therefore, if CRTs from ticks and other parasites perform similar functions in the

relationship with their mammalian hosts, they probably have evolved independently.

Numerous functions have been assigned for mammalian CRTs, including molecular chaperone activity (Svaerke and Houen 1998), Ca^{+2} cellular buffering and integrin-mediated Ca^{+2} release/influx (Mery *et al.* 1996; Kwon *et al.* 2000), C1q-binding (Kishore *et al.* 1997; Kovacs *et al.* 1998), endothelial nitric oxide production (Kuwabara *et al.* 1995). Such multiple and diverse functions make CRT-like proteins of parasites prominent candidates to perform important roles in the relationship with their hosts. Calcium binding activity was reported for CRTs of *S. mansoni* (Khalife *et al.* 1994), *S. japonicum* (Huggins *et al.* 1995), *D. immitis* (Tsuji *et al.* 1998) and *L. donovani* (Joshi *et al.* 1996). BmCRT shows a high conservation in the P-domain pointing to the likely presence of a putative high-affinity/low-capacity Ca^{+2} -binding region, and the highly acidic C domain is consistent with a high-capacity/low-affinity Ca^{+2} -binding activity, which are characteristic features of human CRT (Baksh and Michalak 1991). Also, *N. americanus* and human CRT have been shown to bind C1q, and BmCRT shows 6 human-like C1q-binding sites that have been described to be associated with this activity (Kovacs *et al.* 1998; Kasper *et al.* 2001).

CRT was reported as an ER resident protein, presenting a classical retention signal (KDEL) and a signal peptide (Fliegel *et al.*, 1989; Michalak *et al.* 1992), features that seem to be conserved even in the protist *E. gracilis* (Navazio *et al.* 1998). But, some parasites present variants of the ER retention signal, such as HDEL, found in schistosomes (Khalife *et al.* 1993; Huggins *et al.* 1995), and KEDL, in *L. donovani* (Joshi *et al.* 1996). BmCRT and the CRTs of *A. americanum* and *N. americanus* present the variant HEEL. Jaworski *et al.* (1995)

suggested that the missing KDEL sequence in the *A. americanum* protein, which is secreted in the saliva, could contribute to its routing into a secretory pathway rather than being retained in the ER. CRT is ubiquitously expressed in mammals, being found in all nucleated cell types (Khanna and Waisman 1986). In arthropods CRT expression has not been analyzed. In this regard BmcrT showed to present the same ubiquitous expression found in mammals and to be also secreted in the *B. microplus* saliva. The same findings are observed for the *D. immitis* CRT, which do not possess an ER retention signal, and *N. americanus* CRT (Tsuji *et al.* 1998; Kasper *et al.* 2001). In *N. americanus* it was suggested that the ubiquitous expression of CRT presumably reflects its nature as an ER-resident protein (Kasper *et al.* 2001). As already mentioned, the many functions performed by CRT indicate that the biological role of a tick-secreted form may be linked to the modulation of the host immune system and haemostasis (Jaworski *et al.* 1995). On the other hand, a CRT present in all tissues would probably be responsible for the same intracellular functions commonly assigned to this protein.

CRTs have, in many situations, been shown to be highly immunogenic to their mammalian hosts. *D. immitis* CRT was recognized by sera of infested dogs (Tsuji *et al.* 1998). Human patients suffering from onchocerciasis (Rokeach *et al.* 1994), schistosomiasis (Khalife *et al.* 1993), infested with *T. cruzi* (Marcelain *et al.* 2000) or *N. americanus* (Pritchard *et al.* 1999) showed to present antibodies that recognize the CRT of the respective parasites. *A. americanum* CRT was recognized by sera from rabbits and humans that suffered tick bites (Sanders *et al.* 1998; Sanders *et al.* 1999). Conversely, BmCRT did not produce a humoral response in *B. microplus*-infested bovines, although rBmCRT was recognized by

R. sanguineus-infested dog sera. Anti-CRT antibodies cross-reactivity has already been demonstrated between ticks (Sanders *et al.* 1998; Sanders *et al.* 1999). Taken together these data indicate that CRT secretion in the saliva is a common process among ticks, but its recognition by the host immune system may not be. This is reinforced by the fact that we were not able to produce a hyperimmune serum against rBmCRT by active immunization of a bovine, while the native and recombinant forms seem to be immunogenic to rabbits.

Analogously, guinea pigs develop a significant resistance following repeated infestations of *R. sanguineus* while dogs, the natural hosts, do not (Szabó and Bechara 1995). This fact is explained by the triggering of different immune reactions in response to infestations of natural and unnatural hosts, which were suggested to be derived from specific evasion mechanisms developed by *R. sanguineus* against the immune system of dogs (Szabó and Bechara 1995).

The possible use of CRT for the development of protective immunity against the parasites *N. americanus* and *Schistosoma* spp has been suggested (Khalife *et al.* 1994; Pritchard *et al.* 1999; El Gengehi *et al.* 2000). Concerning ticks, rabbits immunized with *A. americanum* CRT exhibited necrotic lesions in the tick bite sites, indicating that the immune reaction could disrupt the feeding cycle (Jaworski *et al.* 1995). Furthermore, the antibody levels to *A. americanum* CRT increase in humans after exposure to *I. scapularis* and are correlated with tick engorgement indices (Sanders *et al.* 1999). However, the analysis of rBmCRT as an immunoprophylactic tool faces its low immunogenicity in bovines, which could possibly be overcome using different adjuvants and inoculation strategies or by conjugating rBmCRT to highly immunogenic proteins.

It must also be considered that *B. microplus* is a one-host tick. Other ticks change hosts throughout their lifetime. These two strategies probably counteract similar problems of ectoparasitism and haematophagy differently. The lack of a humoral response against BmCRT in bovines may reflect one of these differences and could possibly indicate some systems that are essential to be evaded in order to allow the *B. microplus* survival in its natural host.

1 cgcaggctcgctagcagttcccccgcacaaaATGCGGCTTCTCTGCATTTTGCTTCCCCT
M R L L C I L L P L 10
61 GGTCGGCTTAATATCGGCCGACCCGACCGTATACTCAAAGAGGAGTTCAACGATGGAGA
V G L I S A D P T V Y F K E E F N D G D 30
121 CGCGTGAAGGACCGGTGGGTGGAGTCTACGAAAGGCGACAACCTCGGAAAGTTCGTCCT
A W K D R W V E S T K G D N L G K F V L 50
181 AAGCGCTGGCAAGTTCTACGGTGACGCGGAGAAGAGCAAAGGACTGCAGACCTCTGAAGA
S A G K F Y G D A E K S K G L Q T S E D 70
241 CGCCCGCTTCTACGGCATCTCCGCCAAGTTCGAACCCTTCTCCAACGAAGACAAGACCTT
A R F Y G I S A K F E P F S N E D K T L 90
301 GGTCATCCAATTCACGGTGAAGCACGAGCAGAACATCGACTGCGGCGGTGGCTACGTCAA
V I Q F T V K H E Q N I D C G G G Y V K 110
361 GCTGTTGACTGCAGCCTAGACCAGACTCAGATGCACGGTGAATCTCCCTACCTGATCAT
L F D C S L D Q T Q M H G E S P Y L I M 130
421 GTTCGGCCCTGACATCTGCGGTCCCGGCACCAAAAAAGTGCACGCCATCTTCAACTACAA
F G P D I C G P G T K K V H A I F N Y K 150
481 GGGCAAGAACCACCTTATCAACAAGGAGGTGCGCTGTAAAAGACGACGTCTTCAGCCACCT
G K N H L I N K E V R C K D D V F S H L 170
541 GTACACCCTGATCGTTAAGCCCGACAACACGTACCAGATCAAGATCGACAACGAAGTGGT
Y T L I V K P D N T Y Q I K I D N E V V 190
601 CGAGAAGGGCGAACTCGAGAAGGACTGGTCCTTCTGCCCCCAAGAAGATCAAGGACCC
E K G E L E K D W S F L P P K K I K D P 210
661 CGACGCCAAGAAGCCCGAGGACTGGGACGACCGGGCCAAGATCGACGCCCGACGACAA
D A K K P E D W D D R A K I D D P D D K 230
721 GAAGCCCGAGGACTGGGACAAGCCCGAGTACATTCCCGATCCGGACGCCACCAAGCCCGA
K P E D W D K P E Y I P D P D A T K P E 250
pfs1 →
781 GGACTGGGACGACGACATGGACGGCGAGTGGGAACCCCGCAGATCAACAACCCCGAGTA
D W D D D M D G E W E P P Q I N N P E Y 270
841 CAAGGGCGAATGGAAACCCAAGCAGATCGACAACCCGGCCTACAAGGGTGCCTGGGTACA
K G E W K P K Q I D N P A Y K G A W V H 290
901 TCCGAGATCGACAACCCCGAGTACACGCCGACCCCAAGCTGTACCGCTACAAGGAGAT
P E I D N P E Y T P D P K L Y R Y K E I 310
961 CTGCAAGATCGGCTTCGACCTGTGGCAAGTCAAGTCTGGCACCATCTTCGACAACATCCT
C K I G F D L W Q V K S G T I F D N I L 330
1021 CATCACGGACGACGAAGAGTACGCCCGGGTGCACGGCGAGGAGACCTGGGCCGCGCTCAA
I T D D E E Y A R V H G E E T W A A L K 350

```

1081 GGACGAGGAGAAAAAGATGAAGGACAAGCAGGAAGAAGAGGAAGACGCCAAGAGCAAGAA
      D E E K K M K D K Q E E E E D A K S K K 370
1141 GGAGGATGACGCTAAGGACGAGGACGAGTTTCGGAGACGACGAGGACAAGGATGAAGACAA
      E D D A K D E D E F G D D E D K D E D K 390
1201 GAAGGATGAGGAGGAGACCACACCCGCGCCCGAAGACGACGAGACCACAAGCACGAAGA
      K D E E E T T P A P E D D E D H K H E E 410
1261 GTTGTGAgctaacgcggctgcggactctaaaaaacatcttttgtacaggcattctctcat
      T * 411
1321 tatttctggtaccctctcaccctcgcccggtttcactcactttttttttgttctctgct
      ← prsg1
1381 ctgttcccctcatttgtggcgcgagagaaacagttgatttaataaataaaacacaggctct
1441 ttctctggttgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
1501 aa - 1502

```

Figure 1. Nucleotide and the corresponding deduced amino acid sequence of Bmcr1. Along the nucleotide sequence are shown: the ORF (uppercase); the untranslated regions (lowercase); the restriction site of *Bst*Z17 used for cloning (double underlined); the regions used for the synthesis of primers pfsg1 and prsg1 (in bold); the stop codon (asterisk); and the polyadenylation signal (underlined). Along the amino acid sequence are shown: the signal peptide (underlined); the sequence of the recombinant protein (in bold); the potential C1q-binding sites (light shaded); the nuclear localization signal (underlined); the three CRT family repeat-motif signature patterns (double underlined); and the ER retention signal (dark shaded).

	*	20	*	40	*		60
<i>A. americanum</i>	:	-----MRLLCILLPIVGLVAADPT	VYFKEEFNDGDG	WKS	RWVES	TKGDNLGKFVLSAGKF	: 55
<i>B. microplus</i>	:	-----MRLLCILLPLVGLISADPT	VYFKEEFNDGD	AWKDR	RWVES	TKGDNLGKFVLSAGKF	: 55
bovine2	:	MCLNHFLLSLVLSIVLLFHFVFI	CLHHIVTFL	REE--	TVFFSEQ	FLTLDL-KYKASKLSS	: 58
bovine1	:	-----DPT	VYFKEQFLDGD	GW	TERWIES	SKHKPDFGKFVLS	: 39
rabbit	:	-----MLLPVPLLLGLLGLAAAE	PVYFKEQFLDGD	GW	TERWIES	SKHKSDFGKFVLS	: 56
<i>N. americanus</i>	:	-----MRSLVALLPVL	CIVAE--	VYFKEEFLD	DS	KERWVQSKHKSDYGEFVLS	: 52

	*	80	*	100	*		120
<i>A. americanum</i>	:	YGDAEKSKGLQTS	EDARFYGIS	SKF-EPFS	NEGKTLV	VQFT--VKHEQNIDCGGGYVKLFD	: 113
<i>B. microplus</i>	:	YGDAEKSKGLQTS	EDARFYGIS	AKF-EPFS	NEDKTLVI	QFT--VKHEQNIDCGGGYVKLFD	: 113
bovine2	:	IREALSMSKVGII	ENFCSEIS	FLO-ESIK	SHCRRTL	VGCS	: 118
bovine1	:	YGDQEKDKGLQTS	QARFYALS	SARF-EPFS	NKGQTLV	VQFT--VKHEQNIDCGGGYVKLFP	: 97
rabbit	:	YGDQEKDKGLQTS	QARFYALS	SARF-EPFS	NKGQPLV	VQFT--VKHEQNIDCGGGYVKLFP	: 114
<i>N. americanus</i>	:	FGD	ATRDQCMKTS	QARFY	SRAAKF	PKAFS	: 111

	*	140	*	160	*		180
<i>A. americanum</i>	:	CRIDCSRLHGES	PKIMF	PPDIC	PGTKKVH	VIFNYKGNHLINKEIRCKDDVFT	: 174
<i>B. microplus</i>	:	CSIDCSRLHGES	PYLMF	PPDIC	PGTKKVH	VIFNYKGNHLINKEIRCKDDVFS	: 174
bovine2	:	AGIDCSRLHGES	PKIMF	PPDIC	PGTKKVH	VIFNYKGNHLINKEIRCKDDVFT	: 179
bovine1	:	AGIDCSRLHGES	PKIMF	PPDIC	PGTKKVH	VIFNYKGNHLINKEIRCKDDVFT	: 158
rabbit	:	AGIDCSRLHGES	PKIMF	PPDIC	PGTKKVH	VIFNYKGNHLINKEIRCKDDVFT	: 175
<i>N. americanus</i>	:	SDVDLSDFHGET	PNVMF	PPDIC	PGTKKVH	VIFNYKGNHLINKEIRCKDDVFT	: 171

	*	200	*	220	*		240
<i>A. americanum</i>	:	VKPDNTYVVKIDN	EVAKGELES	DWSFL	P	PKIKDPDAKKPEDWDDRAKIDDPEDK	: 235
<i>B. microplus</i>	:	VKPDNTYVVKIDN	EVAKGELEK	DWSFL	P	PKIKDPDAKKPEDWDDRAKIDDPEDK	: 235
bovine2	:	VRPNTYEVKIDNS	QVESGS	SLEDDWDF	L	PKIKDPDAKKPEDWDDRAKIDDPEDK	: 240
bovine1	:	VRPNTYEVKIDNS	QVESGS	SLEDDWDF	L	PKIKDPDAKKPEDWDDRAKIDDPEDK	: 219
rabbit	:	VRPNTYEVKIDNS	QVESGS	SLEDDWDF	L	PKIKDPDAKKPEDWDERAKIDDPEDK	: 236
<i>N. americanus</i>	:	LNP	DNTEVQIDG	EVESGELES	DWDL	L	: 232

	*	260	*	280	*		300
<i>A. americanum</i>	:	DKPEHIPDPDAK	KPEDWDD	MDGEWEP	QINN	PEYKGEWKPKQIDNPAYKGA	: 296
<i>B. microplus</i>	:	DKPEHIPDPDAK	KPEDWDD	MDGEWEP	QINN	PEYKGEWKPKQIDNPAYKGA	: 296
bovine2	:	DKPEHIPDPDAK	KPEDWDEE	MDGEWEP	PLION	PEYKGEWKPKQIDNPAYKGI	: 301
bovine1	:	DKPEHIPDPDAK	KPEDWDEE	MDGEWEP	PLION	PEYKGEWKPKQIDNPAYKGI	: 280
rabbit	:	DKPEHIPDPDAK	KPEDWDEE	MDGEWEP	PLION	PEYKGEWKPKQIDNPAYKGI	: 297
<i>N. americanus</i>	:	DKPEHIPDPDAK	KPEDWDEE	MDGEWEP	PLION	PEYKGEWKPKQIKNPAYKGI	: 293

	*	320	*	340	*		360
<i>A. americanum</i>	:	EYTDPKL	YHFP	ELCTIG	FDLWQV	KS	: 357
<i>B. microplus</i>	:	EYTDPKL	YHFP	ELCTIG	FDLWQV	KS	: 357
bovine2	:	EYSP	DSNIM	YAVEN	FAVLG	FDLWQV	: 362


```

bovine1      : EYSPDSNIYAYENFAVLGLDLWQVKSGTIFDNFLITNDEAYAEFFGNETWGVTKAAEKQMK : 341
rabbit      : EYSPDANIYAYDSFAVLGLDLWQVKSGTIFDNFLITNDEAYAEFFGNETWGVTKTAEKQMK : 358
N.americanus : EYTPDDELVLYKDWGATGFDLWQVKSGTIFDNVLSVDSVDEAKAHAAETFEKLPVKEKELK : 354

```

```

          *           380           *           400           *           420
A.americanum : EKQEEEEEDAKSKKEDDA-KDEDEFEDEEKEEDKEKEDEETTAA----PEDD--DHKHEEEL : 410
B.microplus  : DKQEEEEEDAKSKKEDDA-KDEDEFGDDEDKDEDKKDEEETTPA----PEDDE-DHKHEEEL : 411
bovine2     : DKQDEEQRLHEEEEEKKGKKEEAEKDDDEDKDEDEEEDDEKE-EEEEEDAAAQAKDEL : 421
bovine1     : DKQDEEQRLHEEEEEKKGKKEEAEADKDDDEDKDEDEEEDDEKE-EEEEEDAAAGQAKDEL : 400
rabbit      : DKQDEEQRLKEEEEEKKKRKEEAEAEDEEDKDDKEDEDDEEDKDEEEDAAAGQAKDEL : 418
N.americanus : EKADEENRKKMEEEAkk-QEEEEKkkkKEKEKEKEKEDED-----EAKA--DEGHHEEL : 403

```

Figure 2. Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of Bmcr1 and other CRT sequences. Genbank accession numbers: *Amblyomma americanum*, U07708; Bmcr1, AF420211; bovine isoform 1 (*Bos taurus*), P52193; bovine isoform 2 (*B. taurus*), L13462; rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), P15253; *Necator americanus*, AJ006790. Dark shading shows total identity and light shading shows residues conserved in five sequences.

