

Revista da

Biologia

Volume 6b

Julho 2011



**Especial
Parasitologia**



USP

Expediente

Editor Ejecutivo

Wellington B. C. Delitti

Coordenadores

Agustín Camacho Guerrero

Pedro Ribeiro

Rodrigo Pavão

Editora científica

Beatriz Stolf

Consultores científicos

Carlos Winter

Carolina Scarpellini

Danilo Ciccone Miguel

Diego de Carvalho

Eduardo Tamura

Émerson Martins

Felipe Martins

Ilton Santos

João Marcelo P. Alves

João Paulo Peixoto

Leonardo Velasquez

Leopoldo Barletta

Luciana Nogueira

Rodrigo Medeiros de Souza

Thaís Duarte Bifano

Editores gráficos

Juliana Roscito

Leonardo M. Borges

Nematoídes entomopatogênicos: as duas faces de uma simbiose

Entomopathogenic nematodes: two sides of a symbiosis

Daniela Peres Almenara^{1,2}, Maira Rodrigues de Camargo Neves¹, Fernando Luiz Kamitani¹ e Carlos E. Winter¹

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP

Resumo. Nematóides entomopatogênicos são aqueles capazes de matar insetos. Essa propriedade inseticida é decorrente de um tipo bastante peculiar de simbiose estabelecida entre o verme e uma bactéria, sendo este último organismo o responsável pela morte do inseto em si. Além de oferecer dados interessantes para a compreensão biológica dos mecanismos envolvidos na manutenção de uma simbiose, os nematóides entomopatogênicos representam uma ferramenta potencial para controle de insetos-pragas da agricultura e até mesmo de aracnídeos, como carrapatos. Adicionalmente, o estudo de bactérias entomopatogênicas vem permitindo a identificação de diferentes compostos bioativos de origem microbiana.

Palavras-chave. *Entomopatogênico; nematóide; simbiose; Photorhabdus; Heterorhabditis.*

Abstract. Entomopathogenic nematodes are those capable of killing insects. This insecticide property is due to a rather peculiar kind of symbiosis established between the worm and bacteria, the latter being the main responsible for the death of the insect. Besides offering interesting data to understand the biological mechanisms involved in symbiosis, the entomopathogenic nematodes represent a potential tool to control insect pests in agriculture and even arachnids like ticks. Additionally, the study of entomopathogenic bacteria is leading to the identification of different bioactive compounds of microbial origin.

Keywords. *Entomopathogenic; nematode; simbiose; Photorhabdus; Heterorhabditis*

² Contato do autor:

almenara@usp.br

Recebido 19out10

Aceito 10mar11

Publicado

Nematoídes Entomopatogênicos (NEPs)

Tradicionalmente, organismos parasitas são definidos como aqueles que vivem em associação com outro organismo (hospedeiro) do qual retiram meios para sua sobrevivência e reprodução, normalmente causando danos à saúde da espécie parasitada. É esta a definição encontrada, por exemplo, nos livros didáticos e nos dicionários. Parasitar, portanto, seria a simbiose (associação biológica) na qual um organismo vive junto de outro para tirar proveito, explorar. Por essa razão o termo é empregado não somente em Biologia, mas também pejorativamente, na língua portuguesa, para classificar as pessoas que não trabalham e vivem às custas de outras.

Uma idéia bastante difundida é a de que um parasita eficiente seria aquele que causa pouco dano ao hospedeiro, numa forma de “preservar” seu ambiente de vida pelo máximo de tempo possível (Ebert & Herre, 1996). No entanto, estudos mais recentes questionam essa afirmação ao demonstrar uma crescente complexidade dentro deste hábito de vida (ver a excelente discussão de Maynard-Smith, 1998). Uma questão fundamental no estudo da interação parasita-hospedeiro é a reconstrução da história deste tipo de associação ou, em termos mais biológicos, desta simbiose. É importante reunir dados na tentativa de definir

se os parasitas e seus hospedeiros estão coevoluindo, ou seja, sofrendo alterações selecionadas em ambos os organismos durante toda a sua história evolutiva (a mudança de um acarreta mudanças no outro, e vice-versa) ou, alternativamente, se as características observadas hoje são frutos de uma mudança exclusiva em uma das espécies, promovida por uma pressão seletiva decorrente da própria simbiose ou de outro fator ambiental. Neste segundo cenário, a evolução das espécies pode até estar relacionada de forma que as espécies se encontrem coadaptadas, mas não está atrelada a mecanismos de coevolução. Nem sempre espécies coadaptadas coevoluiram, pois poderiam estar evoluindo independentemente e só depois estabelecer a simbiose, como discutido por Ridley (2006).

Uma simbiose bastante distinta diz respeito ao hábito de vida e reprodução dos chamados nematoídes entomopatogênicos (NEPs), pertencentes a dois gêneros diferentes, *Heterorhabditis* e *Steinernema*. O termo entomopatogênico pode ser definido como capacidade de matar ou causar patogenicidade em insetos e é aplicado amplamente em biologia para os organismos que liberam toxinas e outras substâncias com atividade inseticida. Entre as espécies entomopatogênicas mais estudadas encontram-se os fungos que secretam substâncias ativas contra diferentes ordens de inseto e alguns aracnídeos (Ortiz-Urquiza e cols., 2010;

Campos e cols., 2010; Toledo e cols., 2010). Embora os fungos sejam mais estudados e aplicados como fonte natural de inseticidas, Nematoides Entomopatogênicos são os que melhor mostram a complexidade deste hábito de vida. Estes nematoides apresentam, durante seu ciclo de vida (Figura 1), uma forma larval de resistência conhecida

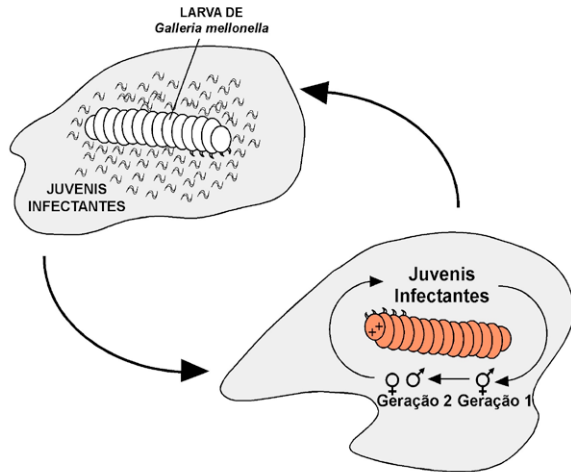


Figura 1. Ciclo de vida de nematoides do gênero *Heterorhabditis* como Juvenil Infectante (JI), encontrada livre no solo. Este JI possui duas cutículas superpostas e seus orifícios naturais (boca e ânus) encontram-se fechados, de forma a evitar dessecação e conferir maior tempo de sobrevivência. Dentro de seu tubo digestivo, os JIs carregam uma monocultura de bactérias (Figura 2A). Estas bactérias pertencem a uma única espécie (uma para cada espécie de nematoide) e permanecem com crescimento e metabolismo controlado dentro do intestino do JI, até que este encontre um inseto para infectar. Os JIs infectam este inseto adulto ou larva, penetrando em orifícios como boca, ânus ou espiráculos ou ainda perfurando regiões menos resistentes do exoesqueleto. Algumas espécies de NEPs possuem um dente córneo na região anterior do corpo que facilita a penetração (Figura 2B). Uma vez no hemoceloma (principal cavidade do corpo do inseto), os JIs liberam as bactérias neles contidas, iniciando uma infecção. Essas bactérias rapidamente matam o inseto (normalmente entre 24 e 48 horas -Ciche & Ensign, 2003). As bactérias são, de fato, as responsáveis pela morte do inseto: quando inoculadas artificialmente, são necessárias menos de 10 células para atingir a dose letal para 50% dos insetos ($LD_{50} < 10$) (Milstead, 1979). Além disso, nematoides livres de suas bactérias simbiotas são muitíssimas vezes menos eficientes para ocasionar a morte do seu hospedeiro (Han e Ehlers, 2000).

Assim que são liberadas no inseto, as bactérias colonizam seus tecidos mas mantêm o tubo digestivo dos mesmos intacto, de modo a evitar a contaminação por outras bactérias ali presentes. Esses nematoides alimentam-se dos nutrientes liberados na digestão dos tecidos do inseto e também das próprias bactérias que proliferam no cadáver do inseto. De maneira semelhante ao que ocorre com fungos entomopatogênicos, os nematoides e suas bactérias são capazes de infectar diferentes ordens de insetos. Em condições de laboratório esses nematoides são capazes

de infectar artrópodes de outras ordens, como carrapatos (Monteiro e cols., 2010).

Heterorhabditis e *Photorhabdus*

Heterorhabditis é o gênero de nematoides entomopatogênicos mais frequentemente encontrado no Hemisfério Sul. Este gênero é o único da família Heterorhabditidae. São nematoides da ordem Rhabditida, a mesma que inclui o organismo-modelo *Caenorhabditis elegans*, primeiro animal a ter seu genoma sequenciado (TCESC, 1998).

O ciclo de vida de espécies de *Heterorhabditis* ocorre dentro do cadáver do inseto infectado. Após a entrada no inseto, o JI se desenvolve em uma fêmea hermafrodita, capaz de se autofertilizar. Esta fêmea retém os ovos no interior de seu corpo até que eles eclodam e as larvas rompem os tecidos e a cutícula da mãe, matando-a, um fenômeno conhecido como Endotoquia Matricida. Livres no interior do cadáver do inseto, os juvenis de segunda geração, recém-liberados se alimentam e se desenvolvem em fêmeas e machos. Estes adultos se reproduzem e esse ciclo envolvendo fêmeas e machos se repete até que se esgotem os nutrientes do inseto infectado (Poinar Jr, 1990). Quando isso ocorre, juvenis do estágio 1 (J1), sem recursos para a reprodução de novas gerações, passam por um estágio J2 modificado que levará esses indivíduos a um estágio equivalente ao J3, o estágio JI. Os nematoides desse estágio retêm sempre um inóculo de bactéria em seu intestino, e são liberados para o meio externo, onde permanecem até nova infecção.

Trabalhos recentes com *Heterorhabditis* indicam que a transmissão de bactérias para as formas juvenis ocorre a partir das bactérias do intestino das fêmeas hermafroditas. As bactérias atravessam as células intestinais do corpo da fêmea e ficam disponíveis para os juvenis recém-eclodidos. Desse modo, pode-se dizer que o fenômeno da endotoquia matricida é responsável por garantir que somente as bactérias simbiotas sejam transferidas para a prole (Ciche e cols, 2008). Nas gerações seguintes, a proliferação exclusiva da bactéria simbiota é controlada pela secreção de toxinas e metabólitos secundários.

As bactérias simbiotas de *Heterorhabditis* pertencem ao gênero *Photorhabdus*. É um gênero que compreende bactérias móveis, gram negativas, geralmente bioluminescentes, pertencentes à família Enterobacteriaceae, subdivisão γ das Proteobacteria (Fischer-Le Saux e cols., 1999). Esta família de bactérias engloba uma série de espécies de importância médica e veterinária, incluindo os

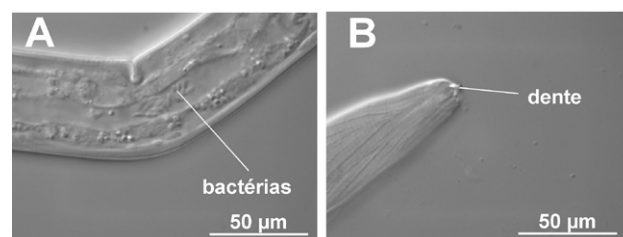


Figura 1. Fotomicrografia de contraste de interferência (Nomarski) de Juvenis Infectantes de *Heterorhabditis indica* (LPP1). (A) *Photorhabdus* sp. retida no interior do intestino. (B) Região anterior com destaque para o dente córneo.

patógenos humanos *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Yersinia* spp. O gênero *Photorhabdus* é o único que possui espécies bioluminescentes terrestres, embora esta característica não seja obrigatória. Espécies de *Photorhabdus* podem ser mantidas em laboratório, dissociadas do nematoide entomopatogênico. Quando estas bactérias entram na fase estacionária da sua curva de crescimento, elas secretam ativamente diversos produtos para o meio de cultura, incluindo lipases, fosfolipases, proteases e antibióticos (Forst e cols., 1997). Estes produtos são, provavelmente, os mesmos secretados na hemolinfa dos insetos.

Na natureza, as estratégias utilizadas pelos JIs para infectar insetos não são padronizadas. JIs de *Heterorhabditis* apresentam comportamento do tipo “cruiser”, pois vagam pela água intersticial do solo até encontrar um inseto. Já em JIs de espécies do gênero *Steinernema* é comum o comportamento de emboscada, quando o JI se posiciona de forma a interceptar um inseto que se movimenta próximo. Já no laboratório, a maioria dos estudos envolvendo *Heterorhabditis* e *Photorhabdus* utilizam o lepidóptero (ordem que inclui borboletas e mariposas) *Galleria mellonella* como inseto a ser infectado. A dose que mata 50% das larvas de *Galleria* (DL_{50}) é de cinco unidades formadoras de colônias de *Photorhabdus* (5 UFC). Há uma forte correlação entre a taxa de crescimento bacteriano e o tempo decorrido para a morte das larvas de lepidópteros (Clarke, 2008). Estes dados sugerem fortemente que os produtos do metabolismo bacteriano liberados no inseto têm o papel de matar e digerir os tecidos dos insetos, além de prevenir a infecção por fungos e outras bactérias oportunistas.

