

## ANÁLISE DA ANTIGENICIDADE DE CONSTITUINTES DA SALIVA DE *Boophilus microplus*

SONGELÍ M. FREIRE<sup>2</sup>, GÚBIO S. CAMPOS<sup>2</sup>, DENISE CARVALHO<sup>2</sup>, IVANA  
L. O. NASCIMENTO<sup>2</sup>, ROBERT SCHAER<sup>2</sup> e ROBERTO MEYER<sup>2</sup>

**ABSTRACT.** - Freire S.M., Campos G.S., Carvalho D., Nascimento I.L.O., Schaer R. & Meyer R. 1991. [Analysis of the antigenicity of constituents of *Boophilus microplus*' saliva.] Análise da antigenicidade dos constituintes da saliva de *Boophilus microplus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 11(3/4):45-47. Lab. Imunologia e Biologia Molecular, Inst. Ciências da Saúde, Univ. Fed. da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Campus Universitário do Canela, Salvador, Bahia 40140, Brazil.

The macromolecules present in the *Boophilus microplus* saliva were separated by Electrophoresis on Polyacrylamide Gels and transferred to nitrocellulose paper. Some aspects were studied in both situations. Using Coomassie Brilliant Blue 250R to stain the proteins in the gel, 6 and 11 bands were detected on nondenaturing and denaturing systems respectively. Three glycoprotein and one lipoprotein bands were detected when Beta-mercaptoethanol was used (denaturing system). In this situation, three antigenic bands were observed in nitrocellulose paper after immunoenzymatic procedure when infested bovine or hyperimmune rabbit or mouse sera were used. All of these were glycoproteins.

**INDEX TERMS:** *Boophilus microplus*, ticks, saliva antigenicity.

**SINOPSE.** - A saliva (pool) de *Boophilus microplus* foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida e logo a seguir procedida a transferência para papel de nitrocelulose, a fim de que a antigenicidade pudesse ser observada. A eletroforese revelou a existência de seis bandas quando em condições de não desnaturação e 11 bandas em condições desnaturantes. Neste último caso, três bandas eram glicoproteínas e uma lipoproteína. A revelação imunoenzimática no papel de nitrocelulose evidenciou três bandas quando se usaram soros de bovinos infestados por esse ixodídeo ou soro de coelhos e camundongos imunizados com a citada saliva.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** *Boophilus microplus*, ixodídeos, antigenicidade da saliva.

### INTRODUÇÃO

Várias tentativas de imunização contra o carrapato *Boophilus microplus* são descritas na literatura (Aires Berne 1982, Binnington & Kemp 1980, Johnston et al. 1986, Labarthe 1981), em alguns casos, utilizando-se a saliva ou extratos de glândulas salivares (Binnington 1978, Labarthe 1981). Entretanto, não existe relato de estudos sobre a antigenicidade ou o efeito imunoprotetor de frações da saliva.

Estudos sobre os constituintes da saliva de algumas espécies de ixodídeos são encontrados na literatura. Al-

guns aspectos da caracterização física, química e biológica têm sido descritos, tais como o número de frações obtidas em eletroforese em gel de poliacrilamida (Tatchell & Binnington 1971), a existência de moléculas farmacologicamente ativas (Tatchell & Binnington 1971, Dickinson et al. 1976, Binnington & Kemp 1980), a atividade enzimática (Geczy et al. 1971, Schleger & Lincoln 1976, Binnington 1978, Willadsen & Riding 1979), o estudo da passagem de componentes provenientes do bovino para o intestino de carrapatos durante sua alimentação em bovinos (Tracey-Patte 1987) e a caracterização de antígenos de glândulas salivares de *Amblyomma americanum*, revelando uma proteína de peso molecular de 20 Kd (Brown et al. 1984).

O presente estudo traz uma análise da natureza química dos constituintes da saliva de *B. microplus*, associada a antigenicidade de tais macromoléculas observada através de eletroforese em gel de poliacrilamida ("PAGE") e de ensaio imunoenzimático após transferência eletroforética ("Western Blotting").

### MATERIAL E MÉTODOS

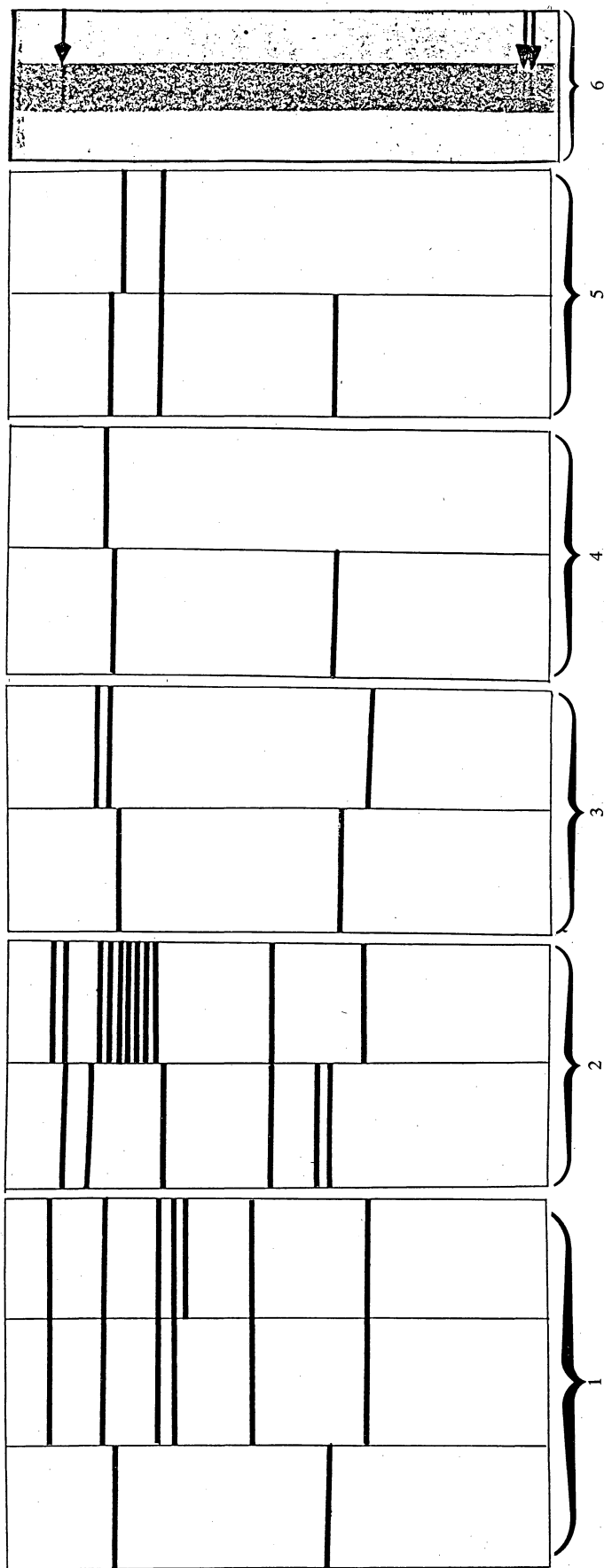
**Saliva de *Boophilus microplus*.** Extraída segundo a técnica sugerida por Tatchell (1967), através da utilização de uma solução a 5% de cloridrato de pilocarpina (Merck, Brasil) em salina 0,15M, como estimulante da salivação.

**Soros.** Foram utilizados para o estudo da antigenicidade, soros de bovinos infestados por *Boophilus microplus*

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 5 de maio de 1989.

Trabalho realizado com apoio da Financiadora de Estudos e Projetos (Finep).

<sup>2</sup> Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Campus do Canela, 40140 Salvador, Bahia.



(análise individual ou de um "pool") e soros de coelhos e camundongos hiperimunizados com a saliva deste ixodídeo.

**Eletroforese em gel de poliacrilamida.** Foram feitas eletroforeses "slab gel" descontínuas 10% e 5% em condições desnaturante e não desnaturante, segundo as técnicas de Andrews (1986).

**Padrões de Peso Molecular.** Utilizados como marcadores 1) MW-SDS-70L (SDS molecular weight markers in a discontinuous buffer-for molecular weight range 14200 to 66000) composto de Alpha-Lactalbumin (bovine milk), Trypsin Inhibitor (soybean), Trypsinogen (bovine pancreas), Carbonic Anhydrase (bovine erythrocytes), Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (rabbit muscle), Albumin Egg (ovalbumin) and Albumin (bovine) Stock No. SDS-7 Sigma Chemical Company. 2) Low Molecular Weight Markers for MW range 92400 to 13800, gentilmente cedido pelo Ludwig Institute for Cancer Research São Paulo Branch, composto de Phosphorilase B, Albumin (bovine), Albumin (egg), Myoglobulin and Cytochrome C.