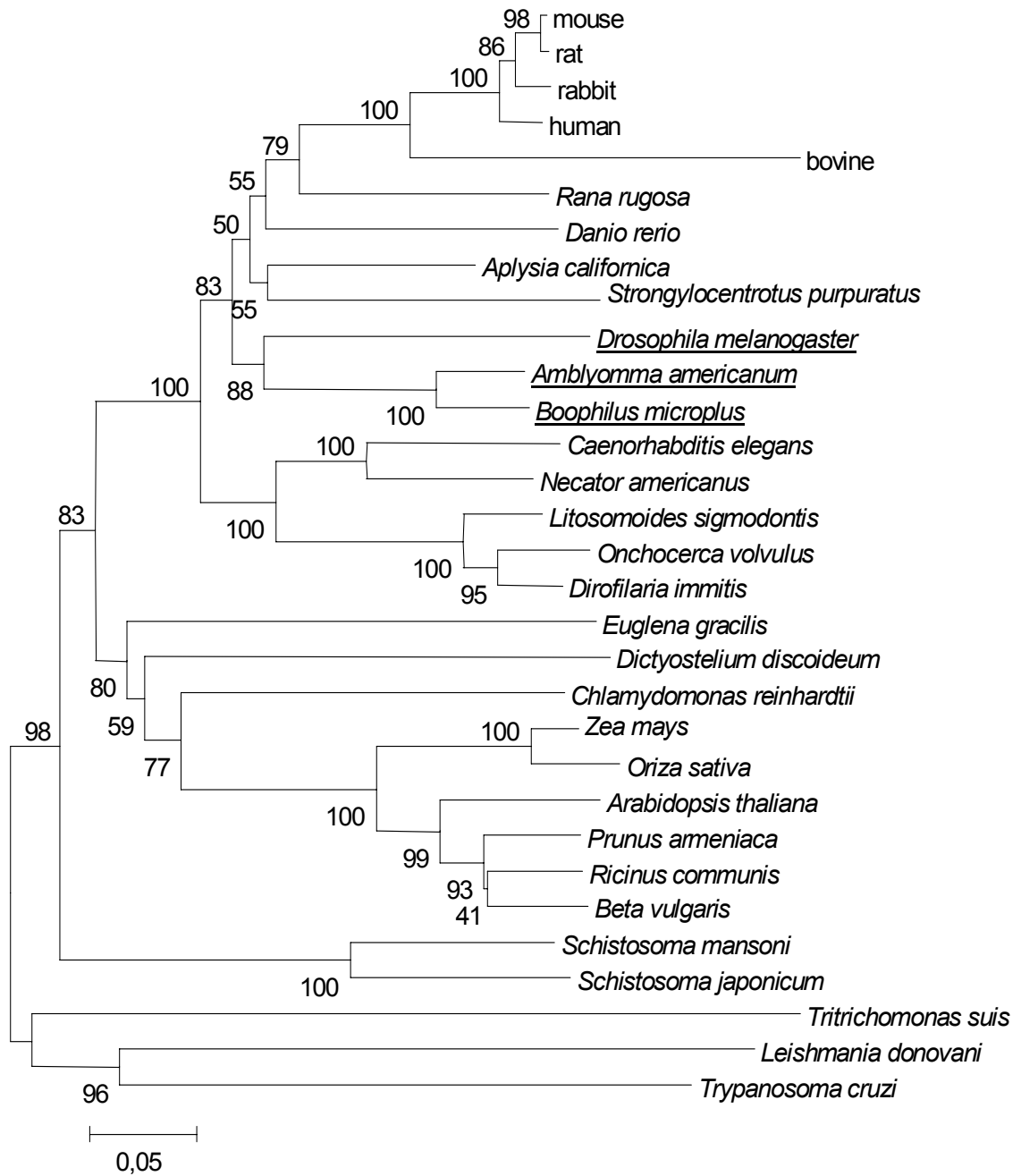


Figure 3. Dendrogram of CRT sequences. The scale bar indicates 0.05 substitutions per site. Bootstrap proportions are indicated at branches. Concerning the bovine sequences, only bovine CRT isoform 2 was used because complete sequence was not available for isoform 1. Arthropod sequences are underlined.

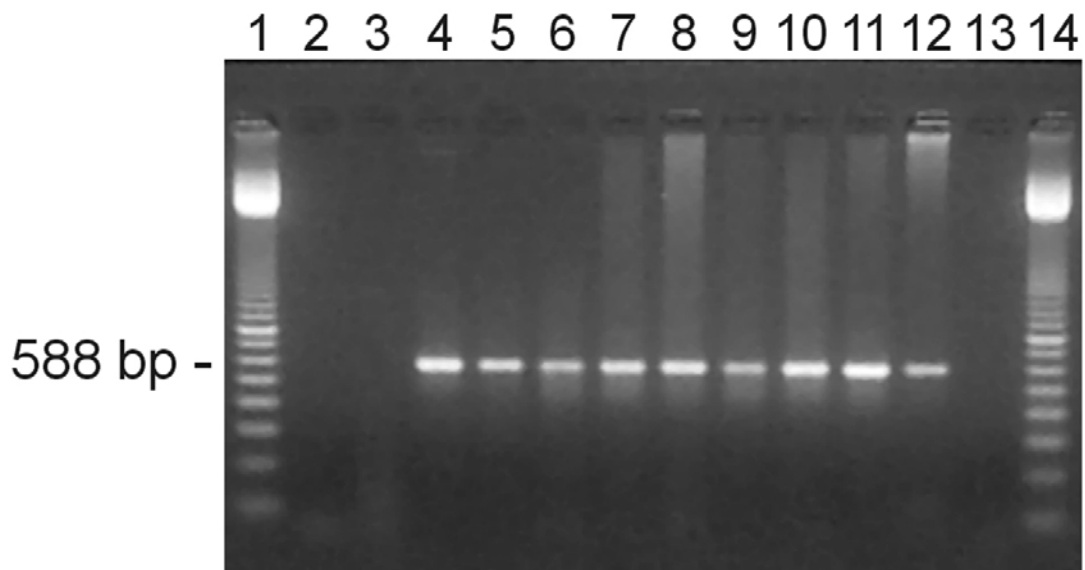


Figure 4. Amplicons of BmCRT generated by RT-PCR from RNA poli-A⁺ of different tissues/developmental stages. Lanes 1 and 14, molecular mass standards (100 bp ladder, Amersham-Pharmacia); lane 2, a representative of the negative controls of reverse transcriptase reactions; lane 3, negative control of the PCR reactions; lane 4, cloned DNA (positive control); lane 5, genomic DNA; lane 6, larvae; lane 7, ovaries (late in development) and, lane 8, ovaries (early in development) from partially engorged females; lane 9, fat bodies from fully engorged females; lane 10, salivary glands from partially engorged females; lanes 11, guts from partially engorged females and, 12, from fully engorged females; lane 13, bovine blood (negative control). Samples were submitted to electrophoresis on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.

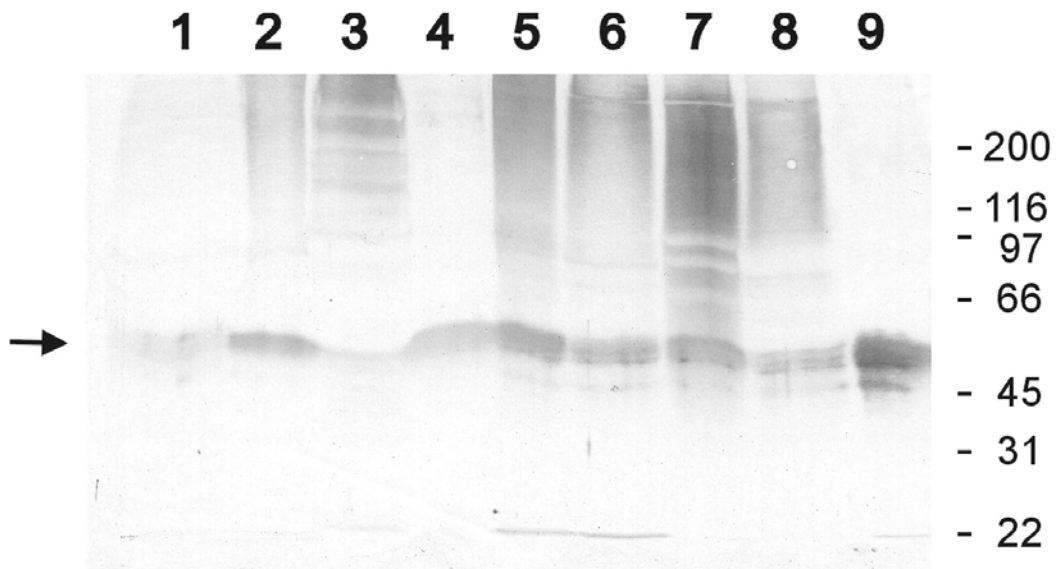


Figure 5. Western-blot of *Boophilus microplus* tissues and developmental stages extracts, saliva and purified rBmCRT. Samples were run on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Anti-rBmCRT rabbit serum was used as probe. Lane 1, saliva from partially engorged females (75 μ g); lane 2, partially engorged female salivary gland extract (36 μ g); lane 3, ovary extract (61 μ g); lane 4, partially engorged female gut extract (180 μ g); lane 5, fully engorged female fat body extract (23 μ g); lane 6, total adult males extract (40 μ g); lane 7, total non engorged adult female extract (15 μ g); lane 8, larvae extract (96 μ g); lane 9, purified rBmCRT (2 μ g). Numbers at left are molecular weight standards expressed in kDa (Broad - BioRad). An arrow indicates the 55-60 kDa bands representative of BmCRT and rBmCRT. A replicate was performed using pre-immune serum as control (data not shown).

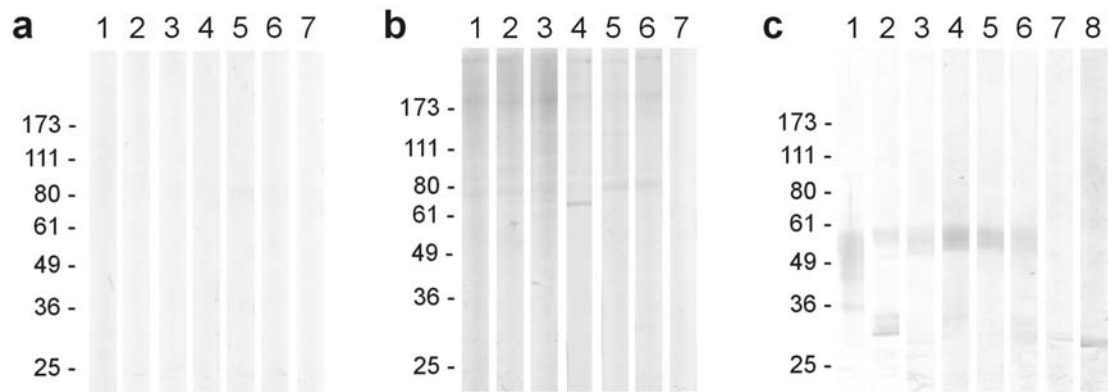


Figure 6. Western-blot analysis of tick infested animals sera against rBmCRT (6a and 6c) and partially engorged salivary gland extract (6b). (Fig. 6a) lanes 1-6, sera of bovines; lane 7, secondary antibody conjugate control (without serum). (Fig. 6b) lanes 1-6, sera of bovines; lane 7, secondary antibody conjugate control (without serum). Replicates were performed using sera from the bovines taken before infestations as a negative control (data not shown). (Fig. 6c) lane 1, anti-rBmCRT rabbit serum; lanes 2-6, sera from dogs naturally infested with *Rhipicephalus sanguineus*; lanes 7-8, sera from non-infested dogs. Molecular weight standards are expressed in kDa (Gibco-Life Technologies).

References

- Baksh, S., and Michalak, M. 1991. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 21458-21465.
- Bowman, A. S., Dillwith, J. W., and Sauer, J. R. 1996. Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance. *Parasitology Today* 12, 388-396.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Coppolino, M. G., and Dedhar, S. 1998. Molecules in focus: calreticulin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 30, 553-558.
- Da Silva Vaz Jr., I., Ozaki, L. S., and Masuda, A. 1994. Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissues. *Veterinary Parasitology* 52, 71-78.
- Dunm, S. D. 1986. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western-blot by monoclonal antibodies. *Analytical Biochemistry* 157, 144-153.
- El Gengehi, N., El Ridi, R., Tawab, N. A., El Demellawy, M., Mangold, B. L. 2000. A *Schistosoma mansoni* 62-kDa band is identified as an irradiated cell antigen and characterized as calreticulin. *Journal of Parasitology* 86, 993-1000.
- Fliegel, L., Burns, K., MacLennan, D. H., Reithmeier, R. A. F., and Michalak, M. 1989. Molecular cloning of the high-affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 21522-21528.

- Huggins, M. C., Gibbs, J., and Moloney, N. A. 1995. Cloning of a *Schistosoma japonicum* gene encoding an antigen with homology to calreticulin. *Molecular and Biochemical Parasitology* 71, 81-87.
- Jaworski, D. C., Simmen, F. A., Lamoreaux, W., Coons, L. B., Muller, M. T., and Needham, G. R. 1995. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *Journal Insect Physiology* 41, 369-375.
- Joshi, M., Pogue, G. P., Duncan, R. C., Lee, N. S., Singh, N. K., Atreya, C. D., Dwyer, D. M., and Nakhasi, H. L. 1996. Isolation and characterization of *Leishmania donovani* calreticulin gene and its conservation of the RNA binding activity. *Molecular and Biochemical Parasitology* 81, 53-64.
- Kasper, G., Brown, A., Eberl, M., Vallar, L., Kieffer, N., Berry, N., Girdwood, K., Eggleton, P., Quinnell, R., and Pritchard, D. I. 2001. A calreticulin-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signaling domains of some integrins. *Parasite Immunology* 23, 141-152.
- Khalife, J., Trotein, F., Schacht, A., Godin, C., Pierce, R. J., and Capron, A. 1993. Cloning of the gene encoding a *Schistosoma mansoni* antigen homologous to human Ro/SS-A autoantigen. *Molecular and Biochemical Parasitology* 57, 193-202.
- Khalife, J., Liu, J. L., Pierce, R., Porchet, E., Godin, C., and Capron, A. 1994. Characterization and localization of *Schistosoma mansoni* calreticulin Sm58. *Parasitology* 108, 527-532.
- Khanna, N. C., Waisman, D. M. 1986. Development of radioimmunoassay for quantitation of calregulin in bovine tissues. *Biochemistry* 25, 1078-1082.
- Kishore, U., Sontheimer, R. D., Sastry, K. N., Zaner, K. S., Zappi, E. G., Hughes, G.R.V., Khamashta, M. A., Strong, P. Reid. K. B. M., and Eggleton, P. 1997. Release of calreticulin from neutrophils may alter C1q-mediated immune functions. *Biochemical Journal* 322, 543-550.

- Kovacs, H., Campbell, I. D., Strong, P., Johnson, S., Ward, F. J., Reid, K. B. M., and Eggleton, P. 1998. Evidence that C1q binds specifically to C_H2-like immunoglobulin γ motifs present in the autoantigen calreticulin and interferes with complement activation. *Biochemistry* 37, 17865-17874.
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Genetic Analysis, version 1.01 The Pennsylvania State University, University Park, PA, 16802.
- Kuwabara, K., Pinsky, D. J., Schmidt, A. M., Benedict, C., Brett, J., Ogawa, S., Broekman, M. J., Marcus, A. J., Sciacca, R. R., Michalak, M., Wang, F., Pan, Y. C., Grunfeld, S., Patton, S., Malinski, T., Stern, D. M., and Ryan, J. 1995. Calreticulin, an antithrombotic agent which binds to vitamin K-dependent coagulation factors, stimulates endothelial nitric oxide production, and limits thrombosis in canine coronary arteries. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 8179-8187.
- Kwon, M. S., Park, C. S., Choi, K., Park, C. S., Ahnn, J., Kim, J., Eom, S. H., Kaufman, S. J., and Song, W. K. 2000. Calreticulin couples calcium release and calcium influx in integrin-mediated calcium signaling. *Molecular Biology of the Cell* 11, 1433-1443.
- Laemmli, E. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Marcelain, K., Colombo, A., Molina, M. C., Ferreira, L., Lorca, M., Aguillón, J. C., and Ferreira, A. 2000. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Tropica* 75, 291-300.
- Mery, L., Mesaeli, N., Michalak, M., Opas, D. P., Lew, D. P., and Krause, K. 1996. Overexpression of calreticulin increases Ca²⁺ storage and decreases store-operated Ca²⁺ influx. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 9332-9339.
- Michalak, M., Milner, R. E., Burns, K., and Opas, M. 1992. Calreticulin. *Biochemical Journal* 285, 681-692.

- Michalak, M., Corbett, E. F., Mesaeli, N., Nakamura, K., and Opas, M. 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochemical Journal* 344, 281-292.
- Navazio, L., Nardi, M. C., Pancaldi, S., Dainese, P., Baldan, B., Fitchette-Lainé, A. C., Faye, L., Meggio, F., Martin, W., and Mariani, P. 1998. Functional conservation of calreticulin in *Euglena gracilis*. *Journal Eukaryotic Microbiology* 45, 307-313.
- Pearson, W. R., and Lipman, D. J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85, 2444-2448.
- Pritchard, D. I., Brown, A., Kasper, G., Mcelroy, P., Loukas, A., Hewitt, C., Berry, C., Füllkrug, R., and Beck, E. 1999. A hookworm allergen which strongly resembles calreticulin. *Parasite Immunology* 21, 439-450.
- Ribeiro, J. M. C. 1989. Role saliva in tick/host interactions. *Experimental and Applied Acarology* 7, 15-20.
- Ribeiro, J. M. C. 1995. How ticks make a living. *Parasitology Today* 11, 91-93.
- Rokeach, L. A., Zimmerman, P. A., and Unnasch, T. R. 1994. Epitopes of the *Onchocerca volvulus* RAL1 antigen, a member of the calreticulin family of proteins, recognized by sera from patients with onchocerciasis. *Infection and Immunity* 62, 3696-3704.
- Rott, M. B., Fernández, V., Farias, S., Ceni, J., Ferreira, H. B., Haag, K. L., and Zaha, A. 2000. Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Tropica* 75, 331-340.

- Sanders, M. L., Jaworski, D. C., Sanchez, J. L., DeFraités, R. F., Glass, G. E., Scott, A. L., Raha, S., Ritchie, B. C., Needham, G. R., and Schwartz, B. S. 1998. Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59, 279-285.
- Sanders, M. L., Glass, G. E., Nadelman, R. B., Wormser, G. P., Scott, A. L., Raha, S., Ritchie, B. C., Jaworski, D. C., and Schwartz, B. S. 1999. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* (Say) and are correlated with tick engorgement indices. *American Journal of Epidemiology* 149, 777-784.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for the reconstruction of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sauer, J. R., McSwain, J. L., Bowman, A. S., and Essenberg, R. C. 1995. Tick salivary gland physiology. *Annual Review Entomology* 40, 245-267.
- Svaerke, C., and Houen, G. 1998. Chaperone properties of calreticulin. *Acta Chemica Scandinavica* 52, 942-949.
- Szabó, M. P. J., Mukai, L. S., Rosa, P. C. S., and Bechara, G. H. 1995. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters, and guinea pigs to repeated infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 32, 43-50.
- Thompson, J. D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Tsuji, N., Morales, T. H., Ozols, V. V., Carmody, A. B., and Chandrashekar, R. 1998. Molecular characterization of a calcium-binding protein from the filarial parasite *Dirofilaria immitis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 97, 69-79.

Wikel, S. K. 1999. Modulation of the host immune system by ectoparasitic arthropods. *BioScience* 49, 311-320.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Carlos Termignoni for helpful discussions and critical reading of the manuscript, and to José Marcos C. Ribeiro for important cooperation. We wish to thank Cenbiot for the supply of Taq polymerase and restriction enzymes. This work was supported by grants from CAPES, CNPq, PRONEX, PADCT and FAPERGS.