Heterorhabditis bacteriophora e sua bactéria simbiote *Photorhabdus luminescens* são as espécies entomopatogênicas mais estudadas. No Brasil, algumas linhagens de nematoides entomopatogênicos de duas outras espécies, *Heterorhabditis baujardi* e *Heterorhabditis indica* (Dolinski e cols., 2008), já foram isoladas e são mantidas em laboratório, juntamente com as linhagens de bactérias simbiotes correspondentes. Esses isolados foram obtidos a partir de JIs presentes em amostras de solo da cidade de Monte Negro, no estado de Rondônia

Nematoides entomopatogênicos e controle biológico

A propriedade dos nematoides entomopatogênicos de infectar diferentes ordens de insetos despertou grande interesse da comunidade científica para uma possível aplicação no controle biológico de pragas, principalmente aquelas cujo estágio larval ocorre no solo.

De fato, em países do hemisfério norte, a utilização de nematoides entomopatogênicos para controle de pragas agrícolas remonta ao final do século XIX (Ehler, 1990). Atualmente, existem empresas especializadas na produção em massa de NEPs e de formulações prontas para a aplicação. Um dos estudos mais recentes envolvendo a aplicação de NEPs no campo diz respeito ao controle de uma larva de mariposa que ataca culturas de amêndoas. A espécie de nematoide empregada é *Steinernema carpocapsae*, abundante na América do Norte e a eficiência obtida foi bas-

tante significativa, atingindo até 78% de morte para larvas e pupas (Chambers e cols., 2010). Também recentemente, verificou-se sucesso no emprego de NEPs para o controle de um besouro praga de palmeiras (Dembilio e cols., 2010) e outro que ataca culturas de cerejas e maçãs (Pereault e cols., 2009). Fatores como a redução do emprego de pesticidas são importantes argumentos a favor do emprego de NEPs em controle biológico. No entanto, o alto custo de produção e aplicação restringe esse uso a culturas de alto valor comercial como algumas frutas (Gaugler, 2002).

Embora a utilização de NEPs tenha baixo potencial de impacto ecológico quando comparado, por exemplo, a inseticidas químicos, é de fundamental importância que a espécie de nematoide utilizada seja compatível com a cadeia ecológica presente no solo, evitando riscos de desequilíbrio na flora natural do ambiente. Além disso, todos os possíveis impactos negativos encontram-se limitados à área tratada, uma vez que a mobilidade dos JIs é baixa e a continuidade do ciclo reprodutivo depende da presença do inseto. Diante dessas considerações, a identificação e caracterização de espécies nativas são de grande importância para o emprego de NEPs em controle biológico.

A primeira descrição de uma espécie entomopatogênica brasileira foi feita por Pereira em 1937 e, até recentemente, esta era a única espécie descrita. Em 2006, Andaló e colaboradores descreveram *Heterorhabditis amazonensis*, e em 2008, Dolinski e colaboradores identificaram os isolados de *H. baujardi* e *H. indica*, todos eles na região Amazônica. Este trabalho despertou a atenção para o uso de NEPs para controle biológico em território nacional.

No Brasil, uma das iniciativas de sucesso foi o emprego de juvenis infectantes de *H. indica* no controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), uma praga de milho (Garcia e cols., 2008). Análises conduzidas no campo mostram que esta espécie de NEP encontrada no Brasil produz resultados semelhantes àqueles decorrentes do controle utilizando *Steinernema*, embora no caso de *Heterorhabditis* as quantidades de JIs aplicadas sejam maiores. Também já foram conduzidos experimentos com *Heterorhabditis* spp. para o controle do “bicho da goiaba” (*Conotrachelus psidii*), uma larva de besouro responsável por grande prejuízo econômico na produção dessa fruta (Dolinski e cols., 2006).

Para fins de aplicação, os NEPs podem ser produzidos em grandes quantidades tanto *in vivo* quanto *in vitro*. No caso das infecções *in vivo*, o inseto mais utilizado é *Galleria mellonella*, que apresenta um rendimento de $0,5 \times 10^5 - 4 \times 10^5$ JIs por larva infectada, dependendo da espécie de nematoide (Grewal e cols., 2001). Existem diferentes técnicas para cultivo *in vitro*, muitas delas ainda em fase de aperfeiçoamento. A cultura em meio sólido, proposta por Bedding em 1984 permite rendimento em torno de 10^6 JIs por grama de meio, enquanto as técnicas empregando meio líquido e fermentadores podem resultar em aproximadamente 500 JIs/ml (Isláz-Lopez e cols., 2005). Formulações contendo NEPs podem ser aplicadas com os pulverizadores tradicionais, utilizados na aplicação rotineira de defensivos agrícolas.

Photorhabdus e compostos bioativos

Estudos com diferentes sistemas de interação bactéria-hospedeiro levaram à descrição de diversos mecanismos e vias responsáveis pela manutenção dessa relação e à descoberta de várias moléculas envolvidas em patogenicidade, virulência e controle da resposta imune do inseto. O gênero de bactéria entomopatogênica *Photorhabdus* está se destacando como modelo para estudos de relações bactéria-hospedeiro (Clarke, 2008).

O genoma de *Photorhabdus luminescens* da linhagem TT01 (aproximadamente $5,6 \times 10^6$ pares de bases) já foi completamente sequenciado. Ele contém 4389 genes para proteínas, que codificam um número muito grande de toxinas, maior que o de outras bactérias patogênicas descritas. Muitas destas toxinas são secretadas, responsáveis provavelmente pela morte do inseto parasitado (Duchaud e cols., 2003). Também, graças à análise do genoma, foi detectada a presença de 22 *loci* genéticos que contêm genes codificadores para policetídeo sintases (PKSs), peptídeo sintases não-ribossômicas (NRPSs) e quimeras dessas duas enzimas, que, em outras bactérias, já foram caracterizadas como componentes de vias de síntese moléculas com atividade antibiótica (McDaniel e cols., 1999; Fischbach e Walsh, 2006). No total, 6% do genoma parecem estar envolvidos na biossíntese de pequenas moléculas bioativas, derivadas do metabolismo dessas enzimas. Esses dados são bastante significativos; o gênero *Streptomyces*, uma fonte clássica de moléculas antibióticas, por exemplo, tem apenas 3% do genoma relacionado à síntese desse tipo de metabólito. (Clarke, 2008). Muitos produtos bioativos explorados comercialmente são derivados da atividade de enzimas do tipo PKS ou NRPS (Bumpus e Kelleher, 2008). Também já foram realizados os sequenciamentos dos genomas de *P. asymbiotica* (Wilkinson e cols, 2009) e *P. temperata*, estando os últimos resultados em fase de finalização e análise. *P. asymbiotica* é a única espécie desse gênero de bactérias associada a casos de infecções oportunistas em humanos (Gerrard e cols., 2006).

As primeiras toxinas de *Photorhabdus* caracterizadas (toxinas Tc e Mcf) são exemplos de proteínas envolvidas no controle da resposta imunológica do inseto infectado, através da indução de apoptose nas células do sistema imune. Essa propriedade tóxica também foi verificada em células de mamíferos (Waterfield e cols., 2001; Daborn e cols., 2002; Au e cols., 2004; Dowling e cols., 2004, Waterfield e cols., 2005). Os trabalhos de Brugirard-Ricaud e cols. (2004a, 2004b) caracterizaram a proteína efetora LopT, capaz de impedir processos fagocíticos fundamentais para o estabelecimento de uma resposta imunológica completa por parte do inseto hospedeiro. Além disso, bactérias do gênero *Photorhabdus* produzem compostos que inibem a enzima fosfolipase A2 do inseto infectado. Esta enzima está envolvida na biossíntese de eicosanóides reguladores da resposta imunológica celular (Kim e cols., 2005; Stanley, 2006).

Dentre os metabólitos secundários previstos nas análises genômicas, apenas 3 foram caracterizados até o momento. Primeiramente, Derzelle e colaboradores (2002) identificaram e caracterizaram um grupo de genes

envolvidos na biossíntese de um antibiótico b-lactâmico do grupo dos carbapenenos (carbapenens), comumente empregados contra bacilos gram-negativos, cocos gram-positivos e microorganismos anaeróbios (Bradley e cols., 1999).

Também foi demonstrada a biossíntese de um pigmento do tipo antraquinona (Brachmann e cols., 2007). É o primeiro exemplo de biossíntese de antraquinonas por bactérias gram-negativas. A função desse pigmento em *P. luminescens* ainda não é conhecida, mas sabe-se que a molécula apresenta uma atividade antibiótica fraca.

O terceiro *locus* analisado está relacionado à biossíntese de estilbenos e encontra-se presente em diversas linhagens diferentes de *Photorhabdus* (Joyce e cols., 2008). Estilbenos são moléculas sintetizadas normalmente por plantas, com efeitos biológicos variados, tais como: antibióticos (Willians e cols., 2005), antiinflamatórios (Kim e cols., 2008), antitumorais (Surh, 2003; Cao e cols., 2008), e neuroprotetores (Orhan e cols., 2008). Entre os estilbenos mais conhecidos está o resveratrol, encontrado na casca da uva. Esta molécula apresenta efeitos bastante benéficos para a saúde humana e sua possível biossíntese por bactérias representaria um importante resultado dos pontos de vista biotecnológico e farmacêutico (Katsuyama e cols., 2008). A atividade nematocida de estilbenos já foi demonstrada. O trabalho de Hu e colaboradores (1999) descreveu a purificação, a partir de culturas de *Photorhabdus luminescens*, do 3,5-dihidroxi-4-isopropil-estilbeno e mostrou sua atividade contra nematoides de diferentes espécies, incluindo a espécie modelo *Caenorhabditis elegans*. Outros estilbenos já se mostraram ativos contra o nematoide *Bursaphelenchus xylophilus*, causador de patologia para espécies de árvores do gênero *Pinus* e relacionado a importantes perdas econômicas para a indústria de madeira de reflorestamento (Kohnno e cols., 2007). Também já foi identificada, em *P. luminescens* TT01, uma via relacionada à biossíntese de um estilbeno com atividade antibiótica (Willians e cols., 2005).

A caracterização de metabólitos secundários na linhagem MN7, isolada no Brasil, ainda está em fase de realização. Purificações preliminares indicam a presença de um estilbeno, cuja atividade biológica está sendo testada pelo nosso grupo, no laboratório de Biologia Molecular de Nematoides (<http://www.icb.usp.br/~cewinter/>) em colaboração com o Laboratório de Química de Produtos Naturais (<http://www2.iq.usp.br/docente/majokato/>) do Instituto de Química, ambos da Universidade de São Paulo.

Como mostramos nesta revisão, os nematoides entomopatogênicos que inicialmente foram utilizados para controle de pragas, tornaram-se modelos biológicos bastante interessantes. O estudo aprofundado desta simbiose particular permitiu desvendar mecanismos que vão da imunologia de invertebrados à fisiologia de bactérias e interação patógeno-hospedeiro (Eleftherianos e cols., 2010). Os desdobramentos dos resultados resumidos nesta curta revisão permitem prever a utilização futura dos nematoides entomopatogênicos como modelos para estudos em outros campos do conhecimento biológico.

Bibliografia

- Andaló, V.; Nguyen, K.B.; Alcides, M. (2006). *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematology*, 8, 853-867.
- Au, C.; Dean, P.; Reynolds, S.E.; French-Constant, R. H. (2004). Effect of the insect pathogenic bacterium *Photorhabdus* on insect phagocytes. *Cellular Microbiology*, 6, 89-95.
- Brachmann, A.O.; Joyce, S.A.; Jenke-Kodama, H.; Schwär, G.; Clarke, D.J.; Bode, H.B. (2007). A type II Polyketide Synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *Chemical Biochemistry*, 14, 1721-1728.
- Bradley, J.S.; Garau, J.; Bode, H.; Rolston, K.V.; Wilson, S.E.; Quinn, P.J. (1999). Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11, 93-100.
- Brugirard-Ricaud, K.; Duchaud, E.; Givaudan, A.; Girard, P.A.; Kunst, F.; Boemare, N.; Brehélin, M.; Zumbihl, R. (2004a). Site-specific antiphagocytic function of the *Photorhabdus luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cellular Microbiology*, 7, 363-371.
- Brugirard-Ricaud, K.; Givaudan, A.; Parkhill, J.; Boemare, N.; Kunst, F.; Zumbihl, R.; Duchaud, E. (2004b). Variation in the effectors of the type III secretion system among *Photorhabdus* species as revealed by genomic analysis. *Journal of Bacteriology*, 186, 4376-4381.
- Bumpus, S.B.; Kelleher, N.L. (2008). Accessing natural product biosynthetic processes by mass spectrometry. *Current Opinion Chemical Biology*, 12, 475-482.
- Campos, R.A.; Boldo, J.T.; Pimentel, I.C.; Dalfovo, V.; Araújo, W.L.; Azevedo, J.L.; Vainstein, M.H.; Barros, N.M. (2010). Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genetic and Molecular Research*, 9, 1421-1430.
- Cao, T.M.; Durrante, D.; Tripathi, A.; Liu, J.; Tsai, S.; Kellog, G.E.; Simoni, D.; Lee, R.M. (2008). Stilbene derivatives that are colchicine site microtubule inhibitors have antileukemic activity and minimal systemic toxicity. *American Journal of Hematology*, 83, 390-397.
- Chambers, U.; Bruck, D.J.; Olsen, J.; Walton, V.M. (2010). Control of overwintering filbertworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae with *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Economic Entomology*, 103, 416-422.
- Clarke, D.J. (2008). *Photorhabdus* : a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cellular Microbiology*, 10, 2159-2167.
- Ciche, T.A.; Kim, K.S.; Kaufmann-Daszczuk, B.; Nguyen, K.C.Q.; Hall, D.H. (2008). Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Applied Environmental Microbiology*, 74, 2275-2287.
- Ciche, T.A. ; Ensign, J.C. (2003). For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1890-1897.
- Daborn, P.J.; Waterfield, N.; Silva, C.P.; Au, C.P.; Sharma, S.; French-Constant, R.H. (2002). A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf) allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *PNAS*, 99, 10742-10747.
- Dembilio, O.; Llácer, E.; Martínez de Altube Mdel, M.; Jacas, J.A. (2010). Field efficacy of imidacloprid and *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) in *Phoenix canariensis*. *Pest Management Science*, 66, 365-370.
- Derzelle, S.; Duchaud, E.; Kunst, F.; Danchin, A.; Bertin, P. (2002). Identification, characterization and regulation of a cluster of genes involved in carbapenem biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 3780-3789.
- Dolinski, C.; Del Valle, E.; Stuart, R.J. (2006). Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control*, 36, 422-427.
- Dolinski, C., Kamitani, F.L., Machado, I.R. and Winter, C.E. (2008) Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil - Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 103, 150-159.
- Dowling, A.J.; Daborn, P.J.; Waterfield, N.R.; Wang, P.; Streuli, C.H.; French-Constant, R.H. (2004). The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy (Mcf) promotes apoptosis in mammalian cells. *Cellular Microbiology*, 6, 345-353.
- Duchaud, E.; Rusniok, C.; Frangeul, L.; Buchrieser, C.; Givaudan, A.; Taourit, S.; Bocs, S.; Boursaux-Eude, C.; Chandler, M. Charles, J-F.; Dassa, E.; Derose, R.; Derzell, S.; Freyssinet, G.; Guadriault, S.; Médigue, C.; Lanois, A.; Powell, K.; Siguier, P.; Vincent, R.; Wingate, V.; Zouine, M.; Glaser, P.; Boemare, N.; Danchin, A.; Kunst, F. (2003). The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature Biotechnology*, 2, 1307-1313.
- Ebert, D.; Herre, E.A. (1996). The Evolution of parasite diseases. *Parasitology Today*, 12, 96- 101.
- Ehler, L.E. (1990). Some contemporary issues in biological control of insects and their relevance to the use of entomopathogenic nematodes. In: Gaugler, R.; Kaya, H.K. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1-19.
- Eleftherianos, I.; French-Constant, R.H.; Clarke, D.J.; Dowling, A.J.; Reynolds, S.E. (2010) Dissecting the immune response to the entomopathogen *Photorhabdus*. *Trends in Microbiology*, 18, 552-560.
- Fischbach, M.A.; Walsh, C.T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery and mechanisms. *Chemical Reviews*, 106, 3468-3496.
- Fisher-Le Saux, M.; Viillard, V.; Brunel, B.; Normand, P.; Boemare, N.E. (1999). Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov.; *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov., *P. asymbiotica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49, 1645-1656.
- Forst, S.; Dowds, B.; Boemare, N.; Stackenbrandt, E. (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual Review of Microbiology*, 51, 47-72.
- Garcia, L.C.; Raetano, C.G.; Leite, L.G. (2008). Tecnologia de aplicação para os nematóides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) para controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. *Neotropical Entomology*, 37, 305-311.
- Gaugler, R. (2002). *Entomopathogenic Nematology*. New York, NY, USA: CABI Publishing, 402p.
- Gerrard, J.G.; Joyce, S.A.; Clarke, D.J.; French-Constant, R. H.; Nimmo, G.R.; Looke, D.F.M.; Pearce, L.; Waterfield, N.R. (2006). Nematode symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*.

