

IgG TOTAL EM BOVINOS VACINADOS COM QUIMERA RECOMBINANTE CONTRA O CARRAPATO-DO-BOI: COMPARANDO ADJUVANTES

DIULIANI FONSECA MORALES¹; PEDRO MACHADO MEDEIROS DE ALBUQUERQUE²; JAQUELINE DE DEOS SILVEIRA³; PEDRO GABRIEL DE OLIVEIRA⁴; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁵; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – diulimoralesfonseca@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – albuquerque95pedro@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – jaquededeos@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – pedrogaoliveira@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha_vet@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O carrapato-do-boi (*Rhipicephalus microplus*) causa graves prejuízos à pecuária, transmitindo hemoparasitos e gerando perdas globais estimadas em US\$ 22-30 bilhões anuais (LEW-TABOR; RODRIGUEZ VALLE, 2016). No Brasil, esses danos ultrapassam US\$3 bilhões por ano (GRISI *et al.*, 2014). O desenvolvimento de vacinas contra *R. microplus* avançou com a avaliação de antígenos recombinantes individuais e em combinação. Estratégias multi-antigênicas apresentaram em diferentes estudos, eficácia superior às vacinas com apenas um alvo imunogênico, especialmente quando os antígenos são selecionados de maneira criteriosa (PARIZI *et al.*, 2012; MARUYAMA *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2022; ABBAS *et al.*, 2023). Nesse contexto, a proteína recombinante RmLTI-BmCG-LTB é uma proteína multicomponente que reduziu a infestação de *R. microplus* em 55,6% em novilhas Angus nos ensaios iniciais (CSORDAS *et al.*, 2018), mas diferentes formulações e os mecanismos imunológicos promovidos ainda não foram elucidados, reforçando a necessidade de novas investigações.

A quimera recombinante RmLTI-BmCG-LTB reúne dois antígenos de *R. microplus* e a subunidade B da toxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB). O primeiro antígeno é o inibidor de tripsina RmLTI (GenBank: P83606), expresso em larvas, derivado de uma sequência altamente conservada da BmTI-6, um inibidor do tipo Kunitz (CSORDAS *et al.*, 2018; CUNHA *et al.*, 2012). O segundo antígeno corresponde a uma variante da proteína Bm86, isolada em Campo Grande BmCG (GenBank: ACA5782) (CUNHA *et al.*, 2012). Por fim, a subunidade LTB (GenBank: ACJ23372) também compõe a quimera, atuando como adjuvante molecular (CSORDAS *et al.*, 2018).

A eficácia de vacinas contra *R. microplus* pode ser influenciada pela escolha do adjuvante, uma vez que este desempenha papel na modulação da resposta imune do hospedeiro (BURAKOVA *et al.*, 2018). Um exemplo clássico é a vacina TickGARD®, que, após a modificação do adjuvante em 1996, passou a apresentar maior eficácia, sendo então comercializada sob a nova formulação, denominada TickGARD Plus® (WILLADSEN *et al.*, 1997). Assim, investigar o impacto de diferentes adjuvantes na imunogenicidade da quimera RmLTI-BmCG-LTB representa um passo relevante para a otimização de sua formulação e para o aprimoramento do desempenho vacinal e custo-benefício.

Neste trabalho, foram testados três adjuvantes: Montanide ISA 61 VG, hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] e xantana. A emulsão óleo-em-água Montanide, amplamente utilizada em vacinas veterinárias, promove liberação lenta do antígeno e induz resposta imunológica longa e robusta, com ativação celular e imunidade mista IgG1/IgG2, além de ter baixa reatogenicidade (KHORASANI *et al.*, 2016; BURAKOVA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2024). Por outro lado, Al(OH)₃, tradicionalmente utilizado em vacinas humanas e animais, induz resposta predominantemente humoral (tipo Th2) com produção de IgG1 e IgE, e é reconhecido por seu perfil de segurança; embora possua menor capacidade de gerar resposta celular (BURAKOVA *et al.*, 2018). Xantana, diferentemente de Montanide e Al(OH)₃, está em fase experimental, mas em estudos com modelos murinos, demonstrou elevação na produção de IgG1 e aumentou a secreção de IFN- γ , sem evidência de toxicidade, sugerindo perfil imunomodulador equilibrado e geração de resposta humoral e celular (SCHUCH *et al.*, 2017).

A imunoprofilaxia não substitui os métodos convencionais de controle do carrapato-do-boi, mas pode ser integrada a eles como estratégia complementar para aumentar a eficácia e reduzir o uso dos acaricidas, aumentando a sustentabilidade do manejo e diminuindo os custos. Desse modo, este estudo tem como objetivo avaliar a imunogenicidade humoral da quimera RmLTI-BmCG-LTB associada a diferentes adjuvantes em comparação com a proteína associada a PBS e com a vacina comercial GAVAC®. Buscamos identificar quais formulações apresentam maior capacidade de induzir imunidade humoral e, verificar a eficácia protetora frente a um desafio por infestação, permitindo relacionar a magnitude da resposta de anticorpos com a proteção conferida contra o carrapato.

2. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido em duas etapas: imunização e desafio.

A imunização com o antígeno recombinante foi realizada com animais *tick naive* mantidos sob condições de campo, em zona naturalmente livre de carrapatos. Para avaliar a eficácia dos diferentes adjuvantes utilizados na formulação vacinal, foram testados cinco grupos de bovinos: três grupos receberam a proteína purificada RmLTI-BmCG-LTB com adjuvantes distintos -Montanide ISA 61 VG, Xantana, Al(OH)₃-, um grupo sem adjuvante (PBS), e outro grupo recebeu a vacina comercial GAVAC®. Cada grupo vacinal teve seus respectivos controles não vacinados. A imunização consistiu em três doses intramusculares (200 μ g/dose em 2 mL) em intervalos de 15 dias (NDAWULA, 2021; VARGAS *et al.*, 2010). Os grupos controle (PBS e GAVAC®) eram compostos por 4 indivíduos, sendo dois deles não vacinados. O restante dos grupos eram compostos por 6 animais, ainda com 2 não vacinados. A resposta imune humoral foi monitorada através de coletas de soros antes da vacinação e 3 vezes após - dia 0, dia 15, dia 30 e dia 60.

A etapa de desafio foi realizada em *stall test*, com os bovinos mantidos em baias individuais, permitindo maior controle das infestações, acompanhamento e coleta de dados. Durante o desafio, 15.000 larvas de *R. microplus* foram aplicadas no dorso dos animais 21 dias após a última dose vacinal. Os carrapatos ingurgitados foram coletados diariamente, pesados e incubados (29°C, 85% UR) para análise da fertilidade (massa de ovos e eclodibilidade). O estudo foi aprovado pelo CEEA/UFPEL (nº 4889-2015), seguindo as normas do CONCEA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de IgG variaram entre os grupos vacinados com diferentes formulações. A formulação com Montanide apresentou a maior média de anticorpos, seguida por $\text{Al}(\text{OH})_3$, GAVAC®, xantana, PBS e controle não vacinado. Os valores obtidos para PBS e controle foram os mais baixos, como esperado para grupos sem adjuvante ou sem vacinação. Esses resultados indicam que, entre os adjuvantes avaliados, Montanide ISA 61 VG apresentou maior efeito sobre a produção de IgG, enquanto que xantana e hidróxido de alumínio resultaram em respostas intermediárias. A vacina comercial GAVAC® apresentou resposta superior à de PBS, mas inferior à de Montanide e outros adjuvantes testados.

Neste momento, os dados obtidos refletem apenas a resposta humoral pós-vacinação. A avaliação da eficácia protetora de cada formulação será possível juntamente com a análise dos resultados do desafio por infestação, que permitirá verificar a relação entre a produção de anticorpos e: número e peso das teleóginas, massa de ovos produzida e percentual de eclodibilidade.

Evidências sugerem que a proteção contra *R. microplus* está associada a perfis distintos de IgG1 e IgG2, com níveis séricos variando entre genótipos bovinos resistentes e suscetíveis (TABOR *et al.*, 2017). Assim, embora não tenha sido foco deste estudo, o controle do carrapato-do-boi por vacinação, pode depender de respostas do tipo Th1 e Th2. O hidróxido de alumínio, apesar de amplamente utilizado, induz a produção de IgG1 (BURAKOVA *et al.*, 2018). Considerando o histórico do Montanide, entende-se que ele pode apresentar melhor desempenho em desafios de campo, por promover respostas mistas (KHORASANI *et al.*, 2016; BURAKOVA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2024). Da mesma maneira, a formulação com xantana pode superar aquela com $\text{Al}(\text{OH})_3$ em termos de proteção no desafio de infestação, dado a indução de resposta humoral e o potencial de gerar também resposta celular (SCHUCH *et al.*, 2017). Além da imunogenicidade, a escolha do adjuvante deve considerar aspectos econômicos: hidróxido de alumínio e goma xantana, geralmente mais acessíveis do que Montanide, podem representar alternativas viáveis em larga escala, desde que apresentem eficiência suficiente na redução da infestação por *R. microplus*.

4. CONCLUSÕES

Estes resultados demonstram a importância de testar adjuvantes para o aprimoramento de vacinas contra *R. microplus*. Montanide apresentou os maiores níveis de IgG, ainda que $\text{Al}(\text{OH})_3$ e xantana também tenham sido capazes de modular a resposta humoral, apontando alternativas promissoras que podem equilibrar proteção e custo. A real eficácia em campo e a imunoproteção ainda precisarão ser confirmadas em análises futuras juntamente com os dados do desafio por infestação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, M. N. *et al.* Recent advances in tick antigen discovery and anti-tick vaccine development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4969, 2023.

- BURAKOVA, Y. *et al.* Adjuvants for animal vaccines. **Viral immunology**, v. 31, n. 1, p. 11-22, 2018.
- CSORDAS, B. G. *et al.* Molecular characterization of the recombinant protein RmLTI-BmCG-LTB: Protective immunity against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Plos One**, v. 13, n. 2, p. e0191596, 2018.
- CUNHA, R. C. *et al.* Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 254-262, 2012.
- GRISI, L. *et al.* Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- KHORASANI, A. *et al.* Evaluation of the efficacy of a new oil-based adjuvant ISA 61 VG FMD vaccine as a potential vaccine for cattle. **Iranian journal of veterinary research**, v. 17, n. 1, p. 8, 2016.
- LEW-TABOR, A. E.; VALLE, M. Rodriguez. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 4, p. 573-585, 2016.
- LEW-TABOR, A. E. *et al.* Cattle tick *Rhipicephalus microplus*-host interface: a review of resistant and susceptible host responses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 506, 2017.
- MARUYAMA, S. R. *et al.* Mining a differential sialotranscriptome of *Rhipicephalus microplus* guides antigen discovery to formulate a vaccine that reduces tick infestations. **Parasites & Vectors**, v. 10, p. 1-16, 2017.
- NDAWULA JR, C. From bench to field: a guide to formulating and evaluating anti-tick vaccines delving beyond efficacy to effectiveness. **Vaccines**, v. 9, n. 10, p. 1185, 2021.
- PARIZI, L. F. *et al.* Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation. **Vaccine**, v. 30, n. 48, p. 6912-6917, 2012.
- PEREIRA, D. F. S. *et al.* *Rhipicephalus microplus*: An overview of vaccine antigens against the cattle tick. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 13, n. 1, p. 101828, 2022.
- SCHUCH, R. A. *et al.* The use of xanthan gum as vaccine adjuvant: an evaluation of immunostimulatory potential in BALB/c mice and cytotoxicity in vitro. **BioMed research international**, v. 2017, n. 1, p. 3925024, 2017.
- SILVA, L. A. *et al.* Comparative study on alginate/chitosan microcapsules and Montanide ISA 61 as vaccine adjuvants in mice. **Plos one**, v. 19, n. 4, p. e0298117, 2024.
- VARGAS, M. *et al.* Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavacplus vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. **BMC veterinary research**, v. 6, n. 1, p. 43, 2010.
- WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 2-3, p. 209-222, 1997.