ARTIGO 2

Artigo aceito para publicação no periódico Parasitology.

“cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin”

C. A. S. Ferreira^{1,5,6}; M. C. Barbosa¹; T. C. L. Silveira¹; J. G. Valenzuela⁴; I. Da Silva Vaz Jr.^{1,2,3}; A. Masuda^{1,2}

¹Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, ²Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, ³Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brazil - C.P. 15005 - CEP 91501-970.

⁴Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, 4 Center Dr., Rm. 4/126, Bethesda, MD 20892, USA.

⁵Departamento de Ciências Microbiológicas, PUC-RS, Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS, Brazil – CEP 90619-900.

⁶Centro de Ciências da Saúde, UNISINOS, Av. Unisinos, 950, São Leopoldo, RS, Brazil - CEP 93022-000.

SUMMARY

The tick *Boophilus microplus* is a one-host tick that causes important losses to bovine herds, and protective antigens are being investigated in order to develop vaccines that avoid the use of acaricides. Paramyosins are multi-functional invertebrate muscle proteins, whose roles may include host immunomodulation, and seem to be a prominent candidate in a schistosomiasis vaccine. We report here the cloning, expression and characterization of a *B. microplus* paramyosin (BmPRM). Sequence analysis of the full length coding sequence cDNA shows high identity to other arthropod paramyosin sequences, and the predicted molecular weight, pI and secondary structure are consistent with a typical paramyosin. Western-blot expression analysis indicates the presence of BmPRM in all tissues and developmental stages tested, but not in saliva. The recombinant protein (rBmPRM) was shown to bind both IgG and collagen. Possible implications of these activities with host evasion mechanisms are discussed.

Key words: paramyosin, *Boophilus microplus*, IgG binding protein, collagen binding protein, tick.

INTRODUCTION

Ixodidae ticks are blood-sucking parasites that infest a wide array of mammals. *Boophilus microplus* is a one-host tick that causes major losses to bovine herds, especially in tropical regions. Major efforts have been expended to develop immunoprophylactic tools in order to achieve better control of the parasite, minimizing or eliminating the use of acaricides that raises costs and contaminates milk, meat and the environment (Nolan, 1985). Possible immunogens have been

described (Mulenga, Sugimoto & Onuma, 2000) and vaccines based on the concept of concealed antigens (Willadsen & Kemp, 1988) are being commercialized (Willadsen *et al.* 1995; Rodriguez *et al.* 1995a). Unfortunately, the degree of protection achieved is not complete (Willadsen *et al.* 1988). The use of acaricides is still required in the best scenario, and field trials showed considerable variation among the different regions tested (Rodriguez *et al.* 1995b), possibly resulting from polymorphisms of the antigens (Garcia-Garcia *et al.* 2000). The discovery of new protective antigens would be helpful in the optimization of current vaccines or in the design of novel ones.

Salivary molecules are well known modulators of host immune systems and haemostasis, and are considered essential for the maintenance of parasite survival in the tick-mammalian relationship (Ribeiro, 1989, 1995; Wikel, 1999). Blockage of these immunomodulatory molecules appears promising for tick control. However, the analysis of such molecules is confounded by the small amounts of saliva that are available from ticks, which often makes their isolation and further characterization unfeasible. The identification of tick salivary cDNAs and the production of recombinant proteins is a more tractable alternative.

We show in this article the molecular cloning, characterization, expression in a prokaryotic system, and the analyses of some activities of a salivary gland paramyosin of *B. microplus* (BmPRM). Paramyosins are muscle proteins found within a number of different invertebrates, including arthropods, molluscs, annelids, crustaceans, nematodes and echinoderms (Maroto *et al.* 1995). Paramyosin is also found as part of the tegument of *Schistosoma mansoni* (Matsumoto *et al.* 1988; Gobert, 1998), and is one of the most promising candidates as a vaccine against schistosomiasis (Kallina & McMannus, 1997;

Gobert, 1998). The possible roles of this protein within the tick and in the tick-bovine relationship are also discussed.

MATERIAL AND METHODS

Ticks

B. microplus ovipositing females, eggs and larvae (Porto Alegre strain) were maintained in an incubator at 28 °C and 85 % relative humidity, and their parasitic life was completed by feeding on calves, housed in individual pens on slatted floors.

Harvest of saliva

Partially engorged adult female ticks were obtained by direct detachment from the calves, kept in a wet chamber and salivation was induced by injection of 5 µl of 2 % pilocarpine solution in phosphate buffered saline pH 7.2 (PBS; 0.01 M-sodium phosphate, 0.15 M-NaCl). Saliva was then collected directly from tick mouthparts.

Antigen preparation

Fully and partially engorged female ticks were washed with PBS. The dorsal surface was dissected with a scalped blade. Salivary glands, guts, ovaries and fat bodies were separated with fine-tipped forceps and washed in PBS. These materials were kept frozen at –70 °C until use. The frozen tissues were thawed and protein extracts prepared according to Da Silva Vaz Jr. *et al.* (1994). Protein concentrations of the extracts were measured using the Bradford method (1976) with bovine serum albumin as standard.

Antisera

Antibodies against salivary glands extracts and the purified BmPRM recombinant protein (rBmPRM) were raised in rabbits.

Synthesis and screening of the salivary glands cDNA library

A unidirectional cDNA library was synthesized from salivary gland poly A⁺ RNA of partially engorged adult females using the UNIZAP[®] vector (Stratagene), according to the instructions of the manufacturer. Poly A⁺ RNA was obtained using the Micro-Fast Track[™] Kit (Invitrogen). Immunological screening was performed using serum from a rabbit immunized with *B. microplus* salivary glands extract, as previously described (Rosa de Lima *et al.*, in press).

DNA sequencing and sequence analysis

DNA sequencing of all cDNAs isolated was performed on an ABI-PRISM 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer, Foster City, CA) at the Molecular Genetics Facility, Georgia, USA. The FASTA algorithm (Pearson & Lipman, 1988) was used to analyze the nucleotide and deduce amino acid sequence homologies with previously reported sequences within databases. Multiple alignment of paramyosin sequences was performed with CLUSTALW (Thompson *et al.* 1994). The locations of coiled-coil regions were predicted by the PAIRCOIL program (Berger *et al.* 1995).

Construction of a plasmid over-expressing rBmPRM

In order to allow the expression and purification of rBmPRM the coding region of the cloned cDNA (named Bmprm) was amplified by PCR and subcloned into the pGEX-4T3 vector (Amersham-Pharmacia). The upstream (CCCCCGAATTCATGTCTAGCAGGAGCAGC) and downstream (TTTTCCCCCGCGGCCGCTTAGAAGTTCTGGCTGGAC) primers included *EcoRI* and *NotI* restriction sites, respectively, which were used for ligation to the

vector. Correct cloning was confirmed by sequencing, and the recombinant plasmid named pGEX-PRM.

Protein expression and purification

Bmprm expression was performed in the BL21 *Escherichia coli* strain. Lysogens of BL21/pGEX-PRM were prepared after growth in Luria-Bertani medium. Recombinant protein expression was induced with IPTG 0.1 mM. Cell pellets from 2000 ml cultures were suspended in 20 ml of PBS and frozen at -70°C . Cells were thawed and disrupted in a French press. Triton X-100 was added to the supernatant to a final concentration of 1 %, and centrifuged for 15 min/12000 g. The protein purification was then performed by Glutathione-Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia) affinity chromatography. The supernatant was loaded on the column that had been equilibrated and washed with buffer A (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4), and the fusion protein was then incubated with thrombin overnight at 23.5°C . The GST portion and the remaining fusion protein in the column were eluted with buffer B (50 mM Tris-HCl, 10 mM glutathione, pH 8.0). Protein purity was monitored by a 10 % SDS-PAGE (Laemmli, 1970) stained with Coomassie Blue G-250. GST was produced using the same protocol, from lysogens of BL21/pGEX-4T1 (Amersham-Pharmacia), with the exception that thrombin was not added and protein elution was performed directly with buffer B.

Western-blots and dot-blot analyses

For western-blot analyses, samples were resuspended in buffer containing 2 % SDS, 250 mM Tris pH 6.8, 0.025 % bromophenol blue, 5 % glycerol, 10 % β -mercaptoethanol and 5 M urea, separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose at 70 V for 1 h at 4°C in 12 mM carbonate buffer pH 9.9 (Dunn,

1986). The nitrocellulose sheets were blocked with BLOTTO (5 % cow non-fat dry milk-PBS) for 2 h at room temperature. Anti-rBmPRM serum diluted 1:2000 was incubated overnight at 4 °C. Prior to incubation with the antigens, all sera were diluted in an *E. coli* BL21 strain lysate expressing the pGEX-4T3 vector and incubated for 3 h at room temperature to allow the absorption of anti-*E. coli* and anti-vector derived protein antibodies. Preparation of the *E. coli* BL21 strain lysate was performed according to Rott *et al.* (2000). After three washes with blotto, anti-rabbit IgG antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) or peroxidase (Sigma), diluted 1:5000 and 1:2000 in blotto respectively, were incubated for 1 h at room temperature. The membranes were then washed and stained as described for alkaline phosphatase (Rosa de Lima *et al.*, in press) and peroxidase (Da Silva Vaz Jr *et al.*, 1998) conjugates. Molecular weight standards were purchased from BioRad (High Range).

Dot-blot analysis was performed using 5 µg of rBmPRM in each spot. Native protein was applied to the nitrocellulose membrane diluted in PBS while denatured protein was applied after 10 min of boiling, diluted in PBS plus SDS 0.5 % and β-mercaptoethanol 5 %. Membranes were blocked with blotto for 2 h at room temperature. Anti-BmPRM serum diluted 1:2000 or non-infested bovine serum diluted 1:20 were incubated for 1.5 h at room temperature. Prior to incubation with the antigens, all sera were diluted in an *E. coli* BL21 strain lysate expressing the pGEX-4T3 vector and incubated for 3 h at room temperature to allow the absorption of anti-*E. coli* and anti-vector derived protein antibodies. Preparation of the *E. coli* BL21 strain lysate was performed according to Rott *et al.* (2000). After three washes with blotto, anti-rabbit IgG or anti-bovine IgG antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) diluted 1:5000 and

1:2000 in blotto, respectively, were incubated for 1 h at room temperature. After three washes with PBS and once with development buffer (5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 100 mM Tris, pH 9.5), membranes were stained with 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT).

IgG purification

A pool of bovine sera from non-infested cattle was dialyzed with 20 mM sodium phosphate buffer, pH 8.4 and applied to a protein G-Sepharose column (Amersham-Pharmacia) equilibrated with the same buffer and eluted with 100 mM glycine-HCl buffer, pH 2.7. The fractions containing IgG were dialyzed against PBS.

ELISA

Microtitration plates were coated with 2.5 µg of BSA (Sigma), rBmPRM or GST per well in 20 mM carbonate buffer (pH 9.6) by overnight incubation at 4 °C in a wet chamber (Harlow & Lane, 1988). They were washed three times in blotto and blocked by additionally incubating for 1 h at 37 °C with blotto. Either purified bovine IgG or total bovine serum were diluted in blotto and incubated for 1 h at 37 °C. Prior to incubation with the antigens, both bovine serum and purified IgG were also added to an *E. coli* lysate (same procedure used for the western-blot) to remove any cross-reacting antibodies to *E. coli* and vector derived proteins. PBS was also incubated with the *E. coli* lysate and used as a negative control (no antibodies or serum were added). The plates were then washed with blotto three times and incubated for 1 h at 37 °C with a secondary antibody conjugated to peroxidase (anti-bovine IgG, Sigma, diluted 1:2000). After three washes with PBS, the chromogen and substrate were added (3.4 mg *o*-phenylenediamine, 5 µl

H₂O₂ in 0.1 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0) and incubated for 15 min at room temperature in a dark room. The reactions were stopped with 12.5 % H₂SO₄ and the optical densities (OD) were determined at 492 nm.

Collagen binding

Seventeen milligrams of collagen type I (Sigma) were washed initially with PBS-NaCl 0.65 M (PBS plus NaCl up to 0.65 M) and subsequently with PBS, and then incubated overnight at 4 °C with 300 µg of GST and 300 µg of rBmPRM in PBS. Collagen was then washed successively with PBS, PBS-NaCl 0.2 M (PBS plus NaCl up to 0.2 M), PBS-NaCl 0.25 M (PBS plus NaCl up to 0.25 M) and PBS-NaCl 0.3 M (PBS plus NaCl up to 0.3 M). Elution was performed with PBS-NaCl 0.65 M. All fractions were then concentrated and ionic strength was adjusted to physiological conditions using an Amicon microconcentrator filter (pore exclusion of 30000).

RESULTS

Isolation and sequence analysis of Bmprm

A single paramyosin-like cDNA clone (Bmprm) was obtained from 9000 cDNA clones by immunological screening from a salivary gland expression library. A rabbit raised antiserum against partially engorged salivary glands was used as a probe. The Bmprm sequence encodes a 2922 cDNA fragment with an open reading frame of 873 amino acids having high similarity to full-length paramyosin sequences (Fig. 1). The first initiation codon fulfills the criteria of Kozak for a ribosomal binding site (Kozak, 1991). A 36 base pairs (bp) 5' and a 264 bp 3' untranslated sequence are present, with a putative polyadenylation signal positioned 24 bp from the poly-A tail at the 3' end. The predicted molecular mass

and pI for BmPRM are 102 kDa and 5.53, respectively. Three putative N-glycosylation sites are present at residues 189-192, 815-818 and 839-842, and two leucine zipper motifs are present at residues 329-350 and 364-385. Several putative phosphorylation sites can also be deduced within the amino acid sequence of BmPRM. A coiled-coil-like secondary structure is predicted for most of the BmPRM sequence, with the exceptions covering the first 26 and the last 27 amino acids. The sequence data have been deposited in GenBank accession number AF479582.

Sequence alignment of BmPRM and 6 other paramyosin sequences shows that BmPRM shares the high conservation observed among paramyosins, especially within arthropods (Fig. 1). BmPRM shares 78%, 62% and 60% identity with *Sarcoptes scabiei*, *Dermatophagoides farinae* and *Drosophila melanogaster*, respectively (data not shown). The identities shared with the parasite nematodes *Onchocerca volvulus*, *Dirofilaria immitis* and *Brugia malayi* are less, 52%, 52% and 51%, respectively (data not shown), but are representative of the evolutionary conservation of paramyosins even among phylogenetically distant species.

Subcloning and recombinant protein expression of Bmprm

The full coding sequence of Bmprm was amplified by PCR and subcloned into the pGEX-4T3 vector (Amesham-Pharmacia), and then expressed in *E. coli*. rBmPRM, cleaved out from the fusion protein, was used to raise a hyperimmune serum on a rabbit. A high titer hyperimmune serum was also obtained when a bovine was immunized (data not shown).

Identification of BmPRM within tick tissues and developmental stages

The anti-rBmPRM serum was used in a western-blot analysis of tick tissues/developmental stages (Fig. 2). The predicted band corresponding to BmPRM (99-105 kDa) was present in all samples tested, with the exception of saliva. A 10-fold greater quantity of saliva was also tested, but the same result was obtained (data not shown). The presence of BmPRM in all tick tissues and developmental stages indicates ubiquitous expression of the *Bmprm* gene in *B. microplus* whereas the absence of BmPRM in saliva suggests that it is not secreted into the host while feeding. No bands were developed using pre-immune serum (data not shown).

Binding of bovine IgG to rBmPRM

Binding of rBmPRM to bovine IgG was demonstrated by ELISA. rBmPRM, GST (from *Schistosoma japonicum*, used as a fusion protein in the rBmPRM expression; see Material and Methods) and BSA were coated onto microplate wells and tested for binding to purified bovine IgG (Fig. 3A). rBmPRM showed dose-dependent binding over a 0.1 – 3.2 mg/ml concentration range, whereas GST and BSA did not show significant binding. In order to test if rBmPRM could also bind IgG of whole serum, we tested three different bovine sera (from non-infested animals) in five dilutions (Fig. 3B). Essentially the same results were obtained when whole sera were used. A dot-blot analysis was performed to compare the relative IgG-binding activity of native and denatured rBmPRM (Fig. 4). The IgG-binding activity was dramatically reduced using the denatured form, suggesting that binding is dependent on conformation.

rBmPRM binding to collagen

Collagen affinity of rBmPRM was tested by incubating the protein with type I collagen under physiological ionic strength conditions, followed by stepwise

washes with increasing salt concentrations (up to 0.3 M NaCl). Elution was achieved with a 0.65 M NaCl solution. GST was co-incubated with rBmPRM as a negative control. Fractions were concentrated, separated by SDS-PAGE and analyzed by western-blot (Fig. 5). Detection of rBmPRM exclusively in the eluted fraction indicates binding to collagen and that most of the recombinant protein produced retains the binding capacity.

Discussion

In this report we show the isolation, characterization and expression of a full length *B. microplus* cDNA sequence that encodes a 102 kDa protein. The deduced sequence of BmPRM shows high similarity with full length paramyosin sequences from other organisms. Sequence and structural analyses indicate that BmPRM represents a paramyosin, a protein that has been described in several invertebrates (Kagawa *et al.* 1989; Maroto *et al.* 1995; Tsai *et al.* 1998; Mattson, Ljunggren & Bergstrom, 2001). The predicted molecular weight of BmPRM lies within the values found for most paramyosins (Maroto *et al.* 1995). The predicted coiled-coil -like secondary structure is consistent with a rod-like shape, which is characteristic of paramyosins and myosin heavy chains (McLachlan & Karn, 1982; Kagawa *et al.* 1989). Multiple alignment reveals a high degree of conservation between paramyosins and BmPRM. Furthermore, no gaps are present within the predicted α -helical coiled-coil region (Fig. 1), suggesting that this portion is essential to protein function. This is demonstrated by the fact that point mutations in the *Caenorhabditis elegans* paramyosin within this region caused alterations in muscle structure and function (Gengyo-Ando & Kagawa, 1991).

Paramyosin is found in the musculature of a large number of invertebrates (Maroto *et al.* 1995). It is also found in the tegument of *S. mansoni* (Matsumoto *et al.* 1988; Gobert, 1998), extending the possible functions of this protein. Exposure of paramyosin to the host offers the potential for paramyosin-based vaccines (Kalinna & McManus, 1997). Also, muscle proteins were described as protective immunogens against the stable fly *Stomoxys calcitrans* (Schlein & Lewis, 1976), what indicates that direct damage to muscle derived from an immunological response may occur. Differential tissue expression of paramyosin has been studied in *D. melanogaster* (Maroto *et al.* 1995; Arredondo *et al.* 2001). To our knowledge, other studies on the distribution of paramyosin in tissues and different developmental stages of arthropods have not been reported. Expression analysis of BmPRM (Fig. 2) clearly indicates that tick organs with no prominent musculature, like the fat body and salivary glands, give a strong signal for paramyosin. The apparent absence of BmPRM in the saliva is not unexpected, since BmPRM does not possess a signal sequence.

Paramyosin of *Taenia crassiceps* (Kalinna & McManus, 1993), *S. japonicum* and *S. mansoni* (Loukas *et al.* 2001) have been shown to bind IgG non-immunologically. Schistosomes mask their surface with host proteins, including immunoglobulins (Tarleton & Kemp, 1981); paramyosin is probably involved in this mechanism by acting as a Fc receptor on the parasites' surface (Loukas *et al.* 2001). This role of surface paramyosin partially explains the origin of host protection following immunization with the protein, as specific anti-paramyosin antiserum interferes with IgG binding both in vitro and in the tegument of living schistosome parasites (Loukas *et al.* 2001). We have demonstrated comparable activity with rBmPRM, which binds both purified IgG

and IgG present in intact serum, and is dependent of protein conformation. However, further studies are needed to determine whether BmPRM acts as a Fc receptor. If BmPRM does not make contact with the host immune system, it cannot be a potential target for vaccine development. However, tick immunoglobulin binding proteins have been described (Wang & Nuttall, 1994, 1995), and a mechanism of selective IgG removal and excretion via salivation has been proposed (Wang & Nuttall, 1995). In this model, specific proteins would be responsible for sequestering and transporting IgG to the salivary glands, via haemolymph. As discussed by Wang & Nuttall (1999), such a mechanism could represent a self-defense system. IgGs would be delivered back into the host, possibly competing for the Fc receptors of cells like mast cells and basophils, which are thought to be essential for tick rejection by the host (Brown & Askenase, 1985; Worms, Askenase & Brown, 1988; Wang & Nuttall, 1999). BmPRM did not show significant similarity to tick immunoglobulin binding proteins when compared within sequence databases (data not shown). Whether BmPRM functions as a physiological defense mechanism remains to be determined.

Another characteristic of native and recombinant paramyosins of many species is its ability to bind collagen (Laclette *et al.* 1990; Laclette *et al.* 1992; Landa *et al.* 1993). This activity is especially important considering that paramyosin inhibits the classical pathway of the complement system, possibly by binding to the collagen-like stalks of C1q (Laclette *et al.* 1992). rBmPRM binds collagen, which suggests that BmPRM may also be a complement inhibitor. In addition, the presence of BmPRM in the gut may indicate its possible exposure to the blood meal, and consequently to the complement system. Specific uptake of immunoglobulins from the gut into the tick *Amblyomma americanum* haemolymph

has been described, and the probable involvement of IgG binding proteins in the process has been suggested (Jasinska, Jaworski & Barbour, 2000). BmPRM could, in this situation, perform two distinct functions related to host immune system evasion.

The potential of paramyosin as a vaccine candidate against schistosomiasis has been demonstrated (Pearce *et al.* 1988; McManus *et al.* 1998; Chen *et al.* 2000; Zhou *et al.* 2000; McManus *et al.* 2002), and the IgG and collagen binding activities described in the paramyosins of worms and molluscs (Laclette *et al.* 1992; Loukas *et al.* 2001), which are the likely ultimate targets of the immunological attack, were shown to be conserved in arthropods, or at least in rBmPRM. The use of immunoglobulin binding proteins as immunogens in anti-tick vaccines has been proposed, and an experiment using a recombinant IgG binding protein in guinea pigs resulted in a prolongation of the engorgement time required by female *Rhipicephalus appendiculatus* (Wang & Nuttall, 1999). Although BmPRM is not apparently in contact with the host immune system, its presence in several organs and developmental stages of the tick deserves greater attention. It may reflect the importance of BmPRM in functions related to host immune system evasion and as such provide a target for immunoprophylactic intervention, as a new 'concealed' antigen.

Onchocerca : MSGLYRSPSAALYKSPSMSAFSGLPAAFGMSVA DLGSLTRLEDKIRLLQEDLESERE : 59
Dirofilaria : -----AFGMSVA DLGSLTRLEDKIRLLQEDLESERE : 32
Brugia : MSGLYRSPSAALYKSPSMSAFGGLPAAFGMSVA DLGSLTRLEDKIRLLQEDLESARE : 59
Sarcoptes : MSA----RSAKFMYRSG-N---AGASGDL SVEYGT DLGALTRLEDKIRLLSDLESERE : 51
Dermatophagoides : ----- : -
Boophilus : MSS----RSSKMYKS-----SGGAGDISIEYGT DLGALTRLEDKIRLLQEDLESERE : 49
Drosophila : MSSSQAVRSSKYSYRATST--GPGTADVNIEYIQ DLSSLSRLEDKIRLLQDDLEVERE : 56

Onchocerca : LRNRIERERADLSVOLIALTDRLDAEGTTDSQIE SNRKREAELOKLRKLLAESQLENE :118
Dirofilaria : LRNRIERERADLSVOLIALTDRLDAEGTTDSQIE SNRKREAELOKLRKLLAESQLENE : 91
Brugia : LRNRIERERADLSVOLIALTDRLDAEGTTDSQIE SNRKREAELOKLRKLLAESQLENE :118
Sarcoptes : MRQRIEREKAELOIQVMSL SERLEEAEGSSESVEVMNKKRDS ELAKLRKLL EDVHIESE :110
Dermatophagoides : -----MNKKRDS ELAKLRKLL EDVHIESE : 24
Boophilus : LRQRIEREKSDITVQLMQLSDRLEEAEGSSETVVEVMNKKRDT ELSKLRKLL EDVHIESE :108
Drosophila : LRQRIEREKADLSVQVIQMSERLEEAEGGAHQFANRKRDAEL LKLRKLL EDVHIESE :115

Onchocerca : DAMNVLRRKKHODACLDTYEQIELOLQKKNKSIDRERORLOHEVIELTATAIDQLOKDKHLA :177
Dirofilaria : DAMNVLRRKKHODACLDTYEQIELOLQKKNKSIDRERORLOHEVIELTATIDQLOKDKHLA :150
Brugia : DAMNVLRRKKHODACLDTYEQIELOLQKKNKSIDRERORLOHEVIELTATAIDQLOKDKHLA :177
Sarcoptes : ETAHHLRQKHQAAIQEMQDQLDQVOKAKNKSDEKQKFOAEVFELLAQLETANKEKLT A :169
Dermatophagoides : ETAHHLRQKHQAAIQEMQDQLDQLOKAKNKSDEKQKFOAEVFELLAQLETANKEKLT A : 83
Boophilus : ETAHHLRQKHQAIAVAEMQEQMDLMTKAKSKAEKROKFOAEVFELLAQVENTNKEKITI :167
Drosophila : ETTLLKLRKKHNEIITDFQEQVEITKNKARA EKDKAKFOEVEVELLSQIESYNKEKIVS :174

Onchocerca : EKAAERFEAQTIELSNKVEDLNRHVNDLAQORQLQAENNDLKEIHDQKVOLDNLQHV :236
Dirofilaria : EKAAERFEAQTIELSNKVEDLNRHVNDLAQORQLQAENNDLKEIHDQKVOLDNLQHV :209
Brugia : EKAAERFEAQTVELSNKVEDLNRHVNDLAQORQLQAENNDLKEIHDQKVOLDNLQHV :236
Sarcoptes : MKTVEKLEYTVHELNIKIEEINRTVIELTSOKTRLSQENTE LIKEVHEHKMOLDNANHL :228
Dermatophagoides : LKNVEKLEYTVHELNIKIEEINRTVIELTSHKQRLSQENTE LIKEVHEVKLQLDNANHL :142
Boophilus : QKTVEKLEHTVYELNIRIEEINRTVIEVTAQTRLSAENAEYLKEVHELKVS LDNVNHL :226
Drosophila : EKHISKLEVSISELNVKIEEINRTVIDISSHSRRLSQENIE LTKDVQDLKVOLDTVSFS :233

Onchocerca : KYQLAQOLEEARRRLEDAERERSQLQAQLHQVQLELDSVRTALDEESAARAEAEHKLAL :295
Dirofilaria : KYQLAQOLEEARRRLEDAERERSQLQAQLHQVQLELDSVRTALDEESAARAEAEHKLAL :268
Brugia : KYQLAQOLEEARRRLEDAERERSQLQAQLHQVQLELDSVRTALDEESAARAEAEHKLAL :295
Sarcoptes : KQLAQOLEDTKHRLEEEERKRASLENHAHTLEVELES LKVQLEDEESEARLELERQLTK :287
Dermatophagoides : KTCIAQOLEDTRRRLEDEERKRASLENHAHTLEVELES LKVQLEDEESEARLELERQLTK :201
Boophilus : KSOLATOLEDTRRRLEDEERKRASLESSMHTLEVELES LKVQLEDEESEARLEVERQLVK :285
Drosophila : KSQVISOLEDARRRLEDEDRRSLLESSLHQVEIE LDSVRNOLEDEESEARIDLERQLVK :292

Onchocerca : ANTEITQWKS KFDAEVALHHEEVEDLRKKMLQKQAEYEEQIEIMLQKISOLEKAKSRLO :354
Dirofilaria : ANTEITQWKS KFDAEVALHHEEVEDLRKKMLQKQAEYEEQIEIMLQKISOLEKAKSRLO :327
Brugia : ANTEITQWKS KFDAEVALHHEEVEDLRKKMLQKQAEYEEQIEIMLQKISOLEKAKSRLO :354
Sarcoptes : ANGDAASWKS KYEAELQAHADVEVEELRRKMAOKISEYEEOLEALLNKCSSLAKQKSRLO :346
Dermatophagoides : ANGDAASWKS KYEAELQAHADVEVEELRRKMAOKISEYEEOLEALLNKCSSLAKQKSRLO :260
Boophilus : ANADAAAYKTKYETEVAHADVEVEELRRKMAOKISEYEEOLEALTRCSNLEKQKSRLO :344
Drosophila : ANADATS WQNKWNSEVAARAEVEVEELRRKYQVRIT ELEEHI ESLIVK VNNLEKMKTRLA :351

Onchocerca : SEVEVLIVDLEKAQNTIAILBRAKEOLEKTVNELKVRIDELTVELEAAQREARAALAE L :413
Dirofilaria : SEVEVLIVDLEKAQNTIAILBRAKEOLEKTVNELKVRIDELTVELEAAQREARAALAE L :386

Brugia : SEVEVLIVDLEKAQNTIAILEBRAKEOLEKTVNELKVRIDELTVELEAAQREARAALAEI : 413
Sarcoptes : SEVEVLIMDLEKATTHAQOLEKRVAOLEKLNLDLKNKLEEVIMLMEQAQKEARAKAAEI : 405
Dermatophagoides : SEVEVLIMDLEKATRHAQOLEKRVAOLEKINLNDLKNKLEEVIMLMEQAQKELRVKIAEI : 319
Boophilus : SEVEVLIMDLEKATAHAQNLKRVVAOLEKLNIDLKSKVEELTILLEQSQRELRQKVAEI : 403
Drosophila : SEVEVLIIDLEKSNNSCRELTTKSVNTELEKHNVELKSRLEDETTIILYETSQRDLKNKHADL : 410

Onchocerca : QKMKNLYEKAVEOKEBALARENKKLODDLHEAKEALADANRKLHELDLENARLAGEIREL : 472
Dirofilaria : QKMKNLYEKAEIOKEBALARENKKLODDLHEAKEALADANRKLHELDLENARLAGEIREL : 445
Brugia : QKLNLYEKAVEOKEBALARENKKLODDLHEAKEALADANRKLHELDLENARLAGEIREL : 472
Sarcoptes : QKLQHEYEKLRDORDALARENKKLTDDLAECKSQLNDAHRRIHEQEIEIKRLENEREEL : 464
Dermatophagoides : QKLQHEYEKLRDORDALARENKKLTDDLAEAKSQLNDAHRRIHEQEIEIKRLENERDEL : 378
Boophilus : QKLQHEYEKMRORDALORENKKLVDLSEAKSQLADAIRRIHEYEIEIKRLENERDEL : 462
Drosophila : VRTVHELDKVKDNNNQLTRENKKLGDDLHEAKGAINELNRRHELELELRLENERDEL : 469

Onchocerca : QTALKESEAARRDAENRAORALAEIQOLRIEMERRLOKKEEEMEALRKNMFEIDRLTA : 531
Dirofilaria : QTALKESEAARRDAENRAORALAEIQOLRIEMERRLOKKEEEMEALRKNMFEIDRLTA : 504
Brugia : QTALKESEAARRDAENRAORALAEIQOLRIEMERRLOKKEEEMEALRKNMFEIDRLTA : 531
Sarcoptes : SAAYKEAETLRKQEEAKNORLTAELAQVRHDYEKRLAQKDEEIEALRKQYQIEIEQLNM : 523
Dermatophagoides : SAAYKEAETLRKQEEAKNORLTAELAQVRHDYEKRLAQKDEEIEALRKQYQIEIEQLNM : 437
Boophilus : AAAYKEAETLRKQEEAKCORLTAELAQVRHAYERLQIKKEEIEALRKQYQIEIEQLNM : 521
Drosophila : TAAYKEAEAGRKAEEQORGLAADFNQYRHDAERRLEAKDEEIEALRKQYQIEIEQLNA : 528

Onchocerca : ALADAEARMKAEIARLKKKYQAEIAELEMTVDNLNRRANIEAOKTIKKOSEQLKVLQASL : 590
Dirofilaria : ALADAEARMKAEISRLKKKYQAEIAELEMTVDNLNRRANIEAOKTIKKOSEQLKILQASL : 563
Brugia : ALADAEARMKAEISRLKKKYQAEIAELEMTVDNLNRRANIEAOKTIKKOSEQLKILQASL : 590
Sarcoptes : RLAEAEAKLKTEIARLKKKYQAQITTELELSLDAANKANDLQKTIKKQALQITELQAHY : 582
Dermatophagoides : RLAEAEAKLKTEIARLKKKYQAQITTELELSLDAANKANDLQKTIKKQALQITELQAHY : 496
Boophilus : RLAEAEAKLKTEIARLKKKYQAQITTELEMSLDAANKQNDLQKTIKKQAIQITELQAHY : 580
Drosophila : RVIEAETRLKTEVTRIKKKLQIQITTELEMSLDVANKTNIDLQKVIKKQSLQITELQAHY : 587

Onchocerca : EDTQRQLQOQLDQYALAOQKVSALSAELEECKVALDNATRARKQAEIDLFEANGRITDL : 649
Dirofilaria : EDTQRQLQOQLDQYALAOQKVSALSAELEECKVALDNATRARKQAEIDLEANARITDL : 622
Brugia : EDTQRQLQOQLDQYALAOQKVSALSAELEECKVALDNATRARKQAEIDLFEANGRITDL : 649
Sarcoptes : DEVHRQLQOQAVDQLGVTORRCQALQAELEEMRIALQANRAKRAEQQLHEEAVVRVNEL : 641
Dermatophagoides : DEVHRQLQOQAVDQLGVTORRCQALQAELEEMRIALQANRAKRAEQQLHEEAVVRVNEL : 555
Boophilus : DEVHRQLQOQCADQLAISORRCQGLQAELEDEQRVALESALRSKRAEQSLEESQARVNEL : 639
Drosophila : EDVQRQLQOATLDQYAVAORRLAGLNGELLEVRSHLDSANRAKRTVELQYEEAASRINEL : 646

Onchocerca : VSTNNNLTAIKNKLETELSTAQADLDEATKELHAADERANRALADAARAVEQLHEEQEH : 708
Dirofilaria : VSTNNNLTAIKNKLETELSTAQADLDEATKELHAADERANRALADAARAVEQLHEEQEH : 681
Brugia : VSVNNNLTAIKNKLETELSTAQADLDEATKELHAADERANRALADAARAVEQLHEEQEH : 708
Sarcoptes : TTINVNLSAKSKLESEFSAALQADYDEVHKELRISDERVQKLTIELKSTKDLLVEEQER : 700
Dermatophagoides : TTINVNLSAKSKLESEFSALQADYDEVHKELRISDERVQKLTIELKSTKDLLVEEQER : 614
Boophilus : TTINVNIAAAKNKLESELSALQADYDELHKELRVVDERCQRTIVELKSTKDLLVEEQER : 698
Drosophila : TTANVSLVSIKSKLEQELSVVASDYEVSKELRISDERYQKQVVELKHVVEQVHEEQER : 705

Onchocerca : SMKIDALRKSLEEQVKQLQVQIQEAEFAAALLGGKRVIAKLETRIRDLETALEDEETRRHK : 767
Dirofilaria : SMKIDALRKSLEEQVKQLQVQIQEAEFAAALLGGKRVIAKLETRIRDLETALEDEETRRHK : 740
Brugia : SMKIDALRKSLEEQVKQLQVQFRKLKRR-LLGGKRVIAKLETRIRDLETALEDEETRRHK : 766
Sarcoptes : LVKMETVKKSLQEVRTLHVRIEVEANALAGGKRVIAKLESRIRDVEIEVEEERRRHA : 759
Dermatophagoides : LVKLETVKKSLQEVRTLHVRIEVEANALAGGKRVIAKLESRIRDVEIEVEEERRRHA : 673
Boophilus : YIKVESIKKSLQEVVRNLQVRLQVEANALAGGKRVIAKLEARIRDVEIEVEEKKRHA : 757
Drosophila : IVKLETIKKSLQEVVKNLSIRLEVEVLNAVAGSKRIISKLEARIRDLELEVEEKKRHA : 764

```

Onchocerca      : ETQGALRKKDRRIKEVQMQVD EHKMFVMAQDTADRLLEKLNIOKRQLGE-AE SLTMAN : 825
Dirofilaria     : ETQGALRKKDRRIKEVQMQVD EHKMFVMAQDTADRLLEKLNIOKWLGE-AE SLTMAN : 798
Brugia          : ETQGALRKKDRRIKEVQMQVD EHKMFVMAQDTADRLLEKLNIOKRQLGE-AE SLTMAN : 824
Sarcoptes       : ETEKMLRKKDHRLEKELLVONE D HKQIQLLQEMVDKMNEKVKVYKROMQETRE GMSQQN : 818
Dermatophagoides : ETDKMLRKKDHRVKE L L L L O ----- : 692
Boophilus      : ETQKILRKKDHRRAKELLLQTE D HKTITMLND AVEKLN EKVVYKROIN E-QE GLSQQN : 815
Drosophila      : ETIKILRKKERTVKEV L V L V QCE D QKNLILLQDALDKSTAK INIYRQLSE-QE GVSQQT : 822

Onchocerca      : LQRVRRYORELEDAEGRADQAESSIHLIRAKHRSSVTAGKNAS-ASKIYVLEDDQ---- : 879
Dirofilaria     : LQRVRRYORELEDAEGRADQAESSIHLIRAKHRSSVTGKNAS-ASKIYVL----- : 848
Brugia          : LR-VRRYORELEDAEGRADQAESSIHLIRAKHRHQLLRAKMLQ-RQKFTFSKMSNRDN- : 880
Sarcoptes       : LTRVRRFORELEAAEDRADQAESNLSFIRAKHRSWVTTSQVPGGTRQVFVTQEEQSNY- : 876
Dermatophagoides : ----- : -
Boophilus      : LTRVRRFORELEAAEDRADSAESNLSIRAKHRSWVTTSQVPGGTRQVFVTEESSQNF- : 873
Drosophila      : TTRVRRFORELEAAEDRADTAESSLNIRAKHRTFVTTSTVPG--SQVYIQETTRTITE : 879

```

Figure 1. Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of BmPRM and other paramyosin sequences. Genbank accession numbers: *Onchocerca volvulus*, Q02171; *Dirofilaria immitis*, P13392; *Brugia malayi*, Q01202; *Sarcoptes scabiei*, Q9BMM8; *Dermatophagoides farinae*, AAK39511; *Boophilus microplus* (BmPRM), AF479582; *Drosophila melanogaster*, P35415. Dark shading shows identity and light shading shows residues conserved in five/six sequences.

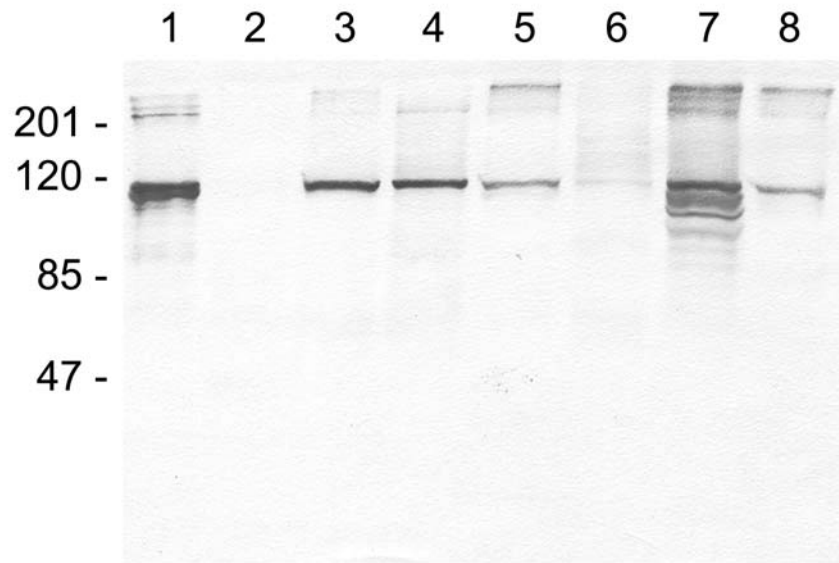


Figure 2. Western-blot analysis of *B. microplus* tissues, saliva and purified rBmPRM. Anti-rBmPRM rabbit serum diluted 1:2000. Lane 1, purified rBmPRM (1 μ g); lane 2, saliva from partially engorged females (6 μ g); lane 3, partially engorged female salivary glands extract (36 μ g); lane 4, fully engorged female fat body extract (20 μ g); lane 5, partially engorged female gut extract (18 μ g); lane 6, larval extract (96 μ g); lane 7, non-engorged total adult female extract (14 μ g); lane 8, total adult male extract (49 μ g). Molecular weight standards, kDa.

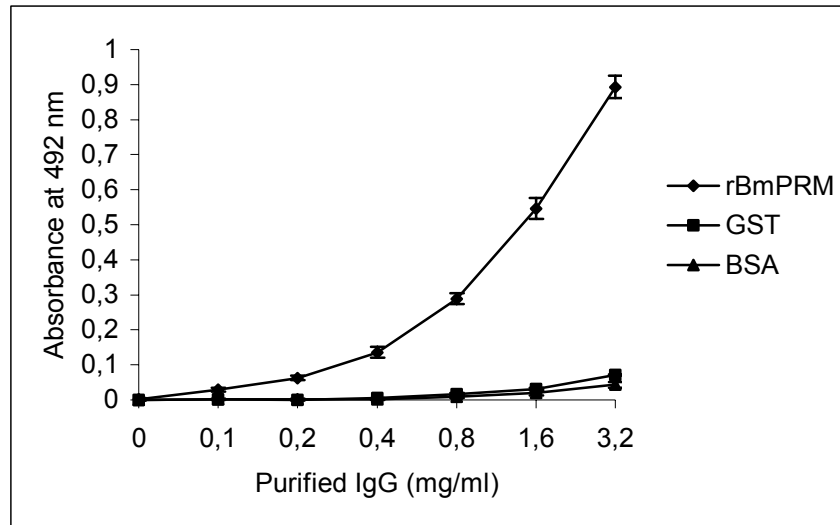
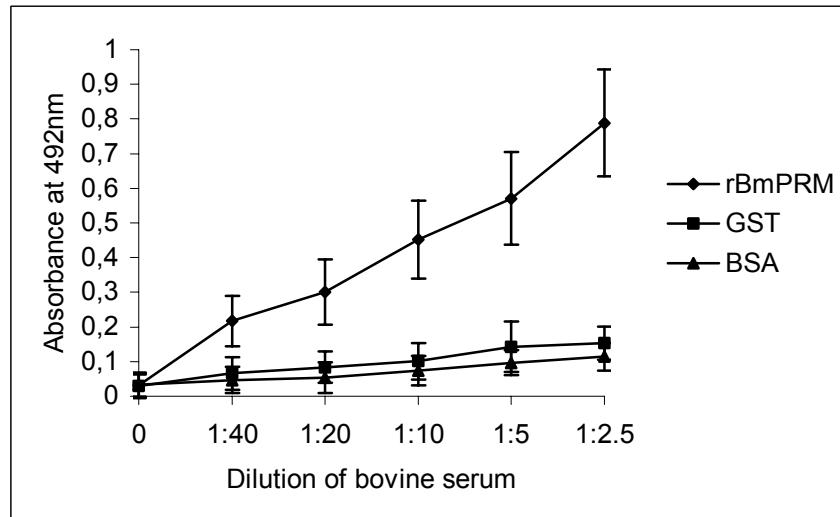
A**B**

Figure 3. IgG binding to rBmPRM detected by ELISA. Microplate wells were coated with 2.5 μ g of rBmPRM, GST and BSA and incubated with doubling dilutions of purified IgG (from 0.1 to 3.2 mg/ml; in A) or bovine sera (from 1:2.5 to 1:40; in B). A, data are expressed as means \pm S.D. of triplicate experiments; B, data are expressed as means \pm S.D. of three separate experiments, each one performed in duplicate, using different non-infested bovine sera. All sera and purified IgG were pre-absorbed against *E. coli* extract prior to incubation with the proteins.

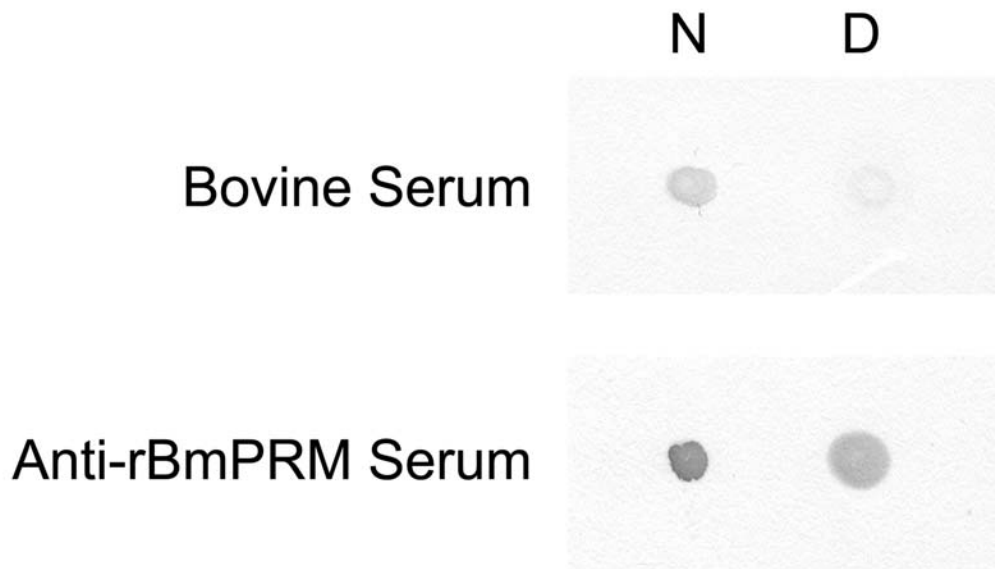


Figure 4. Dot-blot analysis of IgG binding activity of rBmPRM, (N) before and (D) after denaturation. The same amount of rBmPRM was applied to nitrocellulose membranes and incubated with non-infested bovine serum diluted 1:20. As a control a replicate was incubated with anti-rBmPRM rabbit serum diluted 1:2000. Both sera were pre-absorbed against *E. coli* extract prior to incubation with the membranes.

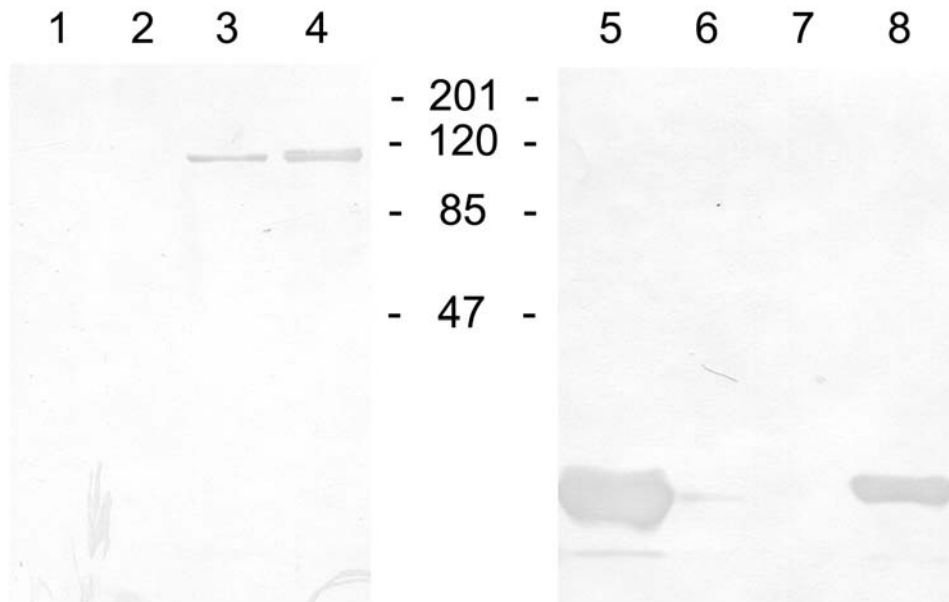


Figure 5. rBmPRM binds collagen. rBmPRM and GST were incubated with type I collagen and fractions collected following stepwise salt washes. Anti-rBmPRM rabbit serum diluted 1:2000 was used as probe in lanes 1-4 and anti-GST monoclonal antibody diluted 1:3000 in lanes 5-8. Lanes 1 and 5, unbound protein; lanes 2 and 6, last wash fraction (0.3 M NaCl); lanes 3 and 7, eluted protein; lanes 4 and 8, purified rBmPRM (4 μ g) and GST (4 μ g). Molecular weight standards, kDa.

REFERENCES

- ARREDONDO, J. J., FERRERES, R. M., MAROTO, M., CRIPPS, R. M., MARCO, R., BERNSTEIN, S. I., CERVERA, M. (2001). Control of *Drosophila* paramyosin/miniparamyosin gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 8278-8287.
- BERGER, B., WILSON, D. B., WOLF, E., TONCHEV, T., MILLA, M., KIM, P. S. (1995). Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8259-8263.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- BROWN, S. J. & ASKENASE, P. W. (1985). *Amblyomma americanum*: requirement for host Fc receptors in antibody mediated acquired immune resistance to ticks. *Experimental Parasitology* 59, 248-256.
- CHEN, H., NARA, T., ZENG, X., SATOH, M., WU, G., JIANG, W., YI, F., KOJIMA, S., ZHANG, S., HIRAYAMA, K. (2000). Vaccination of domestic pig with recombinant paramyosin against *Schistosoma japonicum* in China. *Vaccine* 18, 2142-2146.
- DA SILVA VAZ JR., I., OZAKI, L. S. & MASUDA, A. (1994). Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissues. *Veterinary Parasitology* 52, 71-78.
- DA SILVA VAZ JR, I., LOGULLO, C., SORGINE, M., VELLOSO, F. F., ROSA DE LIMA, M. F., GONZALES, J. C., MASUDA, H., OLIVEIRA, P. L., MASUDA, A. (1998). Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66, 331-341.

- DUNN, S. D. (1986). Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western-blot by monoclonal antibodies. *Analytical Biochemistry* 157, 144-153.
- GARCIA-GARCIA, J. C., MONTERO, C., REDONDO, M., VARGAS, M., CANALES, M., BOUE, O., RODRIGUEZ, M., JOGLAR, M., MACHADO, H., GONZALEZ, I. L., VALDES, M., MENDEZ, L., de la FUENTE, J. (2000). Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 18, 2275-2287.
- GENGYO-ANDO, K. & KAGAWA, H. (1991). Single charge change on the helical surface of the paramyosin rod dramatically disrupts thick filament assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology* 219, 429-441.
- GOBERT, G.N. (1998). The role of microscopy in the investigation of paramyosin as a vaccine candidate against *Schistosoma japonicum*. *Parasitology Today* 14, 115-118.
- HARLOW, E. & LANE, D. (1988). *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- JASINSKA, A., JAWORSKI, D. C. & BARBOUR, A. G. (2000). *Amblyomma americanum*: specific uptake of immunoglobulins into tick hemolymph during feeding. *Experimental Parasitology* 96, 213-221.
- KAGAWA, H., GENGYO, K., McLACHLAN, A. D., BRENNER, S., KARN, J. (1989). Paramyosin gene (unc-15) of *Caenorhabditis elegans*: molecular cloning, nucleotide sequence and models for thick filament structure. *Journal of Molecular Biology* 207, 311-333.
- KALINNA, B. H. & McMANUS, D. P. (1993). An IgG (Fc_γ)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with schistosome paramyosin. *Parasitology* 106, 289-296.

- KALINNA, B. H. & McMANUS, D. P. (1997). A vaccine against the asian schistosome, *Schistosoma japonicum*: an update on paramyosin as a target of protective immunity. *International Journal for Parasitology* 27, 1213-11219.
- KOZAK, M. (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *The Journal of Cell Biology* 115, 887-903.
- LACLETTE, J. P., ALAGÓN, A., WILLMS, K., TORRE-BLANCO, A. (1990). Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to collagen. *Journal of Parasitology* 76, 273-275.
- LACLETTE, J. P., SHOEMAKER, C. B., RICHTER, D., ARCOS, L., PANTE, N., COHEN, C., BING, D., NICHOLSON-WELLER, A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. *The Journal of Immunology* 148, 124-128.
- LAEMMLI, E. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LANDA, A., LACLETTE, J. P., NICHOLSON-WELLER, A., SHOEMAKER, C. B. (1993). cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Molecular and Biochemical Parasitology* 60, 343-348.
- LOUKAS, A., JONES, M. K., KING, L. T., BRINDLEY, P. J., McMANUS, D. P. (2001). Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. *Infection and Immunity* 69, 3646-3651.
- McLACHLAN, A. D. & KARN, J. (1982). Periodic charge distributions in the myosin rod amino acid sequence match cross-bridge spacings in muscle. *Nature* 299, 226-231.
- McMANUS, D. P., LIU, S., SONG, G., XU, Y., WONG, J. M. (1998). The vaccine efficacy of native paramyosin (Sj-97) against chinese *Schistosoma japonicum*. *International Journal for Parasitology* 28, 1739-1742.

- McMANUS, D. P., WONG, J. Y. M., ZHOU, J., CAI, C., ZENG, Q., SMYTH, D., LI, Y., KALINNA, B. H., DUKE, M. J., YI, X. (2002). Recombinant paramyosin (rec-Sj-97) tested for immunogenicity and vaccine efficacy against *Schistosoma japonicum* in mice and water buffaloes. *Vaccine* 20, 870-878.
- MAROTO, M., ARREDONDO, J. J., SAN ROMAN, M., MARCO, R., CERVERA, M. (1995). Analysis of the paramyosin/miniparamyosin gene. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 4375-4382.
- MATSUMOTO, Y., PERRY, G., LEVINE, R. J. C., BLANTON, R., MAHMOUD, A. A. F., AIKAWA, M. (1988). Paramyosin and actin in schistosomal teguments. *Nature* 333, 76-78.
- MATTSON, J. G., LJUNGGREN, E. L. & BERGSTROM, K. (2001). Paramyosin from the parasitic mite *Sarcoptes scabiei*: cDNA cloning and heterologous expression. *Parasitology* 122, 555-562.
- MULENGA, A., SUGIMOTO, C. & ONUMA, M. (2000). Issues in tick vaccine development: identification of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and Infection* 2, 1353-1361.
- NOLAN, J. (1985). Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 18, 155-166.
- PEARCE, E. J., JAMES, S.L., HIENY, S., LANAR, D. E., SHEER, A. (1988). Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5678-5682.
- PEARSON, W. R. & LIPMAN, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 2444-2448.

- RIBEIRO, J. M. C. (1989). Role of saliva in tick/host interactions. *Experimental and Applied Acarology* 7, 15-20.
- RIBEIRO, J. M. C. (1995). How ticks make a living. *Parasitology Today* 11, 91-93.
- RODRIGUEZ, M., PENICHER, M. L., MOURIS, A. E., LABARTA, V., LORENZO LUACES, L., RUBIERA, R., CORDOVÉS, C., SÁNCHEZ, P. A., RAMOS, E., SOTO, A., CANALES, M., PALENZUELA, D., TRIGUERO, A., LLEONARD, R., HERRERA, L., DE LA FUENTE, J. (1995a). Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Veterinary Parasitology* 57, 339-349.
- RODRIGUEZ, M., MASSARD, C. L., FONSECA, A. H., RAMOS, N. F., MACHADO, H., LABARTA, V., DE LA FUENTE, J. (1995b). Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. *Vaccine* 13, 1804-1808.
- SCHLEIN, Y. & LEWIS, C.T. (1976). Lesions in haematophagous flies after feeding on rabbits immunized with fly tissues. *Physiological Entomology* 1, 55-59.
- ROSA DE LIMA, M., FERREIRA, C. A. S., FREITAS, D. R. J., MASUDA, A. Cloning and partial characterization of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione-S-transferase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, in press.
- ROTT, M. B., FERNÁNDEZ, V., FARIAS, S., CENI, J., FERREIRA, H. B., HAAG, K. L., ZAHA, A. (2000). Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Tropica* 75, 331-340.

- TARLETON, R. L. & KEMP, W. M. (1981). Demonstration of IgG-Fc and C3 receptors on adult *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Immunology* 126, 379-384.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- TSAI, L. C., CHAO, P. L., SHEN, H. D., TANG, R. B., CHANG, T. C., CHANG, Z. N., HUNG, M. W., LEE, B. L., CHUA, K. L. (1998). Isolation and characterization of a novel 98-kd *Dermatophagoides farinae* mite allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102, 295-303.
- WANG, H. & NUTTALL, P. A. (1994). Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* 109, 525-530.
- WANG, H. & NUTTALL, P. A. (1995). Immunoglobulin-G binding proteins in the ixodid ticks, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* and *Ixodes hexagonus*. *Parasitology* 111, 161-165.
- WANG, H. & NUTTALL, P. A. (1999). Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56, 286-295.
- WIKEL, S. K. (1999). Modulation of the host immune system by ectoparasitic arthropods. *BioScience* 49, 311-320.
- WILLADSEN, P., BIRD, P., COBON, G. S., HUNGERFORD, J. (1995). Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* 110, 843-850.
- WILLADSEN, P. & KEMP, D. H. (1988). Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. *Parasitology Today* 4, 196-198.

WORMS, M. J., ASKENASE, P. W. & BROWN, S. J. (1988). Requirement for host Fc receptors and IgG antibodies in host immune responses against *Rhipicephalus appendiculatus*. *Veterinary Parasitology* 28, 153-161.

ZHOU, S., LIU, S., SONG, G., XU, Y., SUN, W. (2000). Protective immunity induced by the full-length cDNA encoding paramyosin of chinese *Schistosoma japonicum*. *Vaccine* 18, 3196-3204.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Carlos Termignoni, Dr. Fabiana Horn and Mozart da Silva Lauxen for helpful discussions and critical reading of the manuscript, and to Dr. José Marcos C. Ribeiro for important cooperation. We wish to thank Cenbiot for the supply of restriction enzymes. This work was supported by grants from CAPES, CNPq, PRONEX, PADCT and FAPERGS.

DISCUSSÃO

Glândula salivar, intestino e larva têm sido os tecidos e estágio do desenvolvimento mais estudados para serem utilizados como antígenos em uma vacina contra o *B. microplus* (JOHNSTON et al, 1986; KEMP et al, 1986; RIDING et al, 1994; WILLADSEN et al, 1988 e 1996; WIKEL, 1996). Entretanto, por motivos econômicos e sanitários, é impossível o uso de extratos brutos em vacinas comerciais. Uma alternativa óbvia é a identificação, clonagem dos genes respectivos e expressão em sistemas heterólogos de potenciais antígenos protetores. A sondagem imunológica é uma das metodologias que é utilizada com sucesso na identificação de genes de parasitas animais (LIGHTOWLERS, 1994). Entretanto a expressão de bibliotecas de cDNA em organismos procarióticos pode levar ao insucesso na obtenção de seqüências de proteínas glicosiladas, considerando que bactérias não adicionam resíduos de carboidratos. A tentativa frustrada de isolamento por sondagem imunológica do cDNA da proteína Bm86 reforça esta hipótese (COBON & WILLADSEN, 1990), uma vez que esta proteína é altamente glicosilada (WILLADSEN et al, 1992). Desta forma os cDNAs isolados por esta estratégia tendem a ficar restritos as moléculas com epitopos imunodominantes de natureza peptídica. Proteínas como a BYC, um candidato potencial a compor uma vacina contra o carrapato e composta em até 20 % por carboidratos (LOGULLO et al, 1998), podem não ser identificadas. Por outro lado, epitopos compostos por carboidratos nem sempre são protetores e os cDNAs isolados podem corresponder, na verdade, a imunógenos mais promissores. Neste sentido foi demonstrado que os epitopos

de carboidratos da Bm86 tem muito pouca relação com antigenicidade protetora (WILLADSEN & McKENNA, 1991).

Poucos genes foram isolados a partir da glândula salivar do *B. microplus*. Entre eles destacam-se a Bm91 (RIDING et al, 1994) e a proteína semelhante à mucina de vertebrados (McKENNA et al, 1998), ambos descritos como antígenos protetores contra o carrapato. Neste trabalho foram isolados três cDNAs que correspondem a genes não descritos anteriormente em *B. microplus* e que apresentam-se como candidatos potenciais a apresentarem uma resposta imunológica protetora em bovinos. Entre os dois genes caracterizados podem ser notadas algumas características comuns, como o fato de serem descritas como proteínas multifuncionais e de estarem possivelmente relacionadas a mecanismos de evasão em parasitas.

A calreticulina é uma proteína altamente conservada (COPPOLINO & DEDHAR, 1998), cuja função principal acreditava-se ser primariamente o de chaperonina molecular dentro do retículo endoplasmático (MICHALAK et al, 1992). Entretanto a calreticulina é encontrada também dentro do núcleo e extracelularmente, tendo sido demonstrado que possivelmente desempenhe uma gama muito ampla de funções (MICHALAK et al, 1999). Suas possíveis funções incluem estocagem de cálcio (MERY et al, 1996; COPPOLINO et al, 1997; KWON et al, 2000), mediação da função de integrinas (COPPOLINO et al, 1995; ZHU et al, 1997), lectina extracelular (COPPOLINO & DEDHAR, 1998), chaperonina molecular (SVAERKE & HOUEN, 1998; PETERSON & HELENIUS, 1999; JORGENSEN et al, 2000), adesão celular (COPPOLINO et al, 1997), produção de óxido nítrico pelo endotélio (KUWABARA et al, 1995), mediação da atividade de perforinas (ANDRIN et al, 1998; FRASER et al, 1998; FRASER et

al, 2000), envolvimento em processos de reconhecimento de moléculas próprias e não-próprias em invertebrados (CHOI et al, 2002), mediação da atividade mitogênica do fibrinogênio sobre fibroblastos (GRAY et al, 1995) além de inibir a expressão gênica regulada por esteróides (BURNS et al, 1994; DEDHAR et al, 1994). O seu envolvimento em doenças autoimunes também está consideravelmente caracterizado (EGGLETON et al, 1997; EGGLETON & LLEWELLYN, 1999). A calreticulina humana é ainda descrita como capaz de inibir a via clássica do sistema complemento pela sua ligação direta a C1q (KISHORE et al, 1997; KOVACS et al, 1998). Esta característica, combinada com a secreção da calreticulina por parasitas, tais como *A. americanum* (JAWORSKI et al, 1995) e *Necator americanus* (PRITTCHARD et al, 1999), abriu a possibilidade desta proteína ser utilizada para imunossupressão dos hospedeiros. Além disso, a calreticulina de *N. americanus* é capaz de inibir o sistema complemento e apresenta 5 motivos de ligação a C1q conservados em relação aos 6 motivos presentes na calreticulina humana, com pequenas variações (KASPER et al, 2001). Com relação ao *B. microplus*, BmCRT mostrou estar presente na saliva e a análise de sua seqüência indica a presença de 6 motivos de ligação a C1q: VESTKGDNL/IESKHKSDF, DAEKSKG/DEEKDKG, FNYKGKN/FNYKGKN, KEVRCKDD/KDIRCKDD, WDDRAKIDD/WDERAKIDD e GEWKPKQ/GEWKPRQ (estão indicados BmCRT/calreticulina humana, respectivamente; resíduos idênticos estão sublinhados). A possibilidade de a BmCRT ligar-se a C1q é reforçada pelo fato de ter sido demonstrado a presença de pelo menos duas frações derivadas de uma gel filtração com atividade anticomplementar contra a via clássica a partir do extrato de glândulas salivares do *B. microplus* (FERREIRA et al, 1998). Atividade anticomplementar também foi

detectada na saliva (dados não publicados). A identificação de inibidores de complemento em parasitas é uma estratégia para encontrarem-se alvos para possíveis vacinas, uma vez que são fatores normalmente essenciais e altamente conservados (JOKIRANTA et al, 1995).

A presença da calreticulina como imunomodulador extracelular de parasitas pode ser considerado como um exemplo de mimetismo molecular, pois a proteína do parasita desempenharia a mesma função da proteína ortóloga do hospedeiro. Desse modo também seria evitado um reconhecimento mais eficaz da proteína do parasita pelo sistema imunológico, o que é confirmado para BmCRT, uma vez que a proteína recombinante não é reconhecida por soros de animais infestados. Entretanto esta não é uma característica compartilhada pela maioria dos parasitas descritos na literatura, tais como *A. americanum* (SANDERS et al, 1998; SANDERS et al, 1999), *N. americanus* (PRITCHARD et al, 1999), *S. mansoni* (KHALIFE et al, 1993), *Trypanosoma cruzi* (MARCELAIN et al, 2000), *Dirofilaria immitis* (TSUJI et al, 1998), *Onchocerca volvulus* (ROKEACH et al, 1994), uma vez que a calreticulina destas espécies é reconhecida pelo soro de hospedeiros infestados. Esta grande imunogenicidade apresentada pelas calreticulinas de parasitas mostrou-se também epidemiologicamente informativa. Um imunoensaio foi desenvolvido para a detecção de anticorpos humanos contra a calreticulina de *T. cruzi* (MARCELAIN et al, 2000) e a calreticulina de *A. americanum* é sugerida, em humanos, como um biomarcador da exposição a carrapatos (SANDERS et al, 1998). Possíveis explicações seriam diferentes graus de adaptação dos sistemas de evasão de cada parasita ao(s) seu(s) hospedeiro(s) e a variação no grau de importância da calreticulina em cada relação parasita-hospedeiro. Isto é particularmente

sugerido pelo fato que a mesma proteína que não é reconhecida por soros de bovinos infestados é reconhecida pelo soro de cães infestados por *Rhipicephalus sanguineus*. Uma diferença importante entre o *B. microplus* e a maioria dos outros carrapatos ixodídeos, incluindo o *R. sanguineus*, é a presença de somente um hospedeiro durante a sua vida parasitária. Cada relação parasitária possui componentes próprios que tendem a determinar o sucesso do parasita ou do hospedeiro, como o resultado final da disputa entre os mecanismos do sistema imune e de evasão (RIBEIRO, 1995; WIKEL, 1999). Um exemplo desta situação é sugerido por RIBEIRO (1987). As reações de rejeição a carrapatos são baseadas em um exudato edematoso abundante produzido no sítio de fixação dos carrapatos nos hospedeiros resistentes. Considerando que as reações que levam a formação de edema variam em diferentes hospedeiros vertebrados, um carrapato adaptado a um determinado hospedeiro possivelmente não sobreviveria em outra espécie. Neste contexto o *Ixodes scapularis* está muito bem adaptado para prevenir edema derivado de bradicinina e anafilatoxina, porém não possui um anti-histamínico salivar. Camundongos produzem edema principalmente através de bradicinina e anafilatoxina, enquanto que cobaias o fazem pela liberação de histamina proveniente de mastócitos. Esta diferença poderia explicar porque o *I. scapularis* pode alimentar-se repetidamente em camundongos, mas não em cobaias.

A secreção de chaperoninas, ao contrário do que se pensava inicialmente, não parece ser um fato raro. Além da calreticulina, a clusterina e a calnexina também são encontradas na porção externa da membrana plasmática e/ou secretadas (OKAZAKI et al, 2000; WILSON & EASTERBROOK-SMITH, 2000). Além disso, a clusterina também é descrita como um inibidor do sistema

complemento (JENNE & TSCHOPP, 1992) e potencialmente representa parte de um mecanismo de defesa do endotélio contra a sua ativação excessiva (URBICH et al, 2000). A calnexina, como a calreticulina, também é encontrada no tegumento de esquistossomos e produz uma resposta humoral protetora contra o parasita (HAWN & STRAND, 1994). Suas funções no tegumento não foram caracterizadas. A proteína recombinante, entretanto, é capaz de ligar cálcio e foi sugerido um papel importante no funcionamento celular (HOOKER & BRINDLEY, 1999). Portanto, a expressão superficial e/ou secreção de chaperoninas pode representar um mecanismo fisiológico comum em mamíferos, o qual parece ser mimetizado por parasitas.

A possível utilização da calreticulina no desenvolvimento de imunidade protetora já foi sugerida para *N. americanus* (PRITCHARD et al, 1999), *S. mansoni* (KHALIFE et al, 1993) e *A. americanum* (JAWORSKI et al, 1995). Entretanto a falta de imunogenicidade da rBmCRT em bovinos é uma dificuldade a ser superada. O uso de diferentes adjuvantes, a conjugação com proteínas mais imunogênicas ou simplesmente da proteína recombinante agregada são metodologias que poderiam ser testadas. Uma questão importante a respeito da indução de proteção pela formação de anticorpos contra a calreticulina é levantada pelos trabalhos com *N. americanus* (PRITCHARD et al, 1995; PRITCHARD et al, 1999; KASPER et al, 2001). *N. americanus* é altamente alergênico a humanos e a calreticulina é um dos alérgenos principais. Pacientes com títulos de IgE mais altos apresentam um número menor de parasitas, os quais também são menos fecundos. A resposta protetora natural é, portanto, predominante Th2. A presença de IgEs específicas contra rBmCRT no soro de animais infestados não foi analisada. Esta informação torna-se importante

considerando que a maior parte da resistência natural adquirida pelos bovinos contra o carrapato é derivada de hipersensibilidade imediata contra o estágio de larva. Pouco se sabe a respeito do tipo de produtos secretados pelas larvas nos hospedeiros, porém seriam estes que provavelmente estariam envolvidos no desenvolvimento da resistência induzida por infestações sucessivas. Caso ocorra a secreção da BmCRT pela larva ela seria um alvo provável tanto por uma possível resposta natural mediada por IgEs como induzida artificialmente.

O envolvimento da calreticulina com doenças autoimunes, como citado anteriormente, já está bem caracterizado. Autoanticorpos contra calreticulina foram detectadas em doenças como lupus eritematoso sistêmico (EGGLETON et al, 1997), síndrome de Sjögrens (EGGLETON et al, 1997) e doença celíaca (SANCHEZ et al, 2000). Desta forma, o uso da calreticulina como imunógeno deve ser tratado com cautela. Pacientes infectados com *O. volvulus* apresentam níveis significativamente maiores de anticorpos que reconhecem a calreticulina humana quando comparados com controles (LUX et al, 1992; MEILOF et al, 1993). Por outro lado, não é observada reatividade cruzada entre as calreticulinas humana e de *N. americanus* (PRITCHARD et al, 1999). A indução de uma resposta humoral em bovinos contra a BmCRT deve levar em conta a possibilidade da formação de anticorpos que reconheçam a proteína do hospedeiro e as possíveis conseqüências deste fato.

Semelhantemente a calreticulina, acreditava-se que as funções da paramiosina ficavam restritas aos de uma proteína estrutural muscular de invertebrados. Neste sentido foi surpreendente a descoberta que ela era capaz de gerar uma imunidade protetora contra a esquistossomose quando utilizada como vacina (PEARCE et al, 1988), principalmente considerando que este

resultado era decorrente da presença desta proteína no tegumento (MATSUMOTO et al, 1988; GOBERT, 1998). As funções que esta proteína desempenha no tegumento deveriam, portanto, ser essenciais à sobrevivência do parasita. A descoberta que paramiosina era capaz de ligar-se a colágeno (LACLETTE et al, 1990) indicou que ela poderia ligar-se a proteínas que apresentassem estruturas semelhantes. A sua capacidade de ligação a C1q comprovou esta idéia e tornou-a um possível inibidor da via clássica do sistema complemento (LACLETTE et al, 1992). Também foi demonstrada que a paramiosina de *S. mansoni* (LOUKAS et al, 2001) e *Taenia crassiceps* (KALINNA & McMANUS, 1993) eram capazes de ligarem-se à porção Fc de imunoglobulinas. Desta forma, assim como a calreticulina, a paramiosina de parasitas parece desempenhar várias funções, sendo provável o seu envolvimento na evasão do sistema imune dos hospedeiros.

Outra característica descrita entre paramiosinas é a presença de anticorpos em soros de hospedeiros infestados. A paramiosina de *Sarcoptes scabiei*, causador da escabiose, foi reconhecida por soros de pacientes infestados (MATTSSON et al, 2001), de maneira semelhante ao que foi descrito para a filariose (LANGY et al, 1998). As paramiosinas de dois outros ácaros, *Dermatophagoides farinae* (TSAI et al, 1998) e *Blomia tropicalis* (RAMOS et al, 2001), por sua vez, mostraram ser altamente alergênicas em humanos. Conseqüentemente pode-se supor que as paramiosinas destes organismos entram em contato com o sistema imune dos hospedeiros, os quais desenvolvem uma resposta humoral contra as mesmas. A BmPRM aparentemente não entra em contato com o hospedeiro, ou pelo menos não pela saliva, conseqüentemente não é provável a presença de anticorpos específicos

contra ela em soros de animais infestados. Entretanto a presença de anticorpos contra paramiosina no soro de hospedeiros de outros ácaros talvez indique que esta possibilidade também deva ser verificada em *B. microplus*.

A capacidade de ligação do colágeno pela BmPRM indica a possibilidade de possuir atividade anti-complementar. Poderia corresponder, portanto, a uma das frações contendo atividade anticomplementar encontradas no extrato de glândulas salivares citadas anteriormente (FERREIRA et al, 1998). Porém a importância desta atividade somente será significativa na fisiologia do carrapato se a BmPRM tiver contato com o sistema complemento, o que poderia ocorrer no intestino. Sua presença no intestino poderia também estar relacionada ao mecanismo descrito em *A. americanum*, onde as imunoglobulinas são especificamente carregadas do intestino para a hemolinfa (JASINSKA et al, 2000). Além disso, a presença da BmPRM em muitos estágios e tecidos do carrapato indica que ela possua outras funções que não se restringem ao músculo. Uma das possibilidades seria o mecanismo proposto por Wang & Nuttall (1994, 1995) de transporte e secreção das imunoglobulinas absorvidas pelo carrapato através da salivação. As proteínas ligantes de imunoglobulinas descritas neste mecanismo parecem ser importantes também na relação de machos e fêmeas (WANG et al, 1998). Os machos de *R. appendiculatus* alimentam-se em sítios adjacentes as fêmeas por eles fecundadas e, portanto, secretam a sua saliva, contendo todas as suas propriedades imunossupressoras, no mesmo local de alimentação das fêmeas. Esta co-secreção de saliva pelos machos e fêmeas parece ser importante para o seu sucesso reprodutivo, uma vez que anticorpos específicos contra proteínas ligantes de IgG, injetados na hemolinfa dos machos, diminuem o peso corporal das fêmeas ingurgitadas, apesar de não ter efeito

sobre os machos (WANG et al, 1998). Esta é uma das possíveis explicações para a alimentação gregária observada em carrapatos (WANG et al, 2001), e também representa um exemplo da importância da secreção de imunoglobulinas para os carrapatos, tornando a rBmPRM um possível candidato para utilização em uma vacina.

Tanto a calreticulina como a paramiosina são possíveis inibidores do sistema complemento, tendo sido assim descritos por ligarem-se a C1q. Além da óbvia inibição do sistema complemento, o seqüestro de C1q pode ter outras conseqüências. C1q é encontrado *in vivo* na ausência de C1r e C1s, indicando que possui funções adicionais além da ativação da cascata da via clássica (EGGLETON et al, 2000). Camundongos BALB/c adquirem resistência depois de repetidas infestações do carrapato *Dermacentor variabilis*, e a infiltração de mastócitos e eosinófilos na pele é correlacionado com a aquisição desta resistência (BROSSARD et al, 1982). C1q, por sua vez, está envolvido na indução da migração de eosinófilos (KUNA et al, 1996). Também estimula a fagocitose de monócitos/macrófagos e neutrófilos, além de aumentar a secreção de imunoglobulinas pelos linfócitos B (revisado por TENNER, 1998). Também a presença de receptores de C1q no endotélio já foi descrita (ANDREWS et al, 1981), tendo sido demonstrado que C1q é um co-fator essencial na indução, mediada por complexos imunes, da expressão das adesinas responsáveis pela atração e localização dos leucócitos aos sítios de inflamação (LOZADA et al, 1995). A presença de mais de um ligante de C1q em parasitas, portanto, não é surpreendente. Um fato importante é o de que um dos receptores de C1q encontrados nas células humanas é a calreticulina (EGGLETON et al, 2000). Desta forma, o parasita secretaria a proteína ortóloga solúvel do receptor

relacionado à função do hospedeiro que necessita evadir. A inibição do sistema complemento através de mimetismo molecular, tanto inibindo o reconhecimento como erradicando componentes do complemento, são mecanismos encontrados em muitos patógenos (WÜRZNER, 1999). A importância deste tipo de evasão, se confirmada em *B. microplus*, poderá determinar o sucesso ou não da utilização da calreticulina, e talvez também da paramiosina, como um componente de uma vacina contra este carrapato. A paramiosina, além da inibição de suas possíveis funções na evasão, também pode representar um novo “antígeno oculto” do carrapato.

CONCLUSÕES

1. A biblioteca de expressão sintetizada a partir de RNA poli-A⁺ de glândulas salivares de partenóginas e a metodologia empregada para a sondagem imunológica são adequadas para a identificação de antígenos do carrapato *Boophilus microplus*;
2. Foram identificados cDNAs codificantes para a calreticulina e paramiosina do *B. microplus*, cujas seqüências deduzidas de aminoácidos mostraram-se altamente conservadas quando comparadas com as seqüências de proteínas de outros organismos;
3. A expressão do gene correspondente a calreticulina do *B. microplus* assim como a presença da proteína foi demonstrada em todos os tecidos e fases do desenvolvimento testados;
4. Foi demonstrada a presença da calreticulina na saliva do carrapato, indicando sua secreção no hospedeiro durante a alimentação;
5. A presença da paramiosina foi demonstrada em vários tecidos e fases do desenvolvimento do carrapato, porém não na saliva, indicando que ela pode constituir-se em um antígeno oculto;
6. A calreticulina recombinante não é reconhecida por soros de bovinos infestados em ensaios de Western blot, porém é reconhecida pelo soro de cães infestados pelo carrapato *Rhippicephalus sanguineus*;

7. A calreticulina recombinante não se mostrou imunogênica quando artificialmente inoculada em um bovino, mas foi imunogênica quando inoculada em coelho;
8. A paramiosina recombinante foi imunogênica tanto quando inoculada em coelho como em bovino;
9. A paramiosina recombinante é capaz de ligar-se a IgG purificada e IgG presente no soro bovino, sendo esta atividade perdida quando a proteína é desnaturada;
10. A paramiosina recombinante apresenta atividade de ligação a colágeno;
11. Ambas as proteínas podem ser consideradas como antígenos não aparentes ao sistema imune do hospedeiro, e apresentam características que as credenciam como candidatos potenciais a comporem uma vacina contra o carrapato *B. microplus*.

PERSPECTIVAS

Este trabalho faz parte de um projeto mais amplo que visa o desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato *Boophilus microplus*. Nele foram identificados cDNAs correspondentes a antígenos de glândula salivar deste carrapato, tendo sido conduzidos a expressão e purificação das proteínas recombinantes em *Escherichia coli*. A obtenção das proteínas recombinantes purificadas permitirá que a linha de pesquisa se desenvolva em vários projetos, tais como:

1. teste da capacidade do uso da paramiosina e calreticulina em experimentos de vacinação e desafio, isoladamente e em conjunto com outros antígenos;
2. teste de outras atividades destas proteínas, como ligação a C1q e congulininas;
3. teste de novos protocolos de imunização, incluindo o teste de outros adjuvantes, de doses diferentes e de frequências diversas de inóculos, o que será particularmente importante na indução de resposta contra a calreticulina;
4. a imunolocalização destas proteínas no carrapato, especialmente na glândula salivar e intestino poderiam indicar suas possíveis funções.

Esses projetos estão em diferentes fases de execução, permitindo que o grupo de pesquisa avance no conhecimento adquirido sobre estes antígenos, especialmente na verificação da viabilidade de sua utilização em uma vacina eficiente contra o *B. microplus*.

BIBLIOGRAFIA

- Agbede, R.I.S., Kemp, D.H. Digestion in the cattle-tick *Boophilus microplus*: Light microscope study of the gut cells in nymphs and females. *International Journal for Parasitology*, 15: 147-157, 1986.
- Allen, J.R. Host resistance to ectoparasites. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 13: 1287-1303, 1994.
- Alves-Branco, F.P., Echevarria, F.A.M., Siqueira, A.S. Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. *Comunicado Técnico da EMBRAPA*, Brasília, D.F. 1: 1-4, 1983.
- Alves-Branco, F.P.J., Sapper, M.F.M., Artilles, J.M.J. Diagnóstico de resistência de *Boophilus microplus* a piretróides. In: XI Congresso Estadual de Medicina Veterinária, Gramado, 1992.
- Andrews, B.S., Shadforth, M., Cunningham, P., Davis IV, J.S. Demonstration of a C1q receptor on the surface of human endothelial cells. *Journal of Immunology*, 127: 1075-1080, 1981.
- Andrin, C., Pinkoski, M.J., Burns, K., Atkinson, E.A., Krahenbuhl, O., Hudig, D., Fraser, S.A., Winkler, U., Tschopp, J., Opas, M., Bleackley, R.C., Michalak, M. Interaction between a Ca²⁺-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry*, 37: 10386-10394, 1998.
- Baksh, S., Michalak, M. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 21458-21465, 1991.
- Barriga, O. A review on vaccination against protozoa and arthropods of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 55:29-55, 1994.
- Becker, K.D., O'Donnell, P.T., Heitz, J.M., Vito, M., Bernstein, S.I. Analysis of *Drosophila* paramyosin: identification of a novel isoform which is restricted to a subset of adult muscles. *Journal of Cell Biology*, 116: 669-681, 1992.
- Billingsley, P.F. Vector-parasite interactions for vaccine development. *International Journal for Parasitology*, 24: 53-58, 1994.
- Bowman, A.S., Coons, L.B., Needham, G.R., Sauer, J.R. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. *Medical and Veterinary Entomology*, 11: 277-85, 1997.
- Brossard, M., Monneron, J. P., Papatheodorou, V. Progressive sensitization of circulating basophils against *Ixodes ricinus* L. antigens during repeated infestations of rabbits. *Parasite Immunology*, 4: 335-361, 1982.

- Brum, J.G.W Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei*: etiopatogenia e sazonalidade. Tese (Doutor em Ciências). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, R.J. 1988.
- Brown, S.J., Shapiro, S.Z., Askenase, P.W. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. Immunization of Guinea pigs with *Amblyomma americanum*-derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein antigen with Guinea pig anti-tick antibodies. *The Journal of Immunology*, 133: 3319-3325, 1984.
- Burns, K., Duggan, B., Atkinson, E. A., Famulski, K. S., Nemer, M., Bleackley, R. C., and Michalak, M. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature*, 367: 476-480, 1994.
- Champagne, D.E. The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. *Parasitology Today*, 10: 430-433, 1994.
- Choi, J.I., Whitten, M.M.A., Cho, M.Y., Lee, K.Y., Kim, M.S., Ratcliffe, N.A., Lee, B.L. Calreticulin enriched as an early-stage encapsulation protein in wax moth *Galleria mellonella* larvae. *Developmental and Comparative Immunology*, 26: 335-343, 2002.
- Cobon, G.S., Willadsen, P. Vaccines to prevent cattle tick infestations. *New Generation Vaccines*, 50: 901-917, 1990.
- Coppolino, M., Leung-Hagesteijn, C., Dedhar, S., and Wilkins, J. Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 23132-23138, 1995
- Coppolino, M. G., Woodside, M. J., Demaurex, N., Grinstein, S., St Arnaud, R., Dedhar, S. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature*, 386: 843-847, 1997.
- Coppolino, M., Dedhar, S. Calreticulin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30: 553-558, 1998.
- Cordovés, C.O. *Carrapato: controle e erradicação*. Alegrete: Gralha, 1996.
- Da Silva Vaz Jr, I., Logullo, C., Sorgine, M., Velloso, F.F., Rosa de Lima, M.F., Gonzales, J.C., Masuda, H., Oliveira, P.L., Masuda, A. Immunization of bovines with na aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 66: 331-341, 1998.
- De Castro, J.J., Newson, R.M. Host resistance in cattle tick control. *Parasitology Today*, 9: 13-17, 1993.

- Dedhar, S., Rennie, P. S., Shago, M., Hagesteijn, C. Y., Yang, H., Filmus, J., Hawley, R. G., Bruchofsky, N., Cheng, H., Matusik, R. J. Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature*, 367: 480-483, 1994.
- Eggleton, P., Reid, K. B., Kishore, U., Sontheimer, R. D. Clinical relevance of calreticulin in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 6: 564-571, 1997.
- Eggleton, P., Llewellyn, D. H. Pathophysiological roles of calreticulin in autoimmune disease. *Scandinavian Journal of Immunology*, 49: 466-473, 1999.
- Eggleton, P., Tenner, A.J., Reid, K.B. C1q receptors. *Clinical Experimental Immunology*, 120: 406-412, 2000.
- Elder, J.K., Kearnan, J.F., Waters, K.S., Dunwell, G.H., Emmerson, F.R., Knott, S.G., Morris, R.S. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistant cattle and pasture spelling. *Australian Veterinary Journal*, 56: 219-223, 1980.
- El Gengehi, N., El Ridi, R., Tawab, N. A., El Demellawy, M., and Mangold, B. L. A *Schistosoma mansoni* 62-kDa band is identified as an irradiated vaccine T-cell antigen and characterized as calreticulin. *Journal of Parasitology*, 86: 993-1000, 2000.
- Farias, N.A.R., Gonzales, J.C., Saibro, J.C. Antibiose e antixenose entre forrageiras e larvas de carrapato-de-boi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 21: 1313-1320, 1986.
- Flanigan, T. P., King, C. H., Lett, R. R., Nanduri, J., Mahmoud, A. A. Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *Journal of Clinical Investigation*, 83: 1010-1014, 1989.
- Ferreira, C.A.S., Termignoni, C., Masuda, A. Anti-complement activity of *Boophilus microplus* saliva. In: XXVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA BIOLOGIA MOLECULAR (SBBq), 23 a 26 de maio de 1998, Caxambu-MG. Programa e Resumos da XXIV Reunião Anual. Caxambu: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1998. p. 156.
- Fraser, S. A., Karimi, R., Michalak, M., Hudig, D. Perforin lytic activity is controlled by calreticulin. *Journal of Immunology*, 164: 4150-4155, 2000.
- Fraser, S. A., Michalak, M., Welch, W. H., and Hudig, D. Calreticulin, a component of the endoplasmic reticulum and of cytotoxic lymphocyte granules, regulates perforin-mediated lysis in the hemolytic model system. *Biochemical and Cellular Biology*, 76: 881-887, 1998.
- Frazzon, A.P., Vaz Junior, I.S., Masuda, A., Schrank, A., Vainstein, M.H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94: 117-125, 2000.

- Gobert, N. The role of microscopy in the investigation of paramyosin as a vaccine candidate against *Schistosoma japonicum*. *Parasitology Today*, 14: 115-118, 1998.
- Gomes, A. Controle do carrapato do boi: um problema para quem cria raças européias. *EMBRAPA*. Campo Grande (MS), Ago, n.31, 1998; [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD31.html>. Arquivo capturado em 02 de fevereiro de 2000.
- Gonzales, J.C. *O controle do carrapato do boi*. 2ed. Porto Alegre. Edição do Autor, 1995.
- Gough, J.M., Kemp, D.H. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. *Journal of Parasitology*, 79: 900-907, 1993.
- Gray, A. J., Park, P. W., Broekelmann, T. J., Laurent, G. J., Reeves, J. T., Stenmark, K. R., and Mecham, R. P. The mitogenic effects of the B beta chain of fibrinogen are mediated through cell surface calreticulin. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 26602-26606, 1995.
- Hajnicka, V., Kocakova, P., Slavikova, M., Slovak, M., Gasperik, J., Fuchsberger, N., Nuttall, P.A. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunology*, 23: 483-489, 2001.
- Häuserman, W., Friedel, T., Hess, E.A., Strong, M.B. A new active ingredient for a new approach to protect cattle against ticks. In: Proceedings of XIX International Congress of Entomology. Beijing, China, 1992.
- Hawn, T. R., Tom, M. Strand. Molecular cloning and expression of SmlrV1, a *Schistosoma mansoni* antigen with similarity to calnexin, calreticulin, and OvRa1. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 7692-98, 1993.
- Hawn, T.R., Strand, M. Developmentally regulated localization and phosphorylation of SmlrV1, a *Schistosoma mansoni* antigen with similarity to calnexin. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 20083-20089, 1994.
- Hinkel-Aust, S., Hinkel, P., Beinbrech, G. Four cross-bridge strands and high paramyosin content in the myosin filaments of honey bee flight muscles. *Experientia*, 46: 872-874, 1990.
- Holm, E., Wallace, M.M.H. Distribution of some anystid mites (Acari: Anystidae) in Australia and Indonesia and their role as possible predators of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 6: 77-83, 1989.
- Hooker, C. W. Brindley, P. J. Cloning of a cDNA encoding Sjlrv1, a *Schistosoma japonicum* calcium-binding protein similar to calnexin, and expression of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *Biochimica & Biophysica Acta*, 1429: 331-341, 1999.

- Horn, F., P. C. dos Santos, and C. Termignoni. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384: 68-73, 2000.
- Horn, S.C., Arteché, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. *A Hora Veterinária*, 23: 12-32, 1985.
- Huggins, M.C., Gibbs, J., Moloney, N.A.. Cloning of a *Schistosoma japonicum* gene encoding an antigen with homology to calreticulin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 71: 81-87, 1995.
- Inokuma, H, Kerlin, R.L., Kemp, D.H., Willadsen, P. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. *Veterinary Parasitology*, 47: 107-118, 1993.
- Jackson, L.A., Opdebeeck, J.P. The effect of various adjuvants on the humoral immune response os sheep and cattle to soluble and membrane midgut antigens of *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 58: 129-141, 1995.
- Jasinskas, A., Jaworski, D. C., Barbour, A. G. *Amblyomma americanum*: specific uptake of immunoglobulins into tick hemolymph during feeding. *Experimental Parasitology*, 96: 213-221, 2000.
- Jaworski, D., Simmen, F.A., Lamoreaux, W., Coons, L.B., Muller, M.T., Needham, G.R. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *Journal of Insect Physiology*, 41: 369-375, 1995.
- Jenne, D.E., Tschopp, J. Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends in Biochemical Sciences*, 17: 154-159, 1992.
- Johnston, L.A.Y., Kemp, D.H., Pearson, R.D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects os induced immunity on tick populations. *International Journal for Parasitology*, 16: 27-34, 1986.
- Jokiranta, T.S., Jokipii, L., Meri, S. Complement resistance of parasites. *Scandinavian Journal of Immunology*, 42: 9-20, 1995.
- Jorgensen, C. S., Heegaard, N. H., Holm, A., Hojrup, P., Houen, G. Polypeptide binding properties of the chaperone calreticulin. *European Journal of Biochemistry*, 267: 2945-2954, 2000.
- Kaaya, G.P., Mwangi, E.N., Ouna, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 15-20, 1996.

- Kagawa, H., Gengyo, K., McLachlan, A. D., Brenner, S., Karn, J. Paramyosin gene (unc-15) of *Caenorhabditis elegans*: molecular cloning, nucleotide sequence and models for thick filament structure. *Journal of Molecular Biology*, 207: 311-333, 1989.
- Kalinna, B. H., Mcmanus, D. P. An IgG (Fc_γ)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with schistosome paramyosin. *Parasitology*, 106: 289-296, 1993.
- Kasper, G., Brown, A., Eberl, M., Vallar, L., Kieffer, N., Berry, C., Girdwood, K., Eggleton, P., Quinnell, R., Pritchard, D. I. A calreticulin-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signalling domains of some integrins. *Parasite Immunology*, 23: 141-52, 2001.
- Kay, B.H., Kemp, D.H. Vaccines against arthropods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50: 87-96, 1994.
- Kemp, D.H., Agbede, R.I.S., Johnston, L.A.Y., Gough, J.M. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. *International Journal for Parasitology*, 16: 115-120, 1986.
- Khalife, J., Trotein, F., Schacht, A., Godin, C., Pierce, R. J., Capron, A. Cloning of the gene encoding a *Schistosoma mansoni* antigen homologous to human Ro/SS-A autoantigen. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 57: 193-202, 1993.
- Khalife, J., Liu, J. L., Pierce, R., Porchet, E., Godin, C., Capron, A. Characterization and localization of *Schistosoma mansoni* calreticulin Sm58. *Parasitology*, 108: 527-532, 1994.
- Kimaro, E.E., Opdebeeck, J.P. Tick infestations on cattle vaccinated with extracts from the eggs and the gut of *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 52: 61-70, 1994.
- Kishore, U., Sontheimer, R. D., Sastry, K. N., Zaner, K. S., Zappi, E. G., Hughes, G.R.V., Khamashta, M. A., Strong, P. Reid. K. B. M., Eggleton, P. Release of calreticulin from neutrophils may alter C1q-mediated immune functions. *Biochemical Journal*, 322: 543-550, 1997.
- Kopecky, J., Kuthejllova, M., Pechova, J. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. *Parasite Immunology*, 21: 351-56, 1999.
- Kovacs, H., Campbell, I. D., Strong, P., Johnson, S., Ward, F. J., Reid, K. B. M., Eggleton, P. Evidence that C1q binds specifically to C_H2-like immunoglobulin γ motifs present in the autoantigen calreticulin and interferes with complement activation. *Biochemistry*, 37: 17865-17874, 1998.

- Krause, K. H., Michalak, M. Calreticulin. *Cell*, 88: 439-43, 1997.
- Kubes, M., Kocakova, P., Slovak, M., Slavikova, M., Fuchsberger, N., Nuttall, P.A. Heterogeneity in the effect of different ixodid tick species on human natural killer cell activity. *Parasite Immunology*, 24: 23-28, 2002.
- Kuwabara, K., Pinsky, D.J., Schmidt, A.M., Benedict, C., Brett, J., Ogawa, S., Broekman, M.J., Marcus, A.J., Sciacca, R.R., Michalak, M., Wang, F., Pan, Y. C., Grunfeld, S., Patton, S., Malinski, T., Stern, D. M., Ryan, J. Calreticulin, an antithrombotic agent which binds to vitamin K-dependent coagulation factors, stimulates endothelial nitric oxide production, and limits thrombosis in canine coronary arteries. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 8179-8187, 1995.
- Kwon, M. S., Park, C. S., Choi, K., Ahnn, J., Kim, J. I., Eom, S. H., Kaufman, S. J., Song, W. K. Calreticulin couples calcium release and calcium influx in integrin-mediated calcium signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 11: 1433-1443, 2000.
- Kuna, P., Iyer, M., Peerschke, E.I.B., Kaplan, A.P., Reid, K.B.M., Ghebrehiwet, B. Human C1q induces eosinophil migration. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 81: 48-54, 1996.
- Laclette, J. P., Alagón, A., Willms, K., Torre-Blanco, A. Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to collagen. *Journal of Parasitology*, 76: 273-275, 1990.
- Laclette, J. P., Shoemaker, C. B., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D., Nicholson-Weller, A. Paramyosin inhibits complement C1. *Journal of Immunology*, 148: 124-128, 1992.
- Langy, S., Plichart, C., Luquiaud, P., Williams, S. A., Nicolas, L. The immunodominant *Brugia malayi* paramyosin as a marker of current infection with *Wuchereria bancrofti* adult worms. *Infection and Immunity*, 66: 2854-2858, 1998.
- Lawrie, C. H., S. E. Randolph, Nuttall, P. A. *Ixodes* ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Experimental Parasitology*, 93: 207-14, 1999.
- Law, J.H., Ribeiro, J.M.C., Wells, M.A. Biochemical insights derived from insect diversity. *Annual Review of Biochemistry*, 61: 87-111, 1992.
- Levine, R. J., Kensler, R. W., Reedy, M. C., Hofmann, W., King, H. A. Structure and paramyosin content of tarantula thick filaments. *Journal of Cell Biology*, 97, 186-195, 1983.
- Lightowlers, M.W. Vaccination against animal parasites. *Veterinary Parasitology*, 54: 177-204, 1994.

- Logullo, C., Da Silva Vaz, I., Sorgine, M.H.F., Paiva-Silva, G.O., Faria, F.S., Zingali, R.B., De Lima, M.F.R., Abreu, L., Fialho Oliveira, E., Alves, E.W., Masuda, H., Gonzales, J.C., Masuda, A., Oliveira, P.L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 116: 525-532, 1998.
- Londt, J.G.H., Whitehead, G.B. Ecological studies of larval ticks in South Africa (Acarina:Ixodidae). *Parasitology*, 65: 469-490, 1972.
- Loukas, A., Jones, M.K., King, L.T., Brindley, P.J., Mcmanus, D.P. Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. *Infection and Immunity*, 69: 3646-3651, 2001.
- Lozada, C., Levin, R.I., Huie, M., Hirschhorn, R., Naime, D., Whitlow, M., Recht, P.A., Golden, B., Cronstein, B.N. Identification of C1q as the heat-labile serum cofactor required for immune complexes to stimulate endothelial expression of the adhesion molecules E-selectin and intercellular and vascular cell adhesion molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 8378-8382, 1995.
- Lux, F.A., McCauliffe, D.P., Buttner, D.W., Lucius, R., Capra, J.D., Sontheimer, R.D., Lieu, T.S. Serological cross-reactivity between a human Ro/SS-A autoantigen (calreticulin) and the lambda Ral-1 antigen of *Onchocerca volvulus*. *Journal of Clinical Investigation*, 89: 1945-1951, 1992.
- Marcelain, K., Colombo, A., Molina, M.C., Ferreira, L., Lorca, M., Aguillón, J.C., Ferreira, A. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Tropica*, 75: 291-300, 2000.
- Maroto, M., Arredondo, J.J., San Roman, M., Marco, R., Cervera, M. Analysis of the paramyosin/miniparamyosin gene. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 4375-4382, 1995.
- Matsumoto, Y., Perry, G., Levine, R.J.C., Blanton, R., Mahmoud, A.A.F., Aikawa, M. Paramyosin and actin in schistosomal teguments. *Nature*, 333: 76-78, 1988.
- Mattson, J.G., Ljunggren, E.L., Bergstrom, K. Paramyosin from the parasitic mite *Sarcoptes scabiei*: cDNA cloning and heterologous expression. *Parasitology*, 122: 555-562, 2001.
- McKenna, R.V., Riding, G.A., Jarmey, J.M., Pearson, R.D., Willadsen, P. Vaccination of cattle against the *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. *Parasite Immunology*, 20: 325-36, 1998.
- Mcmanus, D.P., Liu, S., Song, G., Xu, Y., Wong, J.M. The vaccine efficacy of native paramyosin (Sj-97) against chinese *Schistosoma japonicum*. *International Journal for Parasitology*, 28: 1739-1742, 1998.

- Mcmanus, D.P., Wong, J.Y.M., Zhou, J., Cai, C., Zeng, Q., Smyth, D., Li, Y., Kalinna, B.H., Duke, M.J., Yi, X. Recombinant paramyosin (rec-Sj-97) tested for immunogenicity and vaccine efficacy against *Schistosoma japonicum* in mice and water buffaloes. *Vaccine*, 20: 870-878, 2002.
- Megaw, M.W.J. Virus-like particles pathogenic to salivary glands of the tick *Boophilus microplus*. *Nature*, 271: 483-484, 1978.
- Meilof, J.F., Van der, L.A., Rokeach, L.A., Hoch, S.O., Smeenk, R.J. Autoimmunity and filariasis. Autoantibodies against cytoplasmic cellular proteins in sera of patients with onchocerciasis. *Journal of Immunology*, 151: 5800-5809, 1993.
- Mery, L., Mesaeli, N., Michalak, M., Opas, D. P., Lew, D. P., Krause, K. Overexpression of calreticulin increases Ca^{2+} storage and decreases store-operated Ca^{2+} influx. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 9332-9339, 1996.
- Michalak, M., Milner, R.E., Burns, K., Opas, M. Calreticulin. *Biochemical Journal*, 285: 681-692, 1992.
- Michalak, M., Corbett, E.F., Mesaeli, N., Nakamura, K., Opas, M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochemical Journal*, 344: 281-292, 1999.
- Mulenga, A., Sugimoto, C., Onuma, M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and Infection*, 2: 1353-61, 2000.
- Nagar, S.K. On the significance of the duration of preoviposition and oviposition periods in ixodid ticks. *Acarology*, 10: 621-629, 1968.
- Nari, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Veterinary Parasitology*, 57: 153-165, 1995.
- Nolan, J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 18: 155-166, 1985.
- Nolan, J., Wilson, J.T., Green, P.E., Bird, P.E. Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Australian Veterinary Journal*, 66: 179-182, 1989.
- Norton, G.A., Sutherst, R.W., Maywald, G.F. A framework for integrating control methods against the cattle tick, *Boophilus microplus*, in Australia. *Journal of Applied Ecology*, 20: 489-505, 1983.
- Okazaki, Y., Ohno, H., Takase, K., Ochiai, T., Saito, T. Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 35751-35758, 2000.

- Oliveira, G.P., Costa, R.P., Mello, R.P., Meneguelli, C.A. Estudo ecológico da fase não parasítica do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina; Ixodidae) no Estado do Rio de Janeiro. *Arq. Univ. Fed. Rural R. Janeiro*, 4: 1-10, 1974.
- Opdebeeck, M.K., Wong, J.Y.M., Jackson, L.A., Dobson, C. Hereford cattle immunized and protected against *Boophilus microplus* with soluble and membrane-associated antigens from the midguts of ticks. *Parasite Immunology*, 10: 405-410, 1988.
- Opdebeeck, J.P., Wong, J.Y.M., Dobson, C. Hereford cattle protected against *Boophilus microplus* with antigens purified by immunoaffinity chromatography from larval and adult ticks. *Immunology*, 67: 388-393, 1989.
- Opdebeeck, J.P. Vaccines against blood-sucking arthropods. *Veterinary Parasitology*, 54: 205-222, 1994.
- Paesen, G.C., Adams, P.L., Harlos, K., Nuttall, P.A., Stuart, D.I. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Molecular Cell*, 3: 661-671, 1999.
- Pearce, E.J., James, S.L., Hieny, S., Lanar, D.E., Sheer, A. Induction of protective immunity against *Shistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 5678-5682, 1988.
- Peterson, J.R., Helenius, A. In vitro reconstitution of calreticulin-substrate interactions. *Journal of Cell Science*, 112: 2775-2784, 1999.
- Pike, S.E., Yao, L., Setsuda, J., Jones, K.D., Cherney, B., Appella, E., Sakagushi, K., Nakashi, H., Teruya-Feldstein, J., Wirth, P., Gupta, G., Tosato, G. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Journal of Experimental Medicine*, 188: 2349-2356, 1998.
- Pike, S.E., Yao, L., Setsuda, J., Jones, K.D., Cherney, B., Appella, E., Sakagushi, K., Nakashi, H., Atreya, C.D., Teruya-Feldstein, J., Wirth, P., Gupta, G., Tosato, G. Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. *Blood*, 94: 2461-2468, 1999.
- Pritchard, D.I., Brown, A., Kasper, G., McElroy, P., Loukas, A., Hewitt, C., Berry, C., Füllkrug, R., Beck, E. A hookworm allergen which strongly resembles calreticulin. *Parasite Immunology*, 21, 439-450, 1999.
- Ramos, J.D., Nge, C., Wah, L. B., Yan, C.K. cDNA cloning and expression of Blo t 11, the *Blomia tropicalis* allergen homologous to paramyosin. *International Archives of Allergy and Immunology*, 126: 286-293, 2001.

- Rand, K.N., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P., Cobon, G.S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 9657-9661, 1989.
- Renard, G., Garcia, J.F., Cardoso, F.C., Richter, M.F., Sakanari, J.A., Ozaki, L.S., Termignoni, C., Masuda, A. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1017-1026, 2000.
- Ribeiro, J.M.C. *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Experimental Parasitology*, 64: 347-353, 1987.
- Ribeiro, J.M.C. Role saliva in tick/host interactions. *Experimental and Applied Acarology*, 7: 15-20, 1989.
- Ribeiro, J.M.C. How ticks make a living. *Parasitology Today*, 11: 91-93, 1995.
- Ribeiro, J.M., Mather, T.N. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Experimental Parasitology*, 89: 213-21, 1998.
- Ribeiro, J.M.C., Weis, J.J., Telford, S.R. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Experimental Parasitology*, 70: 382-388, 1990.
- Roberts, J.A. Acquisition by the host of resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus* (CANESTRINI). *Journal of Parasitology*, 54: 657-662, 1968a.
- Roberts, J.A. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (CANESTRINI). II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest. *Journal of Parasitology*, 54: 667-673, 1968b.
- Richardson, M.A., Smith, D.R.J., Kemp, D.H., Tellam, R.L. Native and baculovirus-expressed forms of the immuno-protective protein Bm86 from *Boophilus microplus* are anchored to the cell membrane by a glycolysil-phosphatidyl inositol linkage. *Insect Molecular Biology*, 1: 139-147, 1993.
- Riding, G.A., Jarmey, J., Mckenna, R.V., Pearson, R., Cobon, G.S., Willadsen, P.A. Protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *Journal of Immunology*, 153: 5158-5166, 1994.
- Rodríguez, M., Rubiera, R., Penichet, M.L., Montesinos, R., Cremata, J., Falcon, V., Sánchez, G., Bringas, R., Cordovés, C., Valdés, M., Leonart, R., Herrera, L., De La Fuente, J. High expression of the *Boophilus microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *Journal of Biotechnology*, 33: 135-146, 1994.

- Rokeach, L.A., Zimmerman, P.A., Unnasch, T.R. Epitopes of the *Onchocerca volvulus* RAL1 antigen, a member of the calreticulin family of proteins, recognized by sera from patients with onchocerciasis. *Infection and Immunity*, 62: 3696-3704, 1994.
- Sanchez, D., Tuckova, L., Sebo, P., Michalak, M., Whelan, A., Sterzl, I., Jelinkova, L., Havrdova, E., Imramovska, M., Benes, Z., Krupickova, S., Tlaskalova-Hogenova, H. Occurrence of IgA and IgG autoantibodies to calreticulin in coeliac disease and various autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, 15: 441-449, 2000.
- Sanders, M.L., Jaworski, D.C., Sanchez, J.L., DeFraitess, R.F., Glass, G.E., Scott, A.L., Raha, S., Ritchie, B.C., Needham, G.R., Schwartz, B.S. Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59: 279-285, 1998.
- Sanders, M.L., Glass, G.E., Nadelman, R.B., Wormser, G.P., Scott, A.L., Raha, S., Ritchie, B.C., Jaworski, D.C., Schwartz, B.S. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* (Say) and are correlated with tick engorgement indices. *American Journal of Epidemiology*, 149: 777-784, 1999.
- Sauer, J.R., Essenberg, R. C., Bowman, A. S. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *Journal of Insect Physiology*, 46: 1069-1078, 2000.
- Seifert, G.W., Springell, P.H., Tatchell, R.J. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs, and adult of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*, 58: 415-430, 1968.
- Spickett, A.M. Tick ecology. *International Journal for Parasitology*, 24: 845-849, 1994.
- Solomon, K.R. Acaricide resistance in ticks. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, 27: 273-296, 1983.
- Sonenshine, D.E. *Biology of Ticks*. New York: Oxford University Press Inc., vol. 2, 1993.
- Sutherst, R.W., Jones, R.J., Schnitzerling, H.J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. *Nature*, 295: 320-321, 1982.
- Sutherst, R.W., Maywald, G.F., Kerr, J.D., Siegeman, D.A. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34: 317-27, 1983.
- Svaerke, C., Houen, G. Chaperone properties of calreticulin. *Acta Chemica Scandinavica*, 52: 942-949, 1998.

- Tatchell, R.J. Interactions between ticks and hosts. *International Journal for Parasitology*, 17: 597-606, 1987.
- Tellam, R.L., Kemp, D., Riding, G., Briscoe, S., Smith, D., Sharp, P., Irving, D., Willadsen, P. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Veterinary Parasitology*, 103: 141-156, 2002.
- Tenner, A.J. C1q receptors: regulating specific functions of phagocytic cells. *Immunobiology*, 199: 250-264, 1998.
- Trager, W. Acquired immunity to ticks. *Journal of Parasitology*, 25: 57-81, 1939.
- Tsai, L.C., Chao, P.L., Shen, H.D., Tang, R.B., Chang, T.C., Chang, Z.N., Hung, M.W., Lee, B.L., Chua, K.Y. Isolation and characterization of a novel 98-kd *Dermatophagoides farinae* mite allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102: 295-303, 1998.
- Tsuji, N., Morales, T.H., Ozols, V.V., Carmody, A.B., Chandrashekar, R. Molecular characterization of a calcium-binding protein from the filarial parasite *Dirofilaria immitis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 97: 69-79, 1998.
- Turnbull, I.F., Smith, D.R.J., Sharp, P.J., Cobon, G.S., Hynes, M.J. Expression and secretion in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger* of a cell surface glycoprotein from the cattle tick, *Boophilus microplus*, by using the fungal amdS promoter system. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2847-2852, 1990.
- Urbich, C., Fritzenwanger, M., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. Laminar shear stress upregulates the complement-inhibitory protein clusterin. A novel potent defense mechanism against complement-induced endothelial cell activation. *Circulation*, 101: 352-355, 2000.
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Mather, T.N., Ribeiro, J.M. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 18717-18723, 2000.
- Wagland, B.M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahm (*Bos indicus*) cattle. I. Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20,000 larvae. *Australian Journal for Agricultural Research*, 26: 1073-1080, 1975.
- Wagland, B.M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animals. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 401-409, 1978.
- Waladde, S.M., Rice, M.J. The sensory basis of tick feeding behavior. In: Obenchain, F.D., Galun, R. (Eds.) *Physiology of ticks*. New York, Pergamon Press. 1982.

- Wang, H., Nuttal, P.A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology*, 109: 525-530, 1994.
- Wang, H., Nuttal, P.A. Immunoglobulin-G binding proteins in the ixodid ticks, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* and *Ixodes hexagonus*. *Parasitology*, 111: 161-165, 1995.
- Wang, H., Paesen, G.C., Nuttall, P.A., Barbour, A.G. Male ticks help their mates to feed. *Nature*, 391: 753-754, 1998.
- Wang, H., Nuttall, P.A. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cell and Molecular Life Sciences*, 56: 286-295, 1999.
- Wang, H., Hails, R.S., Cui, W.W., Nuttall, P.A. Feeding aggregation of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Ixodidae): benefits and costs in the contest with host responses. *Parasitology*, 123, 447-453, 2001.
- Waterston, R.H., Fishpool, R.M., Brenner, S. Mutants affecting paramyosin in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*, 117: 679-697, 1977.
- Wikel, S.K. The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. *American journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31: 284-288, 1981.
- Wikel, S.K. Host immunity to ticks. *Annual Review of Entomology*, 41: 1-22, 1996.
- Wikel, S. K. Modulation of the host immune system by ectoparasitic arthropods. *BioScience*, 49: 311-320, 1999.
- Wikel, S.K., Allen, J.R. Acquired resistance to ticks. I. Passive transfer of resistance. *Immunology*, 30: 311-316, 1976a.
- Wikel, S.K., Allen, J.R. Acquired resistance to ticks. II. Effects of cyclophosphamide on resistance. *Immunology*, 30: 479-484, 1976b.
- Wikel, S.K., Allen, J.R. Acquired resistance to ticks. III. Cobra venom factor and the resistance response. *Immunology*, 32: 457-465, 1977.
- Wikel, S.K., Ramachandra, R.N., Bergman, D.K. Tick-induced modulation of the host immune response. *International Journal for Parasitology*, 24: 59-66, 1994.
- Willadsen, P. Immunological approaches to the control of ticks. *International Journal for Parasitology*, 17: 671-677, 1987.
- Willadsen, P., Kemp, D.H. Vaccination with "concealed" antigens for tick control. *Parasitology Today*, 4: 196-198, 1988.

- Willadsen, P., Mckenna, R.V., Riding, G.A. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *International Journal for Parasitology*, 18: 183-189, 1988.
- Willadsen, P., Riding, G.A., Mckenna, R.V., Kemp, D.H., Tellam, R.L., Nielsen, J.N., Lahnstein, J., Cobon, G.S., Gough, J.M. Immunologic control of a parasitic arthropod identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *The Journal of Immunology*, 143: 1346-1351, 1989.
- Willadsen, P., Mckenna, R.V. Vaccination with "concealed" antigens: myth or reality? *Parasite Immunology*, 13: 605-616, 1991.
- Willadsen, P., Kemp, D.H., Cobon, G.S., Wright, I.G. Successful vaccination against *Boophilus microplus* and *Babesia bovis* using recombinant antigens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87: 289-294, 1992.
- Willadsen, P., Riding, G.A., Jarmey, J., Atkins, A. The nucleotidase of *Boophilus microplus* and its relationship to enzymes from the rat and *Escherichia coli*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23: 291-295, 1993.
- Willadsen, P., Cobon, G., Mckenna, R.V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunology* 18: 241-246, 1996.
- Wilson, M.R., Easterbrook-Smith, S.B. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends in Biochemical Science*, 25: 95-98, 2000.
- Würzner, R. Evasion of pathogens by avoiding recognition or eradication by complement, in part via molecular mimicry. *Molecular Immunology*, 36: 249-260, 1999.
- Zhioua, E., Browning, M., Johnson, P.W., Ginsberg, H.S., Lebrun, R.A. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal for Parasitology*, 83: 815-818, 1997.
- Zhu, Q., Zelinka, P., White, T., Tanzer, M. L. Calreticulin-integrin bidirectional signaling complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 232: 354-358, 1997.

ANEXO 1 – ARTIGO 3

Artigo publicado no periódico *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, volume 32, páginas 747-754, no ano de 2002.

“Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase”

Mônica Fernandes Rosa de Lima ^{a,b}; Carlos Alexandre Sanchez Ferreira ^{a,b};
Daniela Reis Joaquim de Freitas ^a; Jesus G. Valenzuela^d; Aoi Masuda ^{a,c}.

^aCentro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, ^bDepartamento de Bioquímica and ^cDepartamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C. P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil and ^dLaboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Building 4, Room 126, 4 Center Drive MSC-0425, 20892-0425, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA.