- Emerging Infectious Diseases. 12, 1562-1564.
- Grewal, P.S.; De Nardo, E.A.B.; Aguilera, M.M. (2001). Entomopathogenic Nematodes: potential for exploration and use in South America. *Neotropical Entomology*. 30, 191-205.
- Han, R.C.; Ehlers, R.U. (2000). Pathogenicity, development and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. *Journal of Invertebrate Pathology*. 75, 55-58.
- Hu, K.; Li, J.; Webster, J.M. (1999). Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology*. 1, 457-469.
- Islas-López, M-A.; Sanjuan-Galindo, R.; Rodríguez-Hernández, A-L.; Chavarría-Hernández, N. (2005). Monoxenic production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using culture media containing agave juice (aguamiel) from Mexican maguey-pulguero (*Agave* spp.). Effects of the contents of nitrogen, carbohydrates and fat on infective juvenile production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68, 91-97.
- Joyce, S.A.; Brachmann, A.O.; Glazer, I.; Lango, I.; Schwär, G.; Clarke, D.J.; Bode, H. (2008). Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. *Angewandte Chemie*. 47, 1942-1945.
- Katsuyama, Y.; Funai, N.; Horinouch, S. (2008). Precursor-directed biosynthesis of stilbene methyl esters in *Escherichia coli*. *Biochemistry Journal*. 10, 1286-1293.
- Kohno, T.; Togashi, K.; Fukamiya, N. (2007). The nematicidal activity and the structure-activity relationships of stilbenes. *Natural Products Research*. 21, 606-615.
- Kim, Y.H.; Kwon, H-S.; Kim, D. H.; Cho, H.J.; Lee, H.S.; Jun, J-G.; Park, J.H.Y.; Kim, J-K. (2008). Piceatannol, a stilbene present in grapes, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *International Immunopharmacology*. 12, 1695-1702.
- Kim, Y.; Ji, D.; Cho, S.; Park, Y. (2005). Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* share an inhibitory action against phospholipase A2 to induce host immunodepression. *Journal of Invertebrate Pathology*. 89, 258-264.
- McDaniel, R.; Thamchaipenet, A.; Gustafsson, C.; Fu, H.; Betlach, Me.; Betlach, Ma. ; Ashley, G. (1999). Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products. *PNAS*. 96, 1846-1851.
- Maynard-Smith, J. (1998) *Evolutionary Genetics* – 2ª. edição - Oxford University Press, UK. 285-297.
- Milstead, J.E. (1979). *Heterorhabditis bacteriophora* as a vector for introducing its associated bacterium into the hemocoel of *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 33:324-327.
- Monteiro, C.M.; Prata. M.C.; Furlong, J.; Faza. A.P.; Mendes, A.S.; Andaló, V.; Moino-Junior, A. (2010). *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 106, 821-826.
- Orhan, I.; Tosun, F.; Sener, B. (2008). Coumarin, anthraquinone and stilbene derivatives with anticholinesterase activity. *Z Naturforsch.* 63, 366-370.
- Ortiz-Urquiza, A.; Riveiro-Miranda, L.; Santiago-Álvarez, C.; Quesada-Moraga, E. (2010). Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*. No prelo.
- Pereault, R.J.; Whalon, M.E.; Alston, D.G. (2009). Field efficacy of entomopathogenic fungi and nematodes targeting caged last-instar plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) in Michigan cherry and apple orchards. *Environmental Entomology*, 38, 1126-1134.
- Pereira, C. (1927). *Rhabditis hambletoni* n.sp. nema aparentemente semiparasito da broca do algodoeiro (*Gasterocercodes brasiliensis*). *Archivos do Instituto Biologico*. 8, 215-230.
- Poinar Jr, G.O. (1990). Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R.; Kaya, H.K. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, FL, USA, 23-60.
- Ridley, M. (2006) *Evolução* – 3ª. Edição – Artmed. 633-662.
- Stanley, D. (2006). Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annual Reviews Entomology*. 51, 25-44.
- Surh, J-Y. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*. 3, 768-780.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. 282, 2012-2018.
- Toledo, A.V.; de Remes Lenicov, A.M. ; Lopez-Lastra, C.C. (2010). Histopathology caused by the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, in the adult planthopper, *Peregrinus maidis*, a maize virus vector. *Journal of Insect Science*, 10:35.
- Waterfield, N.R.; Bowen, D.J.; Fetherston, J.D.; French-Constant, R.H. (2001). The *tc* genes of *Photorhabdus*: a growing family. *Trends in Microbiology*. 9, 185-191.
- Waterfield, N. R.; Hares, M.; Yang, G.; Dowling, A.; French-Constant, R.H. (2005). Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. *Cellular Microbiology*. 7, 373-382.
- Wilkinson, P.; Waterfield, N.R.; Crossman, L.; Corton, C.; Sanchez-Contreras, M.; Vlisidou, I.; Barron, A.; Bignell, A.; Clark, L.; Ormond, D.; Mayho, M.; Bason, N.; Smith, F.; Simmonds, M.; Churcher, C.; Harris, D.; Thompson, N. R.; Quail, M.; Parkhill, J.; French-Constant, R.H. (2009). *BMC Genomics*. 10, 1-22.
- Willians, J.S.; Thomas, M.; Clarke, D.J. (2005). The gene *stIA* encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Photorhabdus luminescens* TT01. *Microbiology*. 151, 2543-2550.

Aspectos gerais da biologia do genoma, transcriptoma e proteoma de *Eimeria* spp. de galinha doméstica

General aspects of the biology, genome, transcriptome and proteome of *Eimeria* spp. of domestic fowl

Jeniffer Novaes¹; Alessandra Popov dos Santos Manha¹; Laureana Stelmastchuk Benassi Fontolan¹; Alda Maria Backx Noronha Madeira^{1,2}

¹ Laboratório de Biologia Molecular de Coccídiás, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

Resumo. Sete espécies de *Eimeria* spp. causam a coccidiose aviária, doença entérica responsável por grandes perdas econômicas e que é controlada pelo uso de drogas anticoccidianas e/ou vacinas vivas. Com o intuito de fazer uma breve revisão sobre estes parasitas, este artigo aborda aspectos gerais da biologia, do genoma, transcriptoma e proteoma de *Eimeria* spp. que acometem a galinha doméstica.

Palavras-chave. Coccidiose aviária, *Eimeria* spp., expressão gênica, expressed sequence tags (ESTs).

Abstract. Seven species of *Eimeria* spp. cause avian coccidiosis, an enteric disease responsible for high economic losses which is controlled by anticoccidial drugs and/or live vaccines. With the purpose to set up a brief review on these parasites, general aspects of the biology, genome, transcriptome and proteome of *Eimeria* spp. of domestic fowl were discussed in this article.

Keywords. Coccidiosis, *Eimeria* spp., gene expression, expressed sequence tags (ESTs).

² Contato do autor:

albackx@usp.br

Recebido 30set10

Aceito 03mar11

Publicado

Eimeria spp. e a coccidiose aviária

Parasitas do gênero *Eimeria* são protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa, o qual compreende diversas espécies de grande importância médica e veterinária, como os gêneros *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e *Neospora* (Roos, 2005; Striepen e col., 2002). Os parasitas do gênero *Eimeria* podem ser encontrados em diversos hospedeiros, incluindo invertebrados e vertebrados, como aves e mamíferos.

Em galinha doméstica, a *Eimeria* é responsável pela coccidiose aviária, doença de distribuição mundial que acomete principalmente frangos de corte e matrizes reprodutoras (Williams, 1998). Esta parasitose pode ser causada por sete espécies de *Eimeria*: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. praecox* e *E. mitis* (Allen e Fetterer, 2002; Fernando, 1990).

Apesar da grande variedade de drogas anticoccidianas e vacinas utilizadas para a prevenção (Chapman e col., 2002; McDonald e Shirley, 2009; Williams, 2002a; Williams, 2002b), a coccidiose ainda causa grande prejuízo à indústria avícola (Allen e Fetterer, 2002). Calcula-se que os gastos mundiais com o controle desta doença variem de 800 milhões (Allen e Fetterer, 2002) a 3 bilhões de dólares por ano (Shirley e col., 2004a).

Devido ao aumento da resistência parasitária, das

crescentes restrições legais ao uso de aditivos em rações animais e ao custo elevado das vacinas vivas, são crescentes os estudos para a produção de novas vacinas (Allen e Fetterer, 2002; Brake, 2002; Chapman e col., 2002; Williams, 2002a; Williams, 2002b), bem como de novas estratégias para o controle desta doença (Jenkins, 2001).

Biologia e ciclo de vida do parasita

Os parasitas do gênero *Eimeria* apresentam um ciclo de vida monoxênico (isto é, com um único hospedeiro) que se inicia quando um hospedeiro susceptível ingere um oocisto esporulado (Current e col., 1990; McDougald e Reid, 1995) (Figura 1). O oocisto, ao ser ingerido (1) é rompido na moela por trituração mecânica, liberando os esporocistos (2). No intestino, devido à ação de sais biliares e tripsina, os esporozoítos saem ativamente do esporocisto e penetram nas células epiteliais intestinais (3). Nesta etapa há vários ciclos intestinais endógenos nos quais os parasitas se multiplicam por fissão múltipla (merogonia ou esquizogonia) resultando na formação de esquizozontes, os quais contêm centenas de merozoítos (4, 5 e 6). Em seguida, há a fase sexuada do ciclo, gamogonia ou gametogonia, onde os merozoítos diferenciam-se em macrogametócito, gamonte feminino (7) ou microgametócito, gamonte masculino (8). Após a fecundação do macrogameta pelo microgameta (9) há a formação do oocisto

(10) que é liberado no ambiente juntamente com as fezes (11). Sob condições favoráveis de temperatura, oxigênio e umidade, o oocisto sofre um processo de esporogonia ou esporulação envolvendo meiose e mitose resultando na formação do oocisto esporulado que contém quatro esporocistos com dois esporozoítos em cada (1) (Canning e Anwar, 1968; Ferguson e col., 1978a; Ferguson e col., 1978b).

As espécies de *Eimeria* são identificadas com base na dimensão, morfologia e tempo mínimo de esporulação dos oocistos, especificidade do hospedeiro (são parasitas espécie-específicos), sítios de colonização, características

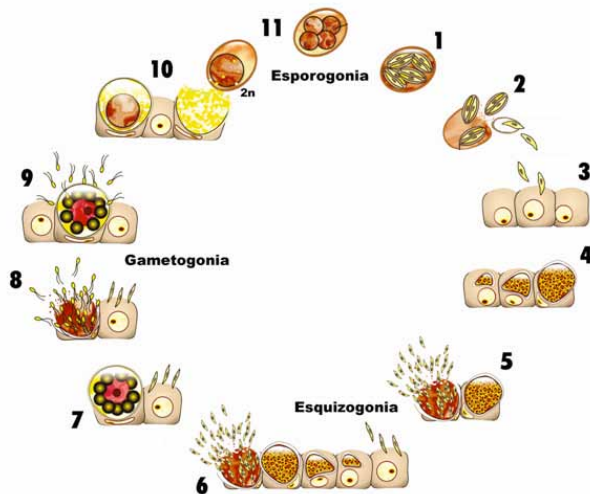


Figura 1 - Ciclo de vida de *Eimeria* spp. {Fonte - Pôster de divulgação: "Entendendo e Controlando a Coccidiose aviária", Texto: Arthur Gruber, Arte gráfica: Helton Barreiro, Patrocínio Biovet. Edição geral: Gessulli Agribusiness}.

das lesões, período pré-patente e especificidade imunológica (Long e Joyner, 1984; Long e col., 1976).

Estes parâmetros analisados de forma conjunta permitem a distinção das espécies de *Eimeria*, entretanto, nem sempre o diagnóstico é confiável; principalmente quando há infecções mistas. Desta forma, técnicas baseadas em métodos moleculares também têm sido utilizadas. Nosso grupo desenvolveu um método de diagnóstico de espécies por PCR multiplex baseado num conjunto de marcadores moleculares denominados SCARs (*Sequence-Characterized Amplified Regions*), os quais permitem a diferenciação e o diagnóstico das sete espécies simultaneamente (Fernandez e col., 2003).

Genoma

O genoma de *Eimeria* spp. possui 55 milhões de pares de bases, conteúdo GC de 53% (Ling e col., 2007; Shirley, 2000) e está organizado em 14 cromossomos, que variam de tamanho entre 1 a mais de 7 Mpb (Shirley, 1994; Shirley, 2000). O genoma de *E. tenella* cepa H foi sequenciado e está disponível no sítio do Instituto Sanger (http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella/). Além do genoma, o cromossomo 1 desta espécie foi totalmente sequenciado (Ling e col., 2007). Este cromossomo possui uma organização genômica incomum segmentada em regiões R (feature-rich), que são ricas em repetições, apresentam-

do elementos similares a transposons e repetições teloméricas (Shirley, 2000; Shirley e col., 2004b), além disso, apresenta segmentos livre de repetições P (feature-poor) (Ling e col., 2007).

Estes organismos também apresentam dois genomas extracromossômicos: o genoma mitocondrial que é constituído de segmentos de DNA lineares contendo unidades repetitivas de 6kb (Chapman e Shirley, 2003; Romano, 2004) e o genoma do apicoplasto (organela exclusiva dos organismos do Filo Apicomplexa) que é circular, rico em conteúdo AT e em *Eimeria tenella*, contém cerca de 35 kb (Cai e col., 2003).

Transcriptoma

Para um melhor entendimento da biologia deste parasita, diversos projetos de geração e análise de ESTs (Expressed sequence tags) de *Eimeria* spp. têm sido realizados (Li e col., 2003; Miska e col., 2004; Miska e col., 2008; Ng e col., 2002; Schwarz e col., 2010; Wan e col., 1999). O nosso grupo coordenado pelos professores Arthur Gruber (ICB/USP) e Alda Maria B. N. Madeira (ICB/USP) como parte integrante do Consórcio Internacional do Genoma de *E. tenella* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella/consortium.shtml), gerou um conjunto de cerca de 15.000 leituras do tipo ORESTES (*Open Reading Frame ESTs*) de *E. tenella*, *E. acervulina* e *E. maxima* (Shirley e col., 2004a; Shirley e col., 2004b). Vários estágios como esporozoítos, merozoítos de segunda geração, oocistos não esporulados, parcialmente esporulados e esporulados foram estudados. Para *E. tenella*, adicionamos aos nossos dados, cerca de 35.000 ESTs disponíveis em bancos internacionais. Além disso, com a finalidade de obter um perfil de expressão quantitativo, o nosso grupo também gerou mais de 35.000 tags (etiquetas) provenientes de bibliotecas de LongSAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) ou seja, análise seriada da expressão gênica, de dois estágios invasivos (merozoítos de segunda geração e esporozoítos) de *Eimeria tenella* (Novaes, 2009). A anotação das sequências montadas foi realizada em um *pipeline* automático de anotação que utiliza o sistema EGene (Durham e col., 2005), desenvolvido pelo nosso grupo de bioinformática.

Após a anotação automática foi observado para ambas as técnicas, que grande parte dos transcritos obtidos era desconhecida. De fato, cerca de 50 a 65% dos genes sequenciados em *Eimeria* e de outros organismos do Filo Apicomplexa ainda não possuem uma função conhecida. (Gardner e col., 2002; Miska e col., 2004; Wan e col., 1999).

A partir da análise comparativa dos genes diferencialmente expressos foi observado que para as três espécies de *Eimeria* um pequeno conjunto de genes é altamente expresso em cada fase do ciclo de vida, e que menos de 20% dos genes são compartilhados entre os estágios estudados (Novaes, 2009; Novaes e col., 2005). Em *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* a análise do perfil de transcrição em diferentes estágios evolutivos também revelou a predominância de grupos de genes diferencialmente expressos de forma estágio-específica (Bozdech e col., 2003; Cleary e col., 2002; Duncan, 2004; Li e col., 2003; Llinas e DeRisi, 2004).

Nossos estudos evidenciaram que em *Eimeria tenella*, para merozoítos, muitos dos produtos protéicos diferencialmente expressos estão relacionados à tradução, modificação e manutenção da conformação das proteínas e processos de ligação. Em esporozoítos, o perfil transcricional obtido é distinto, já que muitos transcritos não são conhecidos e alguns dos produtos protéicos identificados são histonas, proteínas associadas ao transporte e atividade catalítica (Novaes, 2009).

De modo semelhante, vários trabalhos têm relatado um maior número de transcritos associados com crescimento e divisão celular e síntese de DNA em esporozoítos de *Eimeria tenella* (Ng e col., 2002; Wan e col., 1999). Já para merozoítos, há predominância de transcritos envolvidos com a expressão de genes e proteínas, tanto em *E. tenella* (Schaap e col., 2005), quanto em *E. acervulina* (Miska e col., 2008) e *E. maxima* (Schwarz e col., 2010).

Este padrão diferencial da expressão gênica em *Eimeria* spp pode estar relacionado às diferenças funcionais entre estes estágios invasivos. Enquanto os esporozoítos são responsáveis pelo início da replicação endógena do parasita sendo alvo preferencial da resposta imune protetora do hospedeiro (Lillehoj e Lillehoj, 2000), os merozoítos estão relacionados à patogênese da doença propriamente dita (Ng e col., 2002), sendo responsáveis por consideráveis danos à mucosa e submucosa intestinais (Schmatz, 1997).

Após a fase de proliferação, crítica para a patogênese, ocorre o ciclo sexual, importante para a geração da diversidade genética. Os oocistos de *Eimeria* são responsáveis pela transmissão e dispersão da doença para novos hospedeiros e são capazes de permanecer viáveis no ambiente por longos períodos de tempo (Belli e col., 2005; Schmatz, 1997).

A esporulação é um processo dinâmico e ainda pouco estudado. Sabe-se que determinados genes, como de proteínas de micronema (Ryan e col., 2000), organela presente no complexo apical de parasitas do Filo Apicomplexa e que tem grande importância no processo de adesão e invasão; EtCRK2 (Kinnaird e col., 2004); eimepsina (Jean e col., 2001); MOP (major oocyst protein) (Fetterer e Barfield, 2003; Fetterer e col., 2007); antígeno SO7 (Fetterer e col., 2007); proteína associada ao corpo refrátil dos esporozoítos (Abrahamsen e col., 1994) e proteínas de choque térmico tais como Hsp70 (del Cacho e col., 2001) e Hsp90 (Miska e col., 2005) são diferencialmente expressos durante a esporulação. Miska e colaboradores (2004) ao analisarem ESTs de oocistos esporulados e não esporulados obtidos por hibridização subtrativa também verificaram este perfil de expressão diferencial entre tais estágios.

Proteoma

Os primeiros estudos de mapeamento de proteínas foram realizados por eletroforese bi-dimensional a partir de esporozoítos das sete espécies de *Eimeria* que infectam galinhas (Sutton e col., 1989). Com o avanço dos estudos genômicos, novas proteínas puderam ser identificadas como as do micronema (Bromley e col., 2003), do corpo refrátil (de Venevelles e col., 2004; de Venevelles e col.,

2006), proteases, enzimas glicolíticas e proteínas de choque térmico (Belli e col., 2005). Recentemente Lal e colaboradores (2009) realizaram um estudo do proteoma de quatro estágios do ciclo de vida de *E. tenella*. Estes autores também observaram que em merozoítos, há uma maior abundância de proteínas relacionadas à transcrição, síntese protéica e ao ciclo celular do que em esporozoítos.

Finalmente, apesar do parasita e de seu ciclo de vida já serem conhecidos, poucos processos bioquímicos em *Eimeria* foram descritos até o momento.

Estudos do genoma, proteoma, expressão gênica, e outras abordagens como ribonoma, metaboloma, ORFeoma, interatoma, entre outros, poderão no futuro, permitir a elucidação de vários mecanismos moleculares ainda desconhecidos possibilitando desta forma, a proposição de novas estratégias de controle da coccidiose aviária.

Contribuição dos autores

Busca bibliográfica e redação do artigo: Novaes, J.; Manha, A.P.S.; Stelmastchuk, L.B.F.; Madeira, A.M.B.N.. Revisão do artigo. Madeira, A.M.B.N.

Bibliografia

- Abrahamsen, M. S., Johnson, R. R., Clark, T. G. e White, M. W. (1994). Developmental regulation of an *Eimeria bovis* mRNA encoding refractile body-associated proteins. *Mol Biochem Parasitol* 68, 25-34.
- Allen, P. C. e Fetterer, R. H. (2002). Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin Microbiol Rev* 15, 58-65.
- Belli, S. I., Walker, R. A. e Flowers, S. A. (2005). Global protein expression analysis in apicomplexan parasites: current status. *Proteomics* 5, 918-24.
- Bozdech, Z., Zhu, J., Joachimiak, M. P., Cohen, F. E., Pulliam, B. e DeRisi, J. L. (2003). Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of *Plasmodium falciparum* with a long-oligonucleotide microarray. *Genome Biol* 4, R9.
- Brake, D. A. (2002). Vaccinology for control of apicomplexan parasites: a simplified language of immune programming and its use in vaccine design. *International Journal for Parasitology* 32, 509-515.
- Bromley, E., Leeds, N., Clark, J., McGregor, E., Ward, M., Dunn, M. J. e Tomley, F. (2003). Defining the protein repertoire of microneme secretory organelles in the apicomplexan parasite *Eimeria tenella*. *Proteomics* 3, 1553-61.
- Cai, X., Fuller, A. L., McDougald, L. R. e Zhu, G. (2003). Apicoplast genome of the coccidian *Eimeria tenella*. *Gene* 321, 39-46.
- Canning, E. U. e Anwar, M. (1968). Studies on meiotic division in coccidian and malarial parasites. *J Protozool* 15, 290-8.
- Chapman, H. D., Cherry, T. E., Danforth, H. D., Richards, G., Shirley, M. W. e Williams, R. B. (2002). Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *Int J Parasitol* 32, 617-29.
- Chapman, H. D. e Shirley, M. W. (2003). The Houghton strain of *Eimeria tenella*: a review of the type strain selected for genome sequencing. *Avian Pathol* 32, 115-27.
- Cleary, M. D., Singh, U., Blader, I. J., Brewer, J. L. e Boothroyd, J. C. (2002). *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Eukaryot Cell* 1, 329-

- 40.
- Current, W. L., Upton, S. J. e Long, P. L. (1990). Taxonomy and Life Cycles. In *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*, (ed. P. L. Long), pp. 1-17. Boston: CRC Press Inc.
- de Venevelles, P., Chich, J. F., Faigle, W., Loew, D., Labbe, M., Girard-Misguich, F. e Pery, P. (2004). Towards a reference map of *Eimeria tenella* sporozoite proteins by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Int J Parasitol* 34, 1321-31.
- de Venevelles, P., Francois Chich, J., Faigle, W., Lombard, B., Loew, D., Pery, P. e Labbe, M. (2006). Study of proteins associated with the *Eimeria tenella* refractile body by a proteomic approach. *Int J Parasitol* 36, 1399-407.
- del Cacho, E., Gallego, M., Pereboom, D., Lopez-Bernad, F., Quilez, J. e Sanchez-Acedo, C. (2001). *Eimeria tenella*: hsp70 expression during sporogony. *J Parasitol* 87, 946-50.
- Duncan, R. (2004). DNA microarray analysis of protozoan parasite gene expression: outcomes correlate with mechanisms of regulation. *Trends Parasitol* 20, 211-5.
- Durham, A. M., Kashiwabara, A. Y., Matsunaga, F. T., Ahagon, P. H., Rainone, F., Varuzza, L. e Gruber, A. (2005). EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. *Bioinformatics* 21, 2812-3.
- Ferguson, D. J., Birch-Andersen, A., Hutchinson, W. M. e Siim, J. C. (1978a). Light and electron microscopy on the sporulation of the oocysts of *Eimeria brunetti*. I. Development of the zygote and formation of the sporoblasts. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 86, 1-11.
- Ferguson, D. J., Birch-Andersen, A., Hutchinson, W. M. e Siim, J. C. (1978b). Light and electron microscopy on the sporulation of the oocysts of *Eimeria brunetti*. II. Development into the sporocyst and formation of the sporozoite. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 86, 13-24.
- Fernandez, S., Pagotto, A. H., Furtado, M. M., Katsuyama, A. M., Madeira, A. M. e Gruber, A. (2003). A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. *Parasitology* 127, 317-25.
- Fernando, M. A. (1990). *Eimeria*: Infections of the Intestine. In *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*, (ed. P. L. Long), pp. 63-75. Boston: CRC Press Inc.
- Fetterer, R. H. e Barfield, R. C. (2003). Characterization of a developmentally regulated oocyst protein from *Eimeria tenella*. *J Parasitol* 89, 553-64.
- Fetterer, R. H., Jenkins, M. C., Miska, K. B. e Barfield, R. C. (2007). Characterization of the antigen SO7 during development of *Eimeria tenella*. *J Parasitol* 93, 1107-13.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S. e col. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498-511.
- Jean, L., Long, M., Young, J., Pery, P. e Tomley, F. (2001). Aspartyl proteinase genes from apicomplexan parasites: evidence for evolution of the gene structure. *Trends Parasitol* 17, 491-8.
- Jenkins, M. C. (2001). Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 101, 291-310.
- Kinnaird, J. H., Bumstead, J. M., Mann, D. J., Ryan, R., Shirley, M. W., Shiels, B. R. e Tomley, F. M. (2004). EtCRK2, a cyclin-dependent kinase gene expressed during the sexual and asexual phases of the *Eimeria tenella* life cycle. *Int J Parasitol* 34, 683-92.
- Lal, K., Bromley, E., Oakes, R., Prieto, J. H., Sanderson, S. J., Kurian, D., Hunt, L., Yates, J. R., 3rd, Wastling, J. M., Sinden, R. E. e col. (2009). Proteomic comparison of four *Eimeria tenella* life-cycle stages: unsporulated oocyst, sporulated oocyst, sporozoite and second-generation merozoite. *Proteomics* 9, 4566-76.
- Li, L., Brunk, B. P., Kissinger, J. C., Pape, D., Tang, K., Cole, R. H., Martin, J., Wylie, T., Dante, M., Fogarty, S. J. e col. (2003). Gene discovery in the apicomplexa as revealed by EST sequencing and assembly of a comparative gene database. *Genome Res* 13, 443-54.
- Lillehoj, H. S. e Lillehoj, E. P. (2000). Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Dis* 44, 408-25.
- Ling, K. H., Rajandream, M. A., Rivallier, P., Ivens, A., Yap, S. J., Madeira, A. M., Mungall, K., Billington, K., Yee, W. Y., Bankier, A. T. e col. (2007). Sequencing and analysis of chromosome 1 of *Eimeria tenella* reveals a unique segmental organization. *Genome Res* 17, 311-9.
- Llinas, M. e DeRisi, J. L. (2004). Pernicious plans revealed: *Plasmodium falciparum* genome wide expression analysis. *Curr Opin Microbiol* 7, 382-7.
- Long, P. L. e Joyner, L. P. (1984). Problems in the identification of species of *Eimeria*. *J Protozool* 31, 535-41.
- Long, P. L., Millard, B. J., Joyner, L. P. e Norton, C. C. (1976). A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet Lat* 6, 201-17.
- McDonald, V. e Shirley, M. W. (2009). Past and future: vaccination against *Eimeria*. *Parasitology* 136, 1477-89.
- McDougald, L. R. e Reid, W. M. (1995). *Coccidiosis*. In *Diseases of Poultry*, (ed. B. W. Calnek), pp. 929. Ames: Iowa State University Press.
- Miska, K. B., Fetterer, R. H. e Barfield, R. C. (2004). Analysis of transcripts expressed by *Eimeria tenella* oocysts using subtractive hybridization methods. *J Parasitol* 90, 1245-52.
- Miska, K. B., Fetterer, R. H., Min, W. e Lillehoj, H. S. (2005). Heat shock protein 90 genes of two species of poultry *Eimeria*: expression and evolutionary analysis. *J Parasitol* 91, 300-6.
- Miska, K. B., Fetterer, R. H. e Rosenberg, G. H. (2008). Analysis of transcripts from intracellular stages of *Eimeria acervulina* using expressed sequence tags. *J Parasitol* 94, 462-6.
- Ng, S. T., Sanusi Jangi, M., Shirley, M. W., Tomley, F. M. e Wan, K. L. (2002). Comparative EST analyses provide insights into gene expression in two asexual developmental stages of *Eimeria tenella*. *Exp Parasitol* 101, 168-73.
- Novaes, J. (2009). Análise da expressão diferencial entre merozoítos e esporozoítos de *Eimeria tenella* empregando a técnica de LongSAGE. In *Instituto de Ciências Biomédicas vol. Doutorado*, pp. 219. São Paulo: Universidade de São Paulo.
- Novaes, J., Kashiwabara, A. Y., Varuzza, L., Nagao, L. T., Manha, A. P. S., Fernandez, S., Durham, A. M., Gruber, A. e Madeira, A. M. B. N. (2005). Survey of *Eimeria* spp. transcripts using open reading frame ESTs (ORESTES). In *In: The IXth International Coccidiosis Conference*, pp. 150. Foz do Iguassu, Parana, Brazil.
- Romano, C. M. (2004). Caracterização molecular e análise comparativa de genomas mitocondriais de *Eimeria* spp. de galinha doméstica, pp. 138. São paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- Roos, D. S. (2005). Genetics. Themes and variations in apicomplexan parasite biology. *Science* 309, 72-3.
- Ryan, R., Shirley, M. e Tomley, F. (2000). Mapping and expression of microneme genes in *Eimeria tenella*. *Int J Parasitol* 30, 1493-9.
- Schaap, D., Arts, G., van Poppel, N. F. e Vermeulen, A. N. (2005). De novo ribosome biosynthesis is transcriptionally

- regulated in *Eimeria tenella*, dependent on its life cycle stage. *Mol Biochem Parasitol* 139, 239-48.
- Schmatz, D. M. (1997). The mannitol cycle in *Eimeria*. *Parasitology* 114 Suppl, S81-9.
- Schwarz, R. S., Fetterer, R. H., Rosenberg, G. H. e Miska, K. B. (2010) Coccidian merozoite transcriptome analysis from *Eimeria maxima* in comparison to *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina*. *J Parasitol* 96, 49-57.
- Shirley, M. W. (1994). The genome of *Eimeria tenella*: further studies on its molecular organisation. *Parasitol Res* 80, 366-73.
- Shirley, M. W. (2000). The genome of *Eimeria* spp., with special reference to *Eimeria tenella*--a coccidium from the chicken. *Int J Parasitol* 30, 485-93.
- Shirley, M. W., Blake, D., White, S. E., Sheriff, R. e Smith, A. L. (2004a). Integrating genetics and genomics to identify new leads for the control of *Eimeria* spp. *Parasitology* 128 Suppl 1, S33-42.
- Shirley, M. W., Ivens, A., Gruber, A., Madeira, A. M., Wan, K. L., Dear, P. H. e Tomley, F. M. (2004b). The *Eimeria* genome projects: a sequence of events. *Trends Parasitol* 20, 199-201.
- Striepen, B., White, M. W., Li, C., Guerini, M. N., Malik, S. B., Logsdon, J. M., Jr., Liu, C. e Abrahamsen, M. S. (2002). Genetic complementation in apicomplexan parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6304-9.
- Sutton, C. A., Shirley, M. W. e Wisner, M. H. (1989). Characterization of coccidial proteins by two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology* 99 Pt 2, 175-87.
- Wan, K. L., Chong, S. P., Ng, S. T., Shirley, M. W., Tomley, F. M. e Jangi, M. S. (1999). A survey of genes in *Eimeria tenella* merozoites by EST sequencing. *Int J Parasitol* 29, 1885-92.
- Williams, R. B. (1998). Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *Int J Parasitol* 28, 1089-98.
- Williams, R. B. (2002a). Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. *Avian Pathol* 31, 317-53.
- Williams, R. B. (2002b). Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952-2002). *Avian Dis* 46, 775-802.

Direcionando proteínas derivadas de patógenos para células responsáveis pela ativação da resposta imune

Directing pathogen-derived proteins to cells responsible for the immune response activation

Silvia Beatriz Buscardin

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP

Resumo. A obtenção de vacinas contra patógenos que afetam a saúde humana tem sido um objetivo constante nos últimos anos. Neste ensaio apresentamos uma estratégia para o desenvolvimento de vacinas que se baseia no direcionamento de uma proteína recombinante derivada de um patógeno para células responsáveis pela ativação da resposta imune conhecidas como células dendríticas. O direcionamento é conseguido através da utilização de um anticorpo quimérico produzido in vitro em fusão com a proteína de interesse e que é capaz de se ligar a um receptor presente na superfície das células dendríticas. Quando injetado em animais, o anticorpo quimérico leva o antígeno até as células dendríticas e o resultado é indução de forte resposta imunológica.

Palavras-chave. *Células dendríticas, vacinação, anticorpos quiméricos.*

Abstract. The obtention of vaccines against pathogens that affect human health has been a constant goal in the last years. In this assay we will present a strategy for the development of vaccines that is based in the targeting of a recombinant protein derived from a pathogen to cells responsible for the immune system activation known as dendritic cells. The targeting is accomplished by using a chimeric antibody produced in vitro in fusion with a protein of interest that is able to bind to a receptor present at the surface of dendritic cells. When injected into animals the chimeric antibody delivers the antigens to the dendritic cells and the result is the induction of a strong immune response.

Keywords. *Dendritic cells, vaccination, quimeric antibodies.*

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as doenças infecciosas são responsáveis por milhões de mortes por ano, especialmente em países em desenvolvimento (WHO report, 2010). Diferentes formas de prevenção ou tratamentos para muitas destas doenças são extremamente urgentes e bem vindos. Uma das formas de prevenção mais eficazes contra patógenos é a vacinação. No século XX, o desenvolvimento de várias vacinas contra agentes infecciosos impediu que milhões de pessoas padecessem de doenças como varíola, difteria, coqueluche, sarampo, poliomielite, hepatite B, entre outras. Porém, ainda existem doenças como a AIDS, tuberculose e dengue para as quais vacinas efetivas ainda não estão disponíveis. No caso de doenças causadas por parasitas, nenhuma vacina realmente efetiva existe. A falta de uma vacina efetiva torna-se ainda mais relevante no caso de doenças parasitárias causadas por protozoários, como é o caso da malária. Anualmente, parasitas do gênero *Plasmodium* são responsáveis por cerca de 300-600 milhões de casos clínicos, matando cerca de 1-3 milhões de pessoas, principalmente crianças (Guerra e col., 2008). Neste caso, o advento de uma vacina

efetiva significaria uma redução maciça tanto na mortalidade quanto na morbidade causada por esta doença.

Várias abordagens tem sido testadas na tentativa de se obter vacinas eficientes contra parasitas. Entre elas podemos citar: imunização com proteínas recombinantes derivadas de diferentes formas do parasita, imunização com vírus recombinantes contendo proteínas parasitárias, imunização com plasmídios de DNA que codificam proteínas inteiras ou diferentes porções das mesmas, entre outras. Todas estas estratégias visam a indução de uma resposta imune eficiente contra a proteína de interesse que seja efetiva no combate ao parasita. No entanto, o mecanismo de apresentação do antígeno parasitário para o sistema imune é pouco conhecido em vários casos e a geração de uma resposta imune eficiente pode estar prejudicada pelo fato de o vírus recombinante, proteína recombinante ou DNA estarem sendo apresentados por células menos especializadas em fazer uma boa apresentação de antígenos.

Neste texto, trataremos de uma estratégia ligeiramente diferente daquelas citadas acima pois o antígeno

Contato do autor:

sbboscardin@usp.br

Recebido 19out09

Aceito 05out10

Publicado 24fev11

é direcionado para células especializadas na ativação do sistema imunológico conhecidas como células dendríticas (DCs).

Características das células dendríticas

As DCs são células apresentadoras de antígenos capazes de iniciar e regular a resposta imune (Steinman e Cohn, 1973). São encontradas na maioria dos tecidos, especialmente pele, mucosas e órgãos linfóides. Além disso, são especializadas na apresentação de antígenos e possuem capacidade migratória, o que faz com que sejam capazes de capturar antígenos na periferia e levá-los até os órgãos linfóides, onde a apresentação de antígenos para células T normalmente ocorre (Steinman, 2008). Outra característica interessante das DCs é que elas possuem uma grande quantidade de receptores endocíticos. Estes receptores são capazes de endocitar seus ligantes ou mesmo anticorpos anti-receptor, ligados a antígenos de interesse. Além de receptores endocíticos, as DCs também possuem receptores que reconhecem diretamente padrões moleculares específicos presentes em vários patógenos (Zanoni e Granucci, 2010). Por exemplo, as DCs reconhecem lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede de bactérias gram-negativas, RNA dupla fita característico de alguns vírus, oligodeoxinucleotídeos CpG não metilados presentes no DNA bacteriano, entre outros. A ligação dessas moléculas faz com que as DCs sofram um processo conhecido como maturação. O processo de maturação resulta em uma série de mudanças fenotípicas que estão ligadas a uma capacidade aumentada de processar antígenos e ativar células T. Estas alterações fenotípicas incluem produção aumentada de complexos peptídeo-MHC (Inaba e col., 2000), aumento da expressão de moléculas que favorecem a ligação a células T (por ex. CD48 e CD58) e de moléculas co-estimulatórias (por ex. CD80, CD86, Inaba e col., 1994), produção de quimiocinas (Sallusto e col., 1999) e de grandes quantidades de citocinas como IL-12 (Edwards e col., 2002) e interferons do tipo I (Dalod e col., 2002).

Estratégia de direcionamento de antígenos para as DCs: estrutura e geração dos anticorpos quiméricos.

Nos últimos anos, uma estratégia que direciona antígenos para as DCs *in vivo* vem sendo desenvolvida com sucesso em modelos animais, e testes clínicos visando o desenvolvimento de uma vacina já estão sendo realizados (The Rockefeller University Newswire, 2010). Esta estratégia consiste na utilização de um anticorpo contra um receptor endocítico (denominado DEC205 ou CD205) presente na superfície de uma subpopulação de DCs em fusão com o antígeno de interesse (Bonifaz e col., 2002; Bonifaz e col., 2004; Hawiger e col., 2001; Hawiger e col., 2004).

Este anticorpo é produzido *in vitro* por transfecção transiente de células HEK293T com dois plasmídios que codificam para as sequências das cadeias leve e pesada+antígeno de interesse (Hawiger e col., 2001). Após a transfecção o anticorpo quimérico é produzido pelas células HEK293T e purificado à partir do sobrenadante das

culturas utilizando-se colunas de proteína G (a proteína G se liga a um sítio localizado na cadeia pesada do anticorpo). A figura 1 mostra um esquema dos passos envolvidos na obtenção do anticorpo quimérico.

A sequência de nucleotídeos do clone anti-DEC205 original (conhecido como NLDC 145) foi clonada, a partir de um hibridoma obtido pela imunização de ratos com estroma de linfonodos de camundongo (Kraal e col., 1986). Para evitar que a própria estrutura do anticorpo (que é de rato) gerasse uma resposta imunológica quando injetado em camundongos, as porções constantes das cadeias leve e pesada de rato foram substituídas por cadeias leve e pesada de camundongo. Do anticorpo original de rato só foram mantidas as regiões variáveis das cadeias leve e pesada, pois são elas que conferem a especificidade de ligação do anticorpo. A sequência da proteína de interesse é sempre fusionada à porção C terminal da sequência da cadeia pesada do anticorpo. Separando estas duas sequências existe uma sequência “linker” que confere certa flexibilidade à molécula e possui um sítio de clivagem de hidrolases que favorece sua degradação no fagossomo da célula dendrítica. A figura 2 mostra uma representação esquemática do anticorpo quimérico anti-DEC205.

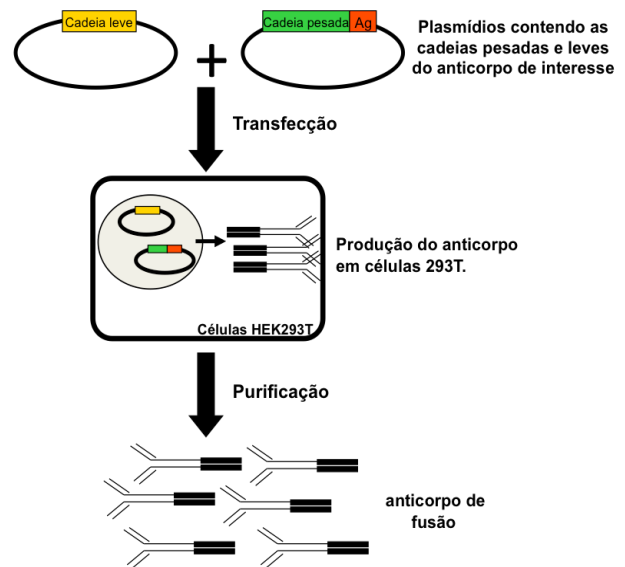


Figura 1. Produção do anticorpo anti-DEC205 em fusão com o antígeno (Ag) de interesse. O anticorpo quimérico é produzido pela cotransfecção de células HEK293T com dois plasmídios codificando as cadeias leve e pesada+antígeno de interesse. Após alguns dias em cultura, os anticorpos quiméricos são purificados do sobrenadante das culturas utilizando-se colunas de proteína G. Adaptado de Boscardin e col. (2009).

Administração de anticorpos quiméricos anti-DEC205 em fusão com diferentes proteínas de interesse.

A administração de baixas doses deste anticorpo quimérico é capaz de ativar células T antígeno-específicas e também induzir a produção de anticorpos. No entanto, esta ativação do sistema imune só ocorre quando o anticorpo quimérico anti-DEC é administrado na presença de um estímulo de maturação para as DCs. Caso contrário, o resultado é tolerância imunológica (Hawiger e col., 2001;

Hawiger e col., 2004). Entre as substâncias capazes de ativar as DCs encontramos moléculas que se ligam a receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos.

A demonstração inicial de que é possível utilizar o anticorpo anti-DEC205 acoplado a um antígeno como uma ferramenta para atingir especificamente as DCs foi descrita no início da década por pesquisadores da Rockefeller University nos Estados Unidos. Nesses estudos, o anticorpo anti-DEC foi conjugado ou fundido diretamente a antígenos modelo como a ovalbumina (OVA, Bonifaz e col., 2002) e lisozima de ovo de galinha (HEL, Hawiger e col., 2001). A administração desses anticorpos quiméricos (anti-DEC-OVA e anti-DEC-HEL) foi capaz de direcionar os antígenos à subpopulação de DCs DEC205⁺ *in vivo*. O antígeno foi então eficientemente processado e apresentado tanto a células T CD4⁺ quanto CD8⁺ transgênicas. Na ausência de inflamação, esse tipo de direcionamento de antígenos resultou na indução de tolerância periférica (medida pela deleção de células T transgênicas específicas para o antígeno utilizado (Bonifaz e col., 2002; Hawiger e col., 2001).

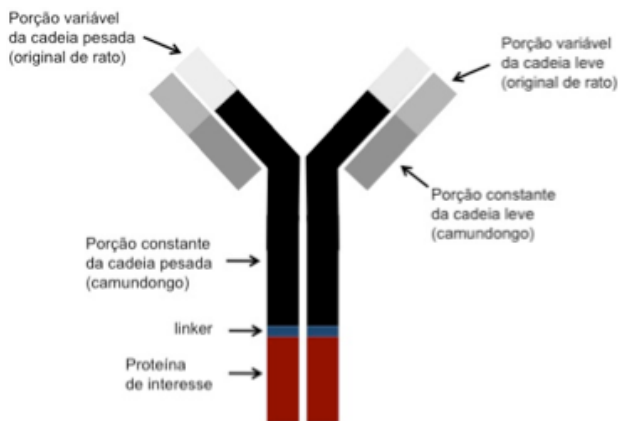


Figura 2. Representação esquemática da estrutura do anticorpo anti-DEC205 quimérico.

Entretanto, o direcionamento de antígenos na presença de um estímulo de maturação, como a administração de anticorpo agonista anti-CD40 (que neste caso faz o papel do CD40L presente na superfície dos linfócitos T), promoveu a ativação prolongada de células T CD4⁺ e CD8⁺. Além disso, a imunidade induzida pelo direcionamento do antígeno às DCs foi de longa duração e mais efetiva do que a administração de potentes adjuvantes como adjuvante completo de Freund (Bonifaz e col., 2004). Camundongos vacinados com o anticorpo anti-DEC-OVA na presença do anticorpo agonista anti-CD40 tornaram-se resistentes à infecção com um vírus vaccinia transgênico expressando OVA (Bonifaz e col., 2004). Além disso, a imunização de animais com o mesmo anticorpo promoveu a ativação de células T CD4⁺ de memória importantes para a ativação de linfócitos B antígeno específicos (Boscardin e col., 2006).

Os estudos citados acima abriram a possibilidade de se utilizar anticorpos quiméricos anti-DEC205 conjugados a antígenos clinicamente relevantes para a indução de imunidade protetora contra diferentes doenças prevalen-

tes.

Boscardin e col. (2006) utilizaram o anticorpo anti-DEC205 em fusão com a proteína circunsporozoita (CS) expressa pelas formas esporozoitais do *Plasmodium yoelii* (agente causador da malária murina). A administração de uma única dose do anticorpo quimérico anti-DEC-CS na presença de um estímulo de maturação para as DCs foi capaz de induzir células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ , em diferentes linhagens de camundongos. Além disso, indução de resposta imune humoral também foi observada após a administração de uma dose de reforço do anticorpo, na ausência de qualquer outro adjuvante. O anticorpo anti-DEC205 também já foi acoplado à proteína Gag do vírus HIV e a imunização com o anticorpo quimérico anti-DEC-Gag foi capaz de levar a indução de uma resposta imune mediada principalmente por células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ . Além disso, proteção foi observada nos animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-Gag quando estes foram desafiados com um vírus vaccinia transgênico expressando a proteína Gag (Choi e col., 2009; Trumfheller e col., 2006). A eficácia da imunização com DNA também pode ser aumentada quando se utilizou um plasmídeo codificando para o anticorpo anti-DEC205 em fusão com a proteína Gag (Nchinda e col., 2008).

É interessante ressaltar que as publicações citadas acima utilizaram concentrações relativamente baixas dos anticorpos quiméricos (5-10 mg/camundongo) e foram capazes de gerar respostas imunes tão potentes ou superiores àquelas geradas por imunizações padrão (Boscardin e col., 2006; Trumfheller e col., 2006).

Além de experimentos *in vivo* utilizando camundongos, o anticorpo anti-DEC205 humano também foi utilizado com sucesso para direcionar antígenos para as DCs. Bozzacco e col. (2007) mostraram ativação de linfócitos T CD8⁺ e produção de INF- γ quando o anticorpo anti-DEC205 humano em fusão com a proteína Gag do vírus HIV foi incubado com DCs provenientes de pacientes aids e depois incubadas com as células T destes mesmos pacientes. Gurer e col. (2008) obtiveram resultados semelhantes quando utilizaram um anticorpo anti-DEC humano em fusão com o antígeno EBNA-1 do vírus Epstein-Barr.

Os resultados pré-clínicos obtidos com o anticorpo anti-DEC-Gag foram tão promissores que testes clínicos de fase I foram iniciados no primeiro semestre de 2010 (The Rockefeller University Newswire, 2010) e tem como objetivo verificar a segurança, tolerabilidade e imunogenicidade do anticorpo anti-DEC-Gag em seres humanos.

Utilização de anticorpos quiméricos em fusão com proteínas derivadas dos patógenos *Plasmodium vivax* e *Trypanosoma cruzi*.

Nos últimos dois anos, esta tecnologia de produção de anticorpos quiméricos foi trazida ao Brasil e anticorpos fusionados a proteínas derivadas dos parasitas *Plasmodium vivax* e *Trypanosoma cruzi* estão sendo produzidos e testados em nosso país. Estes parasitas foram escolhidos porque tanto a malária quanto a doença de Chagas ainda

são doenças bastante prevalentes no Brasil e vacinas profiláticas ou terapêuticas seriam muito bem vindas.

Considerações finais

Atualmente, vários anticorpos vem sendo utilizados com sucesso no tratamento de doenças em seres humanos (como câncer, por exemplo). Geralmente a administração de anticorpos não é tóxica e é bem tolerada por seres humanos. A utilização de anticorpos monoclonais contra receptores presentes na superfície das DCs fundidos a antígenos de interesse apresenta-se como uma tecnologia nova que possui enorme potencial para ser transposta para estudos em seres humanos. O campo ainda está em sua infância, mas resultados promissores já vem sendo obtidos por diversos grupos.

Atualmente os maiores desafios estão em se encontrar adjuvantes que possam ser utilizados em conjunto com os anticorpos quiméricos para obtenção de duradoura resposta protetora e em se entender como o direcionamento dos antígenos para diferentes sub-populações de DCs afeta a geração da resposta imune. A continuidade das pesquisas nesta área poderá responder diversas perguntas e também contribuir para o desenvolvimento de novas vacinas contra patógenos prevalentes.

Agradecimentos

A autora gostaria de agradecer o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP, processo 2007/08648-9), do Instituto Nacional de Tecnologia de Vacinas (CNPq, subprojeto 15203*12) e do Banco BNP Paribas.

Contribuição dos autores

Redação do artigo: Silvia Beatriz Boscardin.

Bibliografia

- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. C. e Steinman, R. M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-38.
- Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D. I., Fujii, S., Soares, H., Brimnes, M. K., Moltedo, B., Moran, T. M. e Steinman, R. M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 199, 815-24.
- Boscardin, S. B., Hafalla, J. C., Masilamani, R. F., Kamphorst, A. O., Zebroski, H. A., Rai, U., Morrot, A., Zavala, F., Steinman, R. M., Nussenzweig, R. S. e col. (2006). Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med* 203, 599-606.
- Boscardin, S. B., Nussenzweig, M. C., Trumppheller, C. e Steinman, R. M. (2009). Vaccines based on dendritic cell biology. In *New Generation Vaccines* (fourth edition). vol. 1 (ed. M. M. Levine), pp. 327-339. New York: Informa Healthcare.
- Bozzacco, L., Trumppheller, C., Siegal, F. P., Mehandru, S., Markowitz, M., Carrington, M., Nussenzweig, M. C., Piperno, A. G. e Steinman, R. M. (2007). DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1289-94.
- Choi, J. H., Do, Y., Cheong, C., Koh, H., Boscardin, S. B., Oh, Y. S., Bozzacco, L., Trumppheller, C., Park, C. G. e Steinman, R. M. (2009). Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. *J Exp Med* 206, 497-505.
- Dalod, M., Salazar-Mather, T. P., Malmgaard, L., Lewis, C., Asselin-Paturel, C., Briere, F., Trinchieri, G. e Biron, C. A. (2002). Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* 195, 517-28.
- Edwards, A. D., Manickasingham, S. P., Sporri, R., Diebold, S. S., Schulz, O., Sher, A., Kaisho, T., Akira, S. e Reis e Sousa, C. (2002). Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J Immunol* 169, 3652-60.
- Guerra, C. A., Gikandi, P. W., Tatem, A. J., Noor, A. M., Smith, D. L., Hay, S. I. e Snow, R. W. (2008). The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS Med* 5, e38.
- Gurer, C., Strowig, T., Brilot, F., Pack, M., Trumppheller, C., Arrey, F., Park, C. G., Steinman, R. M. e Munz, C. (2008). Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses. *Blood* 112, 1231-9.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M. e Nussenzweig, M. C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-79.
- Hawiger, D., Masilamani, R. F., Bettelli, E., Kuchroo, V. K. e Nussenzweig, M. C. (2004). Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity* 20, 695-705.
- Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., Reis e Sousa, C., Germain, R. N., Mellman, I. e Steinman, R. M. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 191, 927-36.
- Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K. S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P. S., Ikehara, S. e col. (1994). The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 180, 1849-60.
- Kraal, G., Breel, M., Janse, M. e Bruin, G. (1986). Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 163, 981-97.
- Nchinda, G., Kuroiwa, J., Oks, M., Trumppheller, C., Park, C. G., Huang, Y., Hannaman, D., Schlesinger, S. J., Mizenina, O., Nussenzweig, M. C. e col. (2008). The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. *J Clin Invest* 118, 1427-36.
- Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M. e Lanzavecchia, A. (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 29, 1617-25.

- Steinman, R. M. (2008). Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity* 29, 319-24.
- Steinman, R. M. e Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-62.
- The Rockefeller University Newswire (2010). Disponível em: <http://newswire.rockefeller.edu/index.php?page=engine&id=1081> . Acesso em: 21. Fev. 2011.
- Trumpfheller, C., Finke, J. S., Lopez, C. B., Moran, T. M., Moltedo, B., Soares, H., Huang, Y., Schlesinger, S. J., Park, C. G., Nussenzweig, M. C. e col. (2006). Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med* 203, 607-17.
- WHO (World Health Organization). Disponível em: <http://www.who.int/en> . Acesso em: 17. Fev. 2011.
- Zanoni, I. e Granucci, F. (2010). Regulation of antigen uptake, migration, and lifespan of dendritic cell by Toll-like receptors. *J Mol Med* 88, 873-80.

Imunidade inata no intestino de carrapatos: hemocidinas e outros agentes antimicrobianos

Innate immunity in the tick midgut: hemocidins and other antimicrobial agents

Carlos Eduardo Cruz^{1,2}, Sirlei Daffre¹

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP

Resumo. Os carrapatos são vetores de diversos organismos patogênicos, resultando em graves problemas para a saúde humana e animal. O intestino destes artrópodes constitui a interface primária patógeno-vetor, e o controle microbiano neste órgão pode ser mediado pela atividade de peptídeos antimicrobianos derivados da digestão de hemoproteínas (hemocidinas), lisozimas e defensinas, além de inibidores de proteases e estresse oxidativo. Sendo assim, a competência vetorial dos carrapatos está diretamente relacionada ao seu sistema imune.

Palavras-chave. Carrapato, imunidade inata, hemocidinas, controle microbiano.

Abstract. Ticks are vectors of various pathogens, resulting in severe human and animal health problems. The midgut of these arthropods constitutes the primary pathogen-vector interface, and microbial control in this organ may be mediated by the activity of antimicrobial peptides derived from the digestion of heme-containing proteins (hemocidins), lysozymes and defensins, as well as protease inhibitors and oxidative stress. Thus, vector competence in ticks is directly related with their immune system.

Keywords. Tick, innate immunity, hemocidins, microbial control.

Carrapatos são artrópodes hematófagos capazes de transmitir diversos agentes patogênicos, tais como bactérias, vírus e protozoários, que podem causar doenças tais como encefalites, doença de Lyme, babesiose, teileriose e febre maculosa (Bowman and Nuttall, 2008). No Hemisfério Sul, o carrapato de boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o principal ectoparasita de bovinos. O impacto econômico deste parasitismo é da ordem de dezenas de bilhões de dólares anuais e é uma das principais causas da baixa produtividade na bovinocultura mundial (Jonsson, 2006; Jonsson *et al.*, 2008).

Durante a alimentação sanguínea, os carrapatos adquirem agentes patogênicos presentes no sangue do hospedeiro vertebrado, tais como os protozoários intraeritrocíticos dos gêneros *Anaplasma* e *Babesia*, e podem se tornar vetores eficientes de tais agentes (Bock *et al.*, 2008; Kocan *et al.*, 2010). Desta forma, o intestino destes artrópodes é a interface primária da interação patógeno-vetor.

A habilidade dos patógenos de sobreviver no lumen intestinal, penetrar e se multiplicar no epitélio intestinal, antes de alcançar a hemocele (cavidade corporal) e invadir outros órgãos (como glândulas salivares e ovários), é essencial para a sua sobrevivência e determinação da capacidade vetorial (de la Fuente *et al.*, 2007). Sendo assim, o intestino de carrapatos deve apresentar mecanismos de

defesa inata eficientes, capazes de controlar o desenvolvimento e multiplicação de tais agentes patogênicos (Taylor, 2006; Sonenshine and Hynes, 2008), mas preservando a microbiota intestinal, como acontece em *Drosophila melanogaster* (Ha *et al.*, 2009). Em adição à imunidade intestinal, diversos mecanismos de defesa em carrapatos vão agir em outros compartimentos colonizados por patógenos, tais como hemocele, glândulas salivares e ovários (Taylor, 2006; Sonenshine and Hynes, 2008).

Hemoglobina como fonte de peptídeos bioativos

Além de sua função primária como transportadora de oxigênio, a hemoglobina constitui uma importante fonte de peptídeos biologicamente ativos, desempenhando atividades opióides, analgésicas, hemopoiéticas, vasoconstritoras e anticoncepcionais (Ivanov *et al.*, 2005). Adicionalmente, verificou-se que as subunidades α e β da hemoglobina de diversos vertebrados apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Parish *et al.*, 2001) e, nos últimos 10 anos, vários trabalhos têm descrito a atividade antimicrobiana de peptídeos derivados da hidrólise química ou enzimática de hemoproteínas (Froidevaux *et al.*, 2001; Liepke *et al.*, 2003; Mak *et al.*, 2004; Daoud *et al.*, 2005; Nedjar-Arroume *et al.*, 2006; Nedjar-Arroume *et al.*, 2008). Tais peptídeos an-

Contato do autor:

¹carlcruz@usp.br

Recebido 05out10

Aceito 30mar11

Publicado

timicrobianos passaram a ser coletivamente denominados hemocidinas (Mak *et al.*, 2000).

Considerando que a hemoglobina do sangue do hospedeiro sofre proteólise no intestino do carrapato e pode gerar hemocidinas (Fogaca *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2003b; Sonenshine *et al.*, 2005), estas moléculas podem constituir um componente importante da imunidade inata neste órgão (Kopacek *et al.*, 2010). De fato, um peptídeo antimicrobiano purificado do intestino do carrapato bovino *R. (B.) microplus* foi descrito em 1999, e este foi o primeiro relato de uma hemocidina produzida *in vivo* através de atividade proteolítica endógena (Fogaca *et al.*, 1999). Este peptídeo, denominado Hb 33-61, apresenta massa molecular de 3.205 Da e atividade contra bactérias gram-positivas e fungos, e corresponde aos aminoácidos 33 a 61 da subunidade α da hemoglobina bovina (Fogaca *et al.*, 1999). A estrutura terciária do peptídeo sintético de carboxila amidada, Hb 33-61a, foi elucidada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) na presença de micelas de dodecil sulfato de sódio (SDS), sugerindo que a molécula é responsável pela permeabilização da membrana plasmática de agentes patogênicos, tais como a levedura *Candida albicans* (Sforca *et al.*, 2005). Posteriormente outras hemocidinas foram identificadas nesta mesma espécie de carrapato (Cruz *et al.*, 2010).

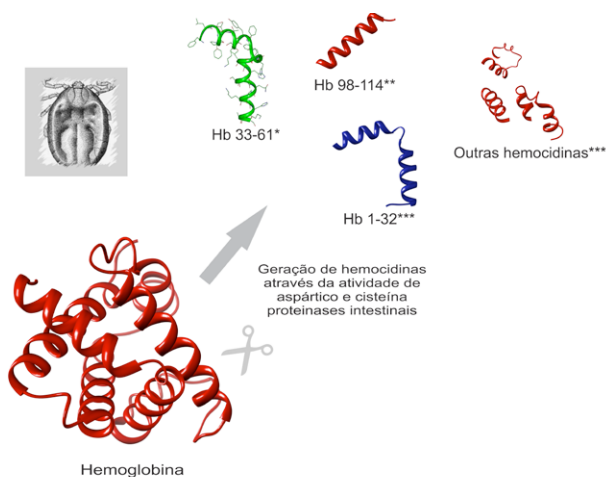


Figura 1. Geração de peptídeos antimicrobianos (hemocidinas) resultantes da hemoglobinólise ácida no intestino do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. * Hemocidina purificada a partir do extrato intestinal [Fogaça e col. (1999)]; ** Hemocidina isolada a partir de extratos ácidos do intestino [Belmonte (2011, em prep.)]; *** Hemocidina obtida através de hemoglobinólise *in vitro* [Cruz e col. (2010)].

Outras hemocidinas foram isoladas do lúmen intestinal do carrapato argasídeo *Ornithodoros moubata*, provenientes da proteólise endógena da subunidade α da hemoglobina de coelhos, e estes peptídeos apresentaram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* (Nakajima *et al.*, 2003b). Hemocidinas ativas contra *Micrococcus luteus* também foram identificadas em extratos do intestino do carrapato ixodídeo *Dermacentor variabilis* (Sonenshine *et al.*, 2005), sugerindo que mecanismos imunes similares nas duas principais famílias de carrapatos, Ixodidae e Argasidae, utilizam a

hemoglobina do hospedeiro como agentes de controle microbiano no intestino.

Acredita-se que hemocidinas sejam geradas através de proteólise em vesículas ácidas presentes em células digestórias (Lara *et al.*, 2005), através da ação de uma rede de aspártico e cisteína proteinases (Sojka *et al.*, 2008; Horn *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2010) (Figura 1). Interessantemente, a rede de proteinases caracterizada em carrapatos apresenta uma similaridade marcante com cascatas de proteinases já descritas em outros parasitas, tais como plelmintos e nematóides (Caffrey *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2004; Delcroix *et al.*, 2006). Esta rede de proteinases participa na geração de hemocidinas (Cruz *et al.*, 2010) que potencialmente conferem proteção contra patógenos invasores. Além disso, tais proteinases podem servir como alvo para o desenvolvimento de vacinas para o controle de populações de carrapatos e na regulação de sua capacidade vetorial (Tsuji *et al.*, 2008; Parizi *et al.*, 2009).

Muitas hemocidinas são catiônicas, apresentam alta porcentagem de estrutura em α -hélice (Nedjar-Arroume *et al.*, 2008), e a sua atividade antimicrobiana ocorre através da permeabilização da membrana celular (Lindberg *et al.*, 2001; Sforca *et al.*, 2005). Em humanos, hemocidinas já foram identificadas no sangue menstrual (Mak *et al.*, 2004) e na placenta (Liepke *et al.*, 2003).

Outras moléculas envolvidas na resposta imune no intestino de carrapatos

Outras moléculas podem contribuir para a imunidade intestinal, tais como lisozimas, defensinas e inibidores de proteases, conjuntamente com mecanismos de estresse oxidativo.

Lisozimas: são enzimas capazes de hidrolisar ligações glicosídicas de peptidoglicanos que constituem a parede celular de muitas bactérias, atuando assim como potentes agentes antimicrobianos.

Lisozimas do tipo C foram identificadas em algumas espécies de carrapatos. Em *Ornithodoros moubata* foi caracterizada uma lisozima com atividade anti-*Micrococcus luteus* (Kopacek *et al.*, 1999) e o seu nível de expressão aumentou após a alimentação sanguínea (Grunclova *et al.*, 2003).

Em *Dermacentor variabilis* também foi verificado que uma lisozima é expressa no intestino (Ceraul *et al.*, 2007). Embora o nível de transcrição deste gene não tenha aumentado após a alimentação sanguínea, a sua expressão foi aumentada em carrapatos infectados artificialmente com *Rickettsia montanensis* (Ceraul *et al.*, 2007).

Defensinas: são proteínas catiônicas ricas em cisteína capazes de formar poros na membrana de bactérias e fungos. Quatro isoformas de defensinas descritas em *Ornithodoros moubata* (A, B, C e D) tiveram seus níveis de expressão aumentados após a alimentação sanguínea (Nakajima *et al.*, 2001; Nakajima *et al.*, 2002). A isoforma A da defensina foi purificada do conteúdo intestinal e apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* (Nakajima *et al.*, 2002). A sua forma recombinante foi

ativa contra bactérias gram-positivas, permeabilizando a membrana bacteriana, mas não foi ativa contra bactérias gram-negativas (Nakajima *et al.*, 2003a).

Uma defensina de *Haemaphysalis longicornis* foi expressa especificamente no intestino e o seu nível de expressão aumentou após injeção de lipopolissacarídeo (LPS) na hemocele (Zhou *et al.*, 2007). Defensinas predominantemente expressas no intestino também foram descritas em outros ixodídeos: *Ixodes ricinus* (Rudenko *et al.*, 2005), *Ixodes scapularis* (Hynes *et al.*, 2005) e *Ixodes persulcatus* (Saito *et al.*, 2009). A comparação de defensinas sintéticas de diferentes ixodídeos revelou que todas elas são ativas contra *Staphylococcus aureus*. Contudo, uma espécie de *Borrelia*, agente etiológico da doença de Lyme, mostrou-se resistente à atividade de defensina, sugerindo que tais bactérias podem se adaptar aos mecanismos imunes do carrapato (Isogai *et al.*, 2009).

Longicinas: são peptídeos antimicrobianos estruturalmente semelhantes às defensinas e identificados no intestino de *Haemaphysalis longicornis* (Tsuji *et al.*, 2007). A forma recombinante de uma longicina foi ativa contra uma ampla gama de microorganismos, incluindo bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, além de apresentar atividade anti-*Babesia in vitro* (Tsuji and Fujisaki, 2007; Rahman *et al.*, 2010). Em um experimento *in vivo*, a inoculação de longicina reduziu significativamente a parasitemia em camundongos infectados com *Babesia microti*. Adicionalmente, experimentos com RNA de interferência dão suporte à função destas proteínas na transmissão de *Babesia* e na regulação da capacidade vetorial de *Haemaphysalis longicornis* (Tsuji *et al.*, 2007).

Inibidores de proteases: são moléculas capazes de inibir a atividade de diversas classes de proteases. Podem desempenhar um papel importante na imunidade intestinal através da inibição de proteinases específicas produzidas por microorganismos.

No intestino de *Haemaphysalis longicornis*, o nível de expressão de um inibidor de cisteína proteinase da classe das cistatinas (Hlcyst-2) aumentou em resposta à alimentação sanguínea, à injeção de LPS e à infecção experimental com *Babesia gibsoni*. A forma recombinante deste inibidor produziu um efeito negativo no crescimento de *Babesia bovis* em cultura (Zhou *et al.*, 2006).

Ao contrário da maioria dos inibidores do tipo Kunitz, que são expressos nas glândulas salivares para o controle da hemostasia do hospedeiro, um inibidor deste tipo (designado KPI), foi expresso no intestino de *Dermacentor variabilis* em resposta à alimentação sanguínea, e os seus níveis de transcrição foram induzidos após infecção com riquetsias (Ceraul *et al.*, 2008). Além de sua atividade de inibição de serina proteinases e possível função anticoagulante, foi demonstrado que a KPI limita a colonização de riquetsias em fibroblastos de camundongos (Ceraul *et al.*, 2008).

Estresse oxidativo: sabe-se que o epitélio intestinal de *Drosophila* controla de forma eficiente e específica a

microbiota bacteriana, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Ha *et al.*, 2005; Ha *et al.*, 2009), e suporta a hipótese de que mecanismos de estresse oxidativo devem contribuir para a imunidade intestinal em carrapatos.

Várias enzimas antioxidantes tiveram sua expressão gênica aumentada em diferentes espécies de carrapatos em resposta à infecção por patógenos e/ou alimentação sanguínea, como é o caso da glutathione S-transferase (Mullenga *et al.*, 2003; Rudenko *et al.*, 2005; Dreher-Lesnick *et al.*, 2006). Adicionalmente, observou-se que uma catalase, enzima responsável pela detoxificação do peróxido de hidrogênio, desempenha uma função importante na regulação do estresse oxidativo no intestino de *R. (B.) microplus* (Citelli *et al.*, 2007). Interessantemente, a análise do transcriptoma do intestino de *D. variabilis* resultou na identificação de transcritos de outras enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase e tioredoxina (Anderson *et al.*, 2008).

Considerações finais

Considerando que os carrapatos adquirem diversos microorganismos do hospedeiro vertebrado e podem se tornar vetores eficientes de patógenos, o seu intestino deve apresentar sistemas eficientes de controle microbiano. Componentes importantes da imunidade intestinal podem incluir hemocidinas, geradas endogenamente através de atividade proteolítica de hemeproteínas do hospedeiro vertebrado, além de moléculas de defesa secretadas pelo epitélio intestinal, tais como defensinas, lisozimas e inibidores de proteinases. Adicionalmente, outros agentes microbicidas podem limitar a proliferação de patógenos neste órgão, tais como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, embora este ainda seja um campo a ser explorado. De fato, as pesquisas em imunidade inata em carrapatos, e o seu papel no controle de patógenos, estão se iniciando com a era pós-genômica. Técnicas mais recentes de genética reversa, que objetivam determinar quais fenótipos ocorrem como resultado da expressão de genes específicos, e a genômica funcional, baseada no silenciamento de genes específicos através da técnica de RNA de interferência, irão gerar informações que permitirão decifrar os mecanismos de controle dos vetores sobre seus patógenos.

Agradecimentos

Leopoldo Francisco Barletta Marchelli pelos comentários e sugestões.

Bibliografia

- Anderson, J. M., Sonenshine, D. E. and Valenzuela, J. G. (2008). Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics* 9: 552.
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A. and Jorgensen, W. 2008. Ticks: biology, disease and control. In: Bowman, A.S. and Nuttall, P. Ticks: Biology, Disease and Control: p. 281-307.
- Bowman, A. S. and Nuttall, P. A., Eds. 2008. Ticks: Biology, disease and control. Cambridge, Cambridge University

- Press.
- Caffrey, C. R., McKerrow, J. H., Salter, J. P. and Sajid, M. (2004). Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol* 20(5): 241-8.
- Ceraul, S. M., Dreher-Lesnack, S. M., Gillespie, J. J., Rahman, M. S. and Azad, A. F. (2007). New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. *Infect Immun* 75(4): 1973-83.
- Ceraul, S. M., Dreher-Lesnack, S. M., Mulenga, A., Rahman, M. S. and Azad, A. F. (2008). Functional characterization and novel rickettsiostatic effects of a Kunitz-type serine protease inhibitor from the tick *Dermacentor variabilis*. *Infect Immun* 76(11): 5429-35.
- Citelli, M., Lara, F. A., da Silva Vaz, I., Jr. and Oliveira, P. L. (2007). Oxidative stress impairs heme detoxification in the midgut of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Mol Biochem Parasitol* 151(1): 81-8.
- Cruz, C. E., Fogaca, A. C., Nakayasu, E. S., Angeli, C. B., Belmonte, R., Almeida, I. C., Miranda, A., Miranda, M. T., Tanaka, A. S., Braz, G. R., Craik, C. S., Schneider, E., Caffrey, C. R. and Daffre, S. (2010). Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. *Parasit Vectors* 3: 63.
- Daoud, R., Dubois, V., Bors-Dodita, L., Nedjar-Arroume, N., Krier, F., Chihib, N. E., Mary, P., Kouach, M., Briand, G. and Guillochon, D. (2005). New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides* 26(5): 713-9.
- de la Fuente, J., Blouin, E. F., Manzano-Roman, R., Naranjo, V., Almazan, C., Perez de la Lastra, J. M., Zivkovic, Z., Jongejan, F. and Kocan, K. M. (2007). Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. *Genomics* 90(6): 712-22.
- Delcroix, M., Sajid, M., Caffrey, C. R., Lim, K. C., Dvorak, J., Hsieh, I., Bahgat, M., Dissous, C. and McKerrow, J. H. (2006). A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *J Biol Chem* 281(51): 39316-29.
- Dreher-Lesnack, S. M., Mulenga, A., Simser, J. A. and Azad, A. F. (2006). Differential expression of two glutathione S-transferases identified from the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Mol Biol* 15(4): 445-53.
- Fogaca, A. C., da Silva, P. I., Jr., Miranda, M. T. M., Bianchi, A. G., Miranda, A., Ribolla, P. E. and Daffre, S. (1999). Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J Biol Chem* 274(36): 25330-4.
- Froidevaux, R., Krier, F., Nedjar-Arroume, N., Vercaigne-Marko, D., Kosciarsz, E., Ruckebusch, C., Dhulster, P. and Guillochon, D. (2001). Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Lett* 491(1-2): 159-63.
- Grunclova, L., Fouquier, H., Hypsa, V. and Kopacek, P. (2003). Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. *Dev Comp Immunol* 27(8): 651-60.
- Ha, E. M., Lee, K. A., Seo, Y. Y., Kim, S. H., Lim, J. H., Oh, B. H., Kim, J. and Lee, W. J. (2009). Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in *Drosophila* gut. *Nat Immunol* 10(9): 949-57.
- Ha, E. M., Oh, C. T., Bae, Y. S. and Lee, W. J. (2005). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310(5749): 847-50.
- Horn, M., Nussbaumerova, M., Sanda, M., Kovarova, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffrey, C. R., Kopacek, P. and Mares, M. (2009). Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chem Biol* 16(10): 1053-63.
- Hynes, W. L., Ceraul, S. M., Todd, S. M., Seguin, K. C. and Sonenshine, D. E. (2005). A defensin-like gene expressed in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Med Vet Entomol* 19(4): 339-44.
- Isogai, E., Isogai, H., Takahashi, K., Kobayashi-Sakamoto, M. and Okumura, K. (2009). Antimicrobial activity of three tick defensins and four mammalian cathelicidin-derived synthetic peptides against Lyme disease spirochetes and bacteria isolated from the midgut. *Exp Appl Acarol* 49(3): 221-8.
- Ivanov, V. T., Karelin, A. A. and Yatskin, O. N. (2005). Generation of peptides by human erythrocytes: facts and artifacts. *Biopolymers* 80(2-3): 332-46.
- Jonsson, N. N. (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol* 137(1-2): 1-10.
- Jonsson, N. N., Bock, R. E. and Jorgensen, W. K. (2008). Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet Parasitol* 155(1-2): 1-9.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F. and Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol* 167(2-4): 95-107.
- Kopacek, P., Hajdusek, O., Buresova, V. and Daffre, S. 2010. Tick innate immunity. In: Kenneth Soderhall. **Invertebrate immunity**. Austin, TX, Landes Bioscience.
- Kopacek, P., Vogt, R., Jindrak, L., Weise, C. and Safarik, I. (1999). Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29(11): 989-97.
- Lara, F. A., Lins, U., Bechara, G. H. and Oliveira, P. L. (2005). Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J Exp Biol* 208(16): 3093-101.
- Liepkke, C., Baxmann, S., Heine, C., Breithaupt, N., Standker, L. and Forssmann, W. G. (2003). Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 791(1-2): 345-56.
- Lindberg, M., Jarvet, J., Langel, U. and Graslund, A. (2001). Secondary structure and position of the cell-penetrating peptide transportan in SDS micelles as determined by NMR. *Biochemistry* 40(10): 3141-9.
- Mak, P., Wojcik, K., Silberring, J. and Dubin, A. (2000). Antimicrobial peptides derived from heme-containing proteins: hemocidins. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77(3): 197-207.
- Mak, P., Wojcik, K., Wicherek, L., Suder, P. and Dubin, A. (2004). Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. *Peptides* 25(11): 1839-47.
- Mulenga, A., Macaluso, K. R., Simser, J. A. and Azad, A. F. (2003). Dynamics of *Rickettsia*-tick interactions: identification and characterization of differentially expressed mRNAs in uninfected and infected *Dermacentor variabilis*. *Insect Mol Biol* 12(2): 185-93.
- Nakajima, Y., Ishibashi, J., Yukuhiro, F., Asaoka, A., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2003a). Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1624(1-3): 125-30.
- Nakajima, Y., Ogihara, K., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2003b). Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of

- the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *J Med Entomol* 40(1): 78-81.
- Nakajima, Y., van Naters-Yasui, A. G., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2001). Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochem Mol Biol* 31(8): 747-51.
- Nakajima, Y., van Naters-Yasui, A. V., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2002). Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. *Insect Molecular Biology* 11(6): 611-8.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Adje, E. Y., Traisnel, J., Krier, F., Mary, P., Kouach, M., Briand, G. and Guillochon, D. (2008). Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides* 29(6): 969-77.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Miloudi, K., Daoud, R., Krier, F., Kouach, M., Briand, G. and Guillochon, D. (2006). Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides* 27(9): 2082-9.
- Parish, C. A., Jiang, H., Tokiwa, Y., Berova, N., Nakanishi, K., McCabe, D., Zuckerman, W., Xia, M. M. and Gabay, J. E. (2001). Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. *Bioorg Med Chem* 9(2): 377-82.
- Parizi, L. F., Pohl, P. C., Masuda, A. and Vaz Ida, S., Jr. (2009). New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Rev Bras Parasitol Vet* 18(1): 1-7.
- Rahman, M., Tsuji, N., Boldbaatar, D., Battur, B., Liao, M., Umemiya-Shirafuji, R., You, M., Tanaka, T. and Fujisaki, K. (2010). Structural characterization and cytolytic activity of a potent antimicrobial motif in longicin, a defensin-like peptide in the tick *Haemaphysalis longicornis*. *J Vet Med Sci* 72(2): 149-56.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Edwards, M. J. and Grubhoffer, L. (2005). Differential expression of *Ixodes ricinus* tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. *J Med Entomol* 42(1): 36-41.
- Saito, Y., Konnai, S., Yamada, S., Imamura, S., Nishikado, H., Ito, T., Onuma, M. and Ohashi, K. (2009). Identification and characterization of antimicrobial peptide, defensin, in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. *Insect Mol Biol* 18(4): 531-9.
- Sforca, M. L., Machado, A., Figueredo, R. C., Oyama, S., Jr., Silva, F. D., Miranda, A., Daffre, S., Miranda, M. T. M., Spisni, A. and Pertinhez, T. A. (2005). The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. *Biochemistry* 44(17): 6440-51.
- Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdusek, O., Caffrey, C. R., Mares, M. and Kopacek, P. (2008). Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasit Vectors* 1(1): 7.
- Sonenshine, D. E. and Hynes, W. L. (2008). Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Front Biosci* 13: 7046-63.
- Sonenshine, D. E., Hynes, W. L., Ceraul, S. M., Mitchell, R. and Benzine, T. (2005). Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. *Exp Appl Acarol* 36(3): 207-23.
- Taylor, D. (2006). Innate immunity in ticks: a review. *J Acarol Soc Jpn* 15: 109-27.
- Tsuji, N., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Miyoshi, T., Xuan, X., Oliver, J. H., Jr. and Fujisaki, K. (2007). Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites. *Infect Immun* 75(7): 3633-40.
- Tsuji, N. and Fujisaki, K. (2007). Longicin plays a crucial role in inhibiting the transmission of *Babesia* parasites in the vector tick *Haemaphysalis longicornis*. *Future Microbiol* 2: 575-8.
- Tsuji, N., Miyoshi, T., Battsetseg, B., Matsuo, T., Xuan, X. and Fujisaki, K. (2008). A cysteine protease is critical for *Babesia* spp. transmission in *Haemaphysalis* ticks. *PLoS Pathog* 4(5): e1000062.
- Williamson, A. L., Lecchi, P., Turk, B. E., Choe, Y., Hotez, P. J., McKerrow, J. H., Cantley, L. C., Sajid, M., Craik, C. S. and Loukas, A. (2004). A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. *J Biol Chem* 279(34): 35950-7.
- Zhou, J., Liao, M., Ueda, M., Gong, H., Xuan, X. and Fujisaki, K. (2007). Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Peptides* 28(6): 1304-10.
- Zhou, J., Ueda, M., Umemiya, R., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Xuan, X. and Fujisaki, K. (2006). A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 36(7): 527-35.