

ANDRESSA FISCH

**Vacina multicomponente recombinante baseada em antígenos secretados por
Rhipicephalus microplus induz imunidade protetora
contra carrapatos em bovinos e cães**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Beatriz Rossetti Ferreira
Co-orientadora: Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Fisch, Andressa

Vacina multicomponente recombinante baseada em antígenos secretados por *Rhipicephalus microplus* induz imunidade protetora contra carrapatos em bovinos e cães. Ribeirão Preto, 2018.

101 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Ferreira, Beatriz Rossetti.

1. Vacina anti-carrapato. 2. *Rhipicephalus microplus*. 3. Vacina recombinante multicomponente 4. Proteínas secretadas. 5. *Rhipicephalus sanguineus*.

As atividades descritas neste trabalho foram desenvolvidas no Laboratório de Genômica e Imunobiologia do Departamento de Enfermagem Materno-infantil e Saúde Pública da Faculdade de Enfermagem de Ribeirão Preto, e no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Atividades realizadas em instituições parceiras estão especificadas no texto. Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (bolsa de estudos PROEX - 03/2014 e 10/14), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (bolsa de estudos 2014/11010-0, vigente entre 11/2014 e 10/2018; financiamento de projeto de pesquisa 2015/09683-9), e Bayer S.A. (através do convênio 15.1.1998.17.6).

Fisch, A. **Vacina multicomponente recombinante baseada em antígenos secretados por *Rhipicephalus microplus* induz imunidade protetora contra carrapatos em bovinos e cães.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a) Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Agradecimentos

Ao meu marido Érico, que foi o meu porto seguro, meu ponto de apoio durante todos os difíceis momentos desta jornada. Pela paciência em ouvir minhas reclamações, por entender o meu cansaço, por ser o colo tão necessário. Por ser o conselheiro, meu colega de laboratório. Por ter se dedicado junto comigo para que este projeto chegasse aos seus resultados. Por estar sempre presente e por vibrar pelas pequenas conquistas do dia a dia junto comigo. Por alegrar os meus dias e por torna-los completos. Pelos planos futuros e por nos colocar sempre em primeiro lugar. Não existem palavras suficientes para te agradecer, mas muito obrigada por estar sempre ao meu lado.

À minha mãe Roseli, que me ajudou e me apoiou incondicionalmente em todos os momentos de minha vida. Por ser a melhor pessoa do mundo, e por ser o exemplo de amor e equilíbrio que foram a inspiração tão necessária para que eu chegasse até aqui. Por ter acreditado em mim, por todos os sacrifícios que fez para que esse momento pudesse acontecer. Eu nunca poderei ser suficientemente agradecida a ti, mãe, não importa as palavras que diga. Resta a mim, então, ser a melhor pessoa que eu puder, para que eu possa refletir uma pequena parte do que tu és para mim e para todos que tem a sorte de estar ao teu lado.

À minha família maravilhosa, que está sempre disposta a me ouvir e me ajudar, e que me traz tantos momentos de alegria. Que é o verdadeiro motivo de todas as minhas hesitações em ficar mais longe. Talvez eu não diga o suficiente, mas eu sinto falta de cada um de vocês, e meu maior desejo é poder estar perto e retribuir todo o carinho e amor que vocês me oferecem todos os dias, mesmo distantes. Se eu pudesse escolher minha morada perfeita, seria aquela em que nossas casas são tão próximas que dividiríamos um grande jardim, e onde eu poderia abraça-los quando quisesse. De forma especial, quero registrar aqui as minhas mais sinceras desculpas às minhas “crianças” Emerson, Arthur, Matheus, Alice e Benjamim, pela minha ausência tão constante. Saibam que vocês estão sempre na minha mente e no meu coração, e que eu os amo demais.

À minha orientadora e mentora Beatriz Ferreira, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório e em sua vida, por toda a confiança em mim e no meu trabalho desde o primeiro dia. Por toda a liberdade e apoio em cada ideia proposta, por não economizar esforços para que este trabalho fosse possível e para que tudo fosse mais leve. Só posso me considerar uma pessoa de sorte por ter trabalhado contigo este tempo todo. Especialmente, obrigada por entender e aceitar as minhas limitações, as minhas reclamações, pela paciência estes anos todos. Muito obrigada mesmo.

À minha co-orientadora e mentora Isabel Santos, por ter acreditado nesse trabalho e por todo o esforço despendido para que ele acontecesse. Por todas as palavras de incentivo e pelos ensinamentos, e acima de tudo pela confiança em mim depositada. Aos colegas Sandra Maruyama, Elen Anatriello e Gustavo Garcia por todo o auxílio prestado.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, que estão ao meu lado todos os dias, e que são como uma família para mim. Eu jamais terei palavras suficientes para agradecer por todo o esforço que vocês fizeram para me ajudar todos esses anos. Obrigada por terem acreditado nesta ideia tanto quanto eu, e por criarem esse filho comigo. Em especial à Isa, Luiz e Mari, cujo trabalho foi mais do que essencial para que esse projeto pudesse ser realizado; sem todo o esforço de vocês, não tenho dúvidas que este trabalho não seria possível, da forma como ocorreu. Peço desculpas se não pude retribuir a vocês na mesma extensão até o momento, mas quero que saibam que vocês tem um lugar especial no meu coração e eu sempre estarei aqui para vocês.

Aos professores Rodolfo Giunchetti e Ricardo Fujiwara, e aos colegas Otoni Mello e Jennifer Ottino, da Universidade de Minas Gerais, que encararam este projeto conosco e dedicaram-se incansavelmente para que os melhores resultados fossem alcançados. Da mesma forma, à equipe da Nowavet por todo o apoio prestado e por ter realizado seu trabalho da melhor forma possível para que estes resultados fossem alcançados.

Aos professores Tim Connelley, Nicola Ternette e Morten Nielsen, por me receberem em seus laboratórios e por toda a sua dedicação durante o meu estágio no exterior. Mesmo que os resultados por nós obtidos não estejam aqui descritos, eles são parte deste projeto e são essenciais para que o nosso objetivo final seja atingido. Especialmente, obrigada por serem pessoas maravilhosas que tornaram minha experiência sob sua supervisão extremamente agradável.

À professora Arlete Castelo, por ter nos cedido o espaço de seu laboratório para a realização de grande parte das atividades aqui descritas. Aos demais docentes, funcionários e colegas desta Universidade, que foram sempre tão generosos e solícitos ao longo destes anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo, pelo excelente trabalho gerencial prestado aos seus colaboradores e pelo extenso financiamento deste projeto. Que sirva de modelo de gerenciamento para outras instituições no país, para que os pesquisadores de nossos institutos e universidade possam realizar o seu trabalho com qualidade.

À Bayer S.A. e sua equipe, que acreditaram neste projeto conosco e que ofereceram seus contatos, expertise e financiamento para que as atividades aqui descritas pudessem ser realizadas da melhor forma possível. Esta parceria foi essencial para que este projeto atingisse o patamar em que se encontra hoje.

Muito obrigada.

Resumo

Fisch, A. **Vacina multicomponente recombinante baseada em antígenos secretados por *Rhipicephalus microplus* induz imunidade protetora contra carrapatos em bovinos e cães.** 2018. 101 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo, 2018.

Carrapatos são parasitas hematófagos transmissores de doenças para humanos e animais, e responsáveis por prejuízos econômicos de bilhões de dólares para os sistemas pecuários mundiais. A emergência de carrapatos multirresistentes a acaricidas torna urgente o desenvolvimento de vacinas efetivas contra este parasita. Neste trabalho, nós utilizamos dados de sialotranscriptomas de carrapatos *R. microplus* para selecionar antígenos secretados pelo parasita para serem testados como uma vacina multicomponente. Os antígenos produzidos de forma recombinante em *E. coli* foram utilizados como imunógenos em animais suscetíveis à carrapatos para testes de proteção vacinal contra infestações por *R. microplus* em bovinos e por *R. sanguineus* em cães. No primeiro ensaio, bovinos imunizados com oito antígenos recombinantes adjuvantados com um polímero sintético apresentaram indução de IgG sérica específica para cinco antígenos, e redução de 22% na infestação por carrapatos *R. microplus*. No segundo ensaio, a imunização de bovinos com nove antígenos adjuvantados com sais de alumínio gerou IgG específica para todos os antígenos inoculados, e proteção vacinal crescente de 70% e 75% em duas infestações sucessivas com carrapatos *R. microplus*, sem revacinação, indicando *boost* natural pela infestação. No terceiro ensaio, a imunização de cães com nove antígenos recombinantes associados à hidróxido de alumínio induziu a soroconversão de IgG dos animais para todos os antígenos, e proteção vacinal de 36% contra a infestação por carrapatos *R. sanguineus*. Todas as formulações afetaram principalmente o número de fêmeas ingurgitadas após a infestação. O efeito protetor de antígenos derivados de carrapatos *R. microplus* sobre carrapatos *R. sanguineus* (proteção cruzada) indica ser possível o desenvolvimento de uma vacina multicomponente efetiva contra os dois parasitas.

Palavras chave: vacina anti-carrapato, *Rhipicephalus microplus*, vacina recombinante multicomponente, proteínas secretadas, *Rhipicephalus sanguineus*.

Abstract

Fisch, A. **Recombinant multicomponent vaccine based on antigens secreted by *Rhipicephalus microplus* induces protective immunity against ticks in cattle and dogs**. 2018. 101 p. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo, 2018.

Ticks are hematophagous parasites which transmit diseases to humans and animals, and are responsible for billions of dollars of damage to the world's livestock systems. The emergence of ticks resistant to multiple acaricides makes urgent the development of effective vaccines against this parasite. In this work, we used data from the *R. microplus* tick sialotranscriptome to select antigens secreted by the parasite to be tested as a multicomponent vaccine. Recombinant antigens expressed in *E. coli* were used as antigens in tick's susceptible hosts to evaluate its efficacy in protect animals against *R. microplus* and *R. sanguineus* infestations. In the first assay, bovines immunized with eight recombinant antigens adjuvanted with a synthetic polymer presented the induction of serum IgG reactive for five antigens, and reduction of *R. microplus* infestation in 22%. In the second trial, immunization of cattle with nine antigens adjuvanted with aluminum salts generated serum IgG against all antigens, and vaccine protection against *R. microplus* parasitism was calculated in 70% and 75% for each infestation. In the third trial, the immunization of dogs with recombinant antigens adjuvanted with aluminum hydroxide induced IgG seroconversion against all antigens, and a 36% of protection against infestation by *R. sanguineus* ticks in immunized animals. All formulations reduced mainly the number of engorged females recovered from infestation. The cross reactive protection induced by *R. microplus* derived antigens *R. sanguineus* tick infestation indicate that it is possible to develop a unique multicomponent vaccine against the two parasites.

Key words: anti-tick vaccine, *Rhipicephalus microplus*, multicomponent recombinant vaccine, secreted proteins, *Rhipicephalus sanguineus*.

Sumário

1	Introdução	12
1.1	A importância do setor pecuário para a saúde pública humana	12
1.2	A infestações por carrapatos e seu impacto sobre os rebanhos bovinos	13
1.3	Controle das infestações por carrapatos	14
1.4	A saliva dos carrapatos e a interface parasita-hospedeiro como alvo vacinal	16
1.5	O uso da vacinologia reversa para a descoberta de antígenos secretados por carrapatos	17
2	Objetivos	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	Seleção dos antígenos secretados de carrapatos <i>R. microplus</i> para produção recombinante e teste de eficácia vacinal anti-carrapatos	22
4	Produção recombinantes dos antígenos secretados de <i>R. microplus</i> ...	31
4.1	Delineamento, síntese e propagação dos plasmídeos de expressão ...	32
4.2	Determinação da expressão dos antígenos recombinantes em <i>E. coli</i> através de cultivo em pequena escala	33
4.3	Expressão dos antígenos recombinantes.....	36
4.4	Solubilização das proteínas recombinantes em condição desnaturante e não desnaturante	36
4.5	Purificação das proteínas solubilizadas por cromatografia de afinidade ao níquel	38
4.6	Diálise e concentração	40
5	Proteção anti-carrapatos <i>R. microplus</i> conferida pela imunização de bovinos com os antígenos recombinantes	43
5.1	Animais e procedimentos experimentais padronizados	43
5.1.1	Animais e estrutura experimental	43
5.1.2	Infestação experimental	43
5.1.3	Coleta de teleóginas e avaliação dos parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos	44
5.1.4	Determinação da eficácia vacinal	45
5.1.5	Determinação da soroconversão de IgG antígeno-específico	45
5.2	Avaliação da atividade protetora anti-carrapatos <i>R. microplus</i> e indução de resposta humoral em bovinos inoculados com oito proteínas recombinantes adjuvantadas com Montanide Gel 01 (Seppic)	46

5.2.1	Infestação com carrapatos pré-vacinação para alocação dos animais nos grupos experimentais	47
5.2.2	Preparação das formulações vacinais e imunização dos animais	48
5.2.3	Infestação-desafio dos animais experimentais com carrapatos <i>R. microplus</i>	49
5.2.4	Coleta de sangue e avaliação da soroconversão de IgG antígeno-específica	49
5.2.5	Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos após infestação-desafio	53
5.3	Proteção anti-carrapatos <i>R. microplus</i> conferida pela imunização de bovinos com nove proteínas recombinantes adjuvantadas com sais de alumínio	55
5.3.1	Infestação com carrapatos pré-vacinação e alocação dos animais nos grupos experimentais	57
5.3.2	Preparação das formulações vacinais e imunização dos animais	58
5.3.3	Infestação-desafio dos animais experimentais com carrapatos <i>R. microplus</i>	59
5.3.4	Coleta de sangue e avaliação da soroconversão de IgG antígeno-específica	59
5.3.5	Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos após infestação-desafio	61
6	Proteção anti-carrapatos <i>R. sanguineus</i> conferida pela imunização de cães com nove proteínas recombinantes adjuvantadas com hidróxido de alumínio	71
6.1	Cães e composição dos grupos experimentais	71
6.2	Preparação das formulações vacinais e imunização dos cães	72
6.3	Coleta de sangue e avaliação da soroconversão antígeno-específica dos cães vacinados	73
6.4	Infestação experimental dos cães com carrapatos <i>R. sanguineus</i>	75
7	Considerações finais e perspectivas futuras	83
	Referências	85
	Apêndice 1 - Calendários de experimentação animal	96
	Anexo 1 – Aprovações da Comissão de Ética para o Uso de Animais ..	99

1 Introdução

1.1 A importância do setor pecuário para a saúde pública humana

Os sistemas pecuários ocupam cerca de 30% da superfície terrestre livre de gelo do planeta¹. Segundo a FAO², em 2016, foram produzidas no mundo 320 milhões de toneladas de carne (43 kg *per capita*/ano), 816 milhões de toneladas de leite (110 kg *per capita*/ano) e 70 milhões de toneladas de ovos (9,4 kg *per capita*/ano), indicando o setor de produção animal como um dos principais sistemas econômicos mundiais.

Os sistemas de produção animal representam um dos setores de mais rápido crescimento na agricultura, e é reconhecido como uma grande oportunidade de investimento para a redução da pobreza mundial³. O setor pecuário é responsável pela segurança alimentar direta de cerca de 1,3 bilhão de pessoas ao redor do mundo, através da geração de empregos e pela subsistência de famílias agricultoras de baixa renda, especialmente em países da África e Ásia^{4,5}. A manutenção da saúde e produtividade de rebanhos pecuários, um dos pontos-chave definidos pela FAO para o combate à fome e desnutrição mundial⁴, é uma importante estratégia para a redução do risco de vulnerabilidade de comunidades de baixa renda. O acesso constante a alimentos de origem animal nutritivos está fortemente associado ao melhor crescimento e desenvolvimento cognitivo de crianças assim como à resistência e recuperação mais rápida de doenças, o que acaba por gerar adultos mais saudáveis e, assim, estimular o desenvolvimento e bem-estar das comunidades⁶.

A rápida expansão pecuária, no entanto, vem acompanhada de efeitos negativos sobre a população humana e o meio ambiente, dentre eles, os problemas ambientais associados ao desmatamento de áreas verdes, geração de gases estufa e a emergência de doenças zoonóticas e não zoonóticas³. As doenças infecciosas compreendem grande parte das causas de morte e morbidade global em humanos, sendo que cerca de 75% das doenças infecciosas emergentes são zoonóticas⁷. Estas doenças são veiculadas através do contato direto com animais doentes, do consumo de alimentos contaminados ou através de vetores comuns, como é o caso de mosquitos e carrapatos, que são os principais vetores de doenças para humanos⁸. Dentro do conceito de “*One Health*”, que reconhece que a saúde humana está diretamente relacionada à saúde dos animais e ao meio ambiente, a

manutenção sