

DESENVOLVIMENTO DE VACINA CONTRA *Rhipicephalus microplus*

LAUREN NETTO PUJOL¹; KAUÊ RODRIGUEZ MARTINS²; RODRIGO CASQUERO CUNHA³

¹Universidade Federal de Pelotas – laurenetto21@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha_vet@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus, comumente conhecido como "carrapato do boi", consiste em um ácaro hematófago, encontrado em áreas tropicais e subtropicais (WILLADSEN; JONGEJAN, 1999). Este parasito assume um papel significativo como vetor de diversas doenças, incluindo arboviroses, rickettsioses, espiroquetoses e protozooses, tanto em seres humanos quanto em animais domésticos (KAUFMAN, 1989; PATARROYO, 1994).

Dessa forma, *R. microplus* representa uma fonte significativa de prejuízos econômicos na indústria pecuária bovina. Dentre os agentes disseminados por este carrapato, as rickettsias do gênero *Anaplasma* e protozoários do gênero *Babesia*, microrganismos responsáveis pela manifestação do complexo patológico amplamente reconhecido como "Tristeza Parasitária Bovina" (TPB), são os causadores dos maiores prejuízos à pecuária bovina brasileira (ANDREOTTI e KOLLER, 2013).

Com a crescente incidência de populações de carrapatos resistentes aos acaricidas, uma abordagem potencialmente eficaz para controlar esse parasito é a pesquisa e desenvolvimento de uma formulação vacinal eficaz, inclusive contra essas populações resistentes. As vacinas emergem como uma estratégia promissora neste contexto, oferecendo uma alternativa viável para o controle do carrapato quando utilizadas em conjunto com métodos de controle químico. Esta estratégia resulta na redução da frequência de aplicação de acaricidas, proporcionando, assim, uma gestão mais eficiente dos custos de produção. No contexto da crescente demanda por abordagens alternativas para o controle do carrapato, uma abordagem vacinal, com a indução da resposta imune em bovinos contra carrapatos, tem mostrado resultados promissores (ANDREOTTI et al., 2002).

2. METODOLOGIA

Com base em ensaios anteriores, foi escolhido um clone recombinante de rTI-CG-Th em cepa GS115 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) para ser induzido. Uma colônia isolada desse clone selecionado foi inoculada em 25 mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM, pH 6.0, YNB 1,34 %, biotina 4 × 10⁻⁵%, glicerol 1%) e incubada durante a noite a 30 °C, a 250 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 1.500 x g por 5 min e ressuspensas em meio BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM, pH 6.0, YNB 1,34 %, biotina 4 × 10⁻⁵%, metanol 1%) para a indução a uma DO_{600nm} = 1,0 em frascos tipo Erlenmeyer de 1 L. O cultivo foi, então, incubado por mais 4 dias a 30 °C, a 250 rpm. A cada 24 h, uma alíquota de 1 mL de cultivo era coletada, e a DO_{600nm} aferida. A indução foi mantida com a adição de

0,5% de metanol (v/v) a cada 24 h. Ao final de 5 dias, o cultivo foi centrifugado e o sobrenadante tratado com 0,1 mM de PMSF. A proteína total do sobrenadante foi precipitada com 60% de sulfato de amônia e ultracentrifugação a 20.000 × g por 45 min., a 4 °C. A proteína foi ressuspensa em Tris-HCl 100 mM, pH 7,4, e dialisada contra esta mesma solução 1:1.000 (v/v), duas vezes durante 12 h cada.

Um grupo foi inoculado com 2 mL da formulação vacinal contendo a proteína recombinante e outro grupo inoculado com o mesmo volume de placebo (Tris-HCl 100 mM, pH 7,4), utilizado como controle. Cada animal do grupo vacinal foi injetado com 3 doses de 200 µg de proteína recombinante em formulação vacinal com 60% de Montanide ISA 61 VG (Seppic), por via intramuscular, com intervalos de 30 dias entre a primeira e a segunda dose, e de 150 dias entre a primeira e a terceira dose (dias 0, 30 e 150).

Os ensaios de vacinação de bovinos foram realizados com o objetivo de calcular a porcentagem de eficácia do antígeno recombinante contra infestações por *R. microplus*. Para isso, foram utilizados bovinos de raça europeia, de rebanhos de fazendas da região Sul do RS com histórico de infestação por carrapato, sob convênio de colaboração com a UFPEL. Os animais foram acompanhados por 28 dias, procedendo-se a contagem semanal de teleóginas fixadas em cada animal. A partir dos resultados das contagens, os animais foram separados em 2 grupos randomizados pelo número de teleóginas fixadas.

Animais do experimento tiveram seu sangue colhido a cada 30 dias para obtenção de soro e sangue em tubo contendo EDTA para posterior extração de DNA genômico (gDNA). Os soros e sangues estão sendo armazenados a -20 °C, para sua posterior utilização.

ELISA-indireto foi realizado em microplacas de 96 poços com 50 ng por poço de antígeno adsorvido com tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6. As placas foram bloqueadas com solução de leite em pó desnatado a 2% em tampão fosfato (PBS). Para a titulação, foram utilizadas diluições seriadas dos soros de cada animal. Para a cinética da produção de anticorpos, todos os soros foram diluídos a 1:300. Os anticorpos primários de bovinos foram detectados com anticorpos secundários anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2 (Bethyl, TX). Após cada solução, as placas foram lavadas com PBS-T (PBS adicionado de 0,05% de Tween 20). A revelação foi feita com solução de o-Phenylenediamine dyhydrochloride (OPD) (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) e peróxido de hidrogênio, por 15 min a 37 °C. A reação foi parada com ácido sulfúrico 2 N e submetida a leitura em leitor de microplacas (Thermo Plate, EU) com filtro de 492 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados parciais do ELISA-indireto estão apresentados na Figura 1. Nesta é possível observar a dinâmica da produção de anticorpos pelos animais vacinados. Os animais do grupo controle não apresentaram níveis significativos de IgG contra a proteína rBM86. Isto pode ser devido a não exposição ou a uma fraca exposição dos animais aos antígenos naturais do carrapato antes da vacinação e durante o período de experimento, mas também pode ser que o sistema imunitário dos animais do grupo controle tenha entrado em contato com os antígenos, porém não respondeu a determinantes antigênicos presentes na proteína recombinante.

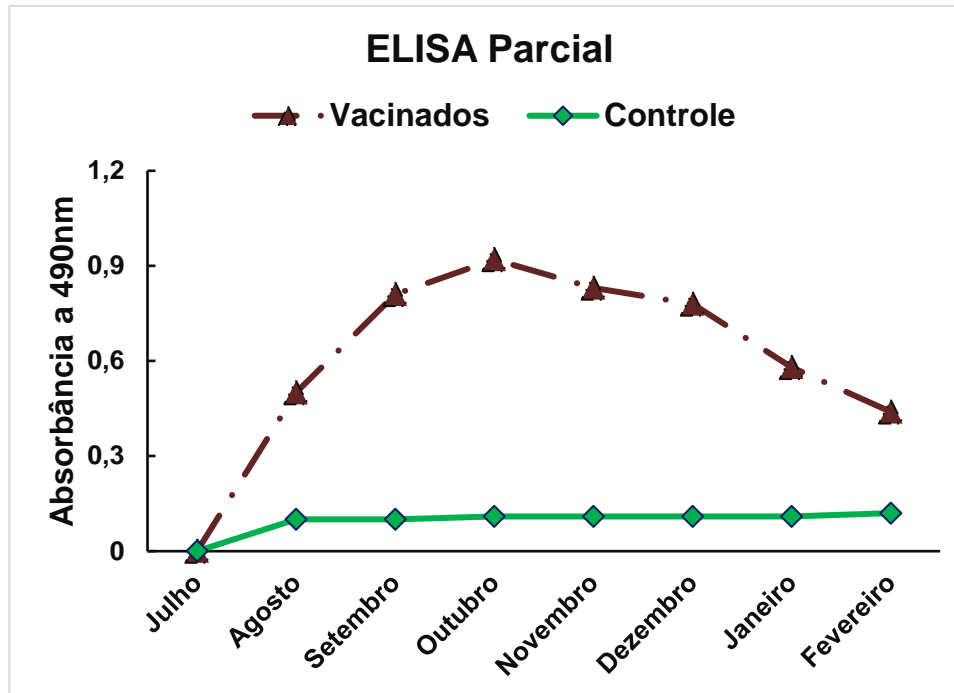


Figura 1: Representação gráfica da dinâmica de produção de anticorpos específicos contra rTI-CG-Th detectados por ensaio imunoenzimático (ELISA). A proteína rTI-CG-Th foi utilizada para sensibilizar as microplacas de poliestireno.

4. CONCLUSÕES

Em suma, o desenvolvimento de uma formulação vacinal recombinante eficaz contra *R. microplus* representa um avanço significativo em diversos aspectos. Vacinas recombinantes têm vantagens sobre o uso de acaricidas, método tradicional de controle do carrapato, pois a vacina não é um agente químico, tem menor custo de produção e o processo de desenvolvimento de resistência é mais lento.

Além disso, uma vacina recombinante eficiente também configura um progresso considerável no controle de doenças transmitidas pelo vetor supracitado e, conseqüentemente, um menor custo na produção para a pecuária bovina quando comparada aos acaricidas, tendo em vista seu potencial de controle de carrapatos resistentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE VOS, S.; ZEINSTRA, L.; TAOUFIK, A.; WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. Evidence for the Utility of the Bm86 Antigen from *Boophilus microplus* in Vaccination Against Other Tick Species. **Experimental and applied acarology**, v. 25, n. 3, p. 245–261, 2001.

KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, Oxford, v. 5, p. 47-56, 1989.

PATARROYO, J. H. Babesiose bovina: controle de vetores com vacinas a base de peptídeos sintéticos. **Revista de patologia tropical**, v. 23, n. 2, p. 145-146, 1994.



ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. (Org.). Carrapatos no Brasil. Biologia, Controle e Doenças Transmitidas. 1ed.Campo Grande: **Embrapa Gado de Corte**, 2013, v. 1, p. 105-118.

ANDREOTTI, R. et al. BmTlantigen induce as bovine protective immune response against Boophilusmicroplus tick. **Internationallmunopharmacology**, v. 2, p. 557-563, 2002.