**Transferência eletroforética.** Realizada para papel de nitrocelulose, segundo técnica descrita por Andrews (1986).

**Caracterização química com cromógenos.** Testou-se a presença de glicoproteínas pela técnica de P.A.S (Andrews 1986), de lipoproteínas pelo Sudan Black (Williams & Chase 1968); de protease e aminopeptidase (Pearse 1969); fosfodiesterase, esterase inespecífica (Williams & Chase 1968) e de fosfatase (Pearse 1969).

Fig. 1. Representação esquemática do resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante descontínuo a 10 e 5%. 1ª coluna: Padrões de P.M. de 66 Kd e 14 Kd no gel corado pelo Coomassie Brilliant Blue R-250; 2ª coluna: amostra de saliva no gel corado pelo Coomassie Brilliant Blue R-250; 3ª coluna: gel com amostra de saliva impregnada pela prata.

Fig. 2. Representação esquemática do resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante descontínuo a 10 e 5%. 1ª coluna: Padrões de P.M. de 92, 68, 45, 32, 18 e 14 Kd; 2ª coluna: Amostra de saliva no gel corado pelo Coomassie Brilliant Blue R-250.

Fig. 3. Representação esquemática do resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e descontínuo 10 a 5%, com coloração diferencial. 1ª coluna: Padrões 66 e 14 Kd no gel corado pelo Coomassie Brilliant Blue; 2ª coluna: Amostra de saliva no gel revelado pelo P.A.S.

Fig. 4. Representação esquemática do resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e descontínuo a 10 e 5%, com coloração diferencial. 1ª coluna: Padrões de 66 e 14 Kd no gel corado pelo Coomassie Brilliant Blue R-250; 2ª coluna: Amostra de saliva no gel corado pelo Sudan Black B.

Fig. 5. Representação esquemática do resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e descontínuo a 10 e 5%. 1ª coluna: Padrões de P.M. de 66, 45 e 14 Kd gel corado pelo Coomassie Brilliant Blue; 2ª coluna: Amostra de saliva revelada enzimaticamente para esterase inespecífica.

Fig. 6. Fotografia do resultado do "western blot" em papel de nitrocelulose de amostra de saliva a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e descontínuo a 10 e 5% quando revelado com soro de bovino infestado.

## RESULTADOS

A eletroforese em gel de poliacrilamida de não desnaturação evidenciou 6 bandas quando o gel foi corado pelo Coomassie Blue R-250 e 7 bandas quando foi corado pela prata (Fig.1).

O mesmo procedimento em condições de desnaturação apresentou 11 bandas quando utilizado o primeiro corante mencionado (Fig.2). Como pode ser observado, em condições de desnaturação as bandas se localizaram nas seguintes faixas de P.M.: uma maior que 92 Kd, uma com aproximadamente 92 Kd, sete entre 45 e 68 Kd, uma com aproximadamente 32 Kd e uma menor que 14 Kd. A corrida sem SDS, evidenciou uma banda acima de 66 Kd, uma banda abaixo de 14 Kd e as demais entre os dois limites.

A coloração com o P.A.S mostrou três bandas, duas delas com P.M. acima de 66 Kd e uma abaixo de 14 Kd (Fig.3).

A técnica do Sudan Black evidenciou uma banda com P.M. maior que 66 Kd (Fig.4).

As reações para a detecção de atividade enzimática se mostraram negativas para aminopeptidases (leucilaminopeptidase), protease, fosfatase alcalina, enquanto que a atividade de esterase inespecífica foi detectada nas faixas de 45 e 66 Kd (Fig.5).

O teste imunoenzimático após transferência para papel de nitrocelulose a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e descontínuo a 10 e 5%, quando revelado com soro de bovino infestado, resultou no aparecimento de três bandas, uma de P.M. maior que 66 Kd e duas menores que 14 Kd (Fig.6).

## DISCUSSÃO

A análise dos resultados apresentados acima mostra que na saliva de *Boophilus microplus* existem pelo menos sete componentes protéicos, dentre os quais dois apresentam atividade de esterase, três são proteínas conjugadas a glicídios e pelo menos um deles é uma lipoproteína. As bandas reveladas pelo P.A.S. e pelo Sudan Black são também reveladas pelo Coomassie ou pela Prata. A antigenicidade foi verificada em três bandas, sendo que uma delas com P.M. maior que 66 Kd e as outras com P.M. menor que 14 Kd. Tais bandas foram também reveladas pelo P.A.S., o que sugere sua natureza glicoprotéica.

Os resultados aqui apresentados são concordantes com os de Tatchell & Binnington (1971) no que se refere ao número de bandas encontradas em "PAGE", entretanto, são discordantes no que tange à natureza de tais moléculas, uma vez que para este autor quatro seriam protéicas e apenas duas glicídicas. Quanto à atividade enzimática, apesar de existirem relatos de atividade esterásica e de

aminopeptidase, através da abordagem utilizada, apenas a ação de esterase foi verificada. Entretanto, tendo em vista a possibilidade da perda de atividade pelo tratamento dado às amostras testadas, outros ensaios estão sendo realizados com eletroforese cruzada em agarose (dados não publicados).

A identificação das frações antigênicas, até o momento, ainda não tinha sido relatada de modo sistemático; tal identificação tem permitido a continuidade dos experimentos, os quais buscam agora elucidar a imunogenicidade destas frações.

## REFERÊNCIAS

- Aires Berne M.E. 1982. Resposta imunológica humoral de bovinos ao extrato de larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini 1887). Tese, Univ. Fed. R.G.S., Porto Alegre.
- Andrews A.J. 1986. In Electrophoresis - Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications. 2nd ed. Monographs on Physical Biochemistry, Oxford Science Publications.
- Binnington K.C. 1978. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. Int. J. Parasitol. 8:97-115.
- Binnington K.C. & Kemp D.H. 1980. Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. Adv. Parasitol. 18:315-333.
- Brown S., Shapiro S.Z. & Askenase R.M. 1984. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. J. Immunol. 133: 3319-3325.
- Dickinson R.G., O'Hagan J.E., Schotz M. & Binnington K.C. 1976. Prostaglandin in the saliva of the cattle tick, *Boophilus microplus*. AJEBAK 54 (5):475-486.
- Geczy A.F., Naughton M.A., Clegg J.B. & Hewetson R.N. 1971. Esterases and a carbohydrate - splitting enzyme in the saliva of the cattle tick, *Boophilus microplus*. J. Parasitol. 57(2): 437-438.
- Johnston L.A.Y., Kemp D.H. & Pearson, R.D. 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. Int. J. Parasitol. 16(1):21-34.
- Labarthe N.V. 1981. A resposta imunológica de bovinos contra a saliva de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Dissertação (M.S.), Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre.
- Pearse A.G.E. 1969. Histochemistry - theoretical and applied, vol. 1. 3rd ed. E.J. & A. Churchill, London.
- Schleger A. V., Lincoln D. T., McKenna R. V. & Kemp D. M. 1976. *Boophilus microplus*: Cellular responses to larval attachment and their relationship to host resistance. Aust. J. Biol. Sci. 29: 499-512.
- Tatchell R.J. 1967. A modified method for obtaining oral secretion. J. Parasitol. 53(5) 1106-1107.
- Tatchell R.J. & Binnington K.C. 1971. An active constituent of the saliva of the cattle tick, *Boophilus microplus*. Proc. 3rd. Int. Congr. Acarology, p. 745-748.
- Tracey-Patte P.D., Kemp D.H. & Johnston L.A.Y. 1987. *Boophilus microplus*: Passage of bovine Ig and albumins across the gut of cattle ticks feeding on normal or vaccinated cattle. Res. Vet. Sci. 43:287-290.
- Willadsen P. & Riding, 1979. A characterization of a proteolytic enzyme inhibition with allergenic activity. Bioch. J. 177:41-47.
- Willadsen P. 1980. Immunity to ticks. Adv. Parasitol. 18:293-309.
- Williams, A.C. & Chase, M.W. 1968. Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol.III. Academic Press, New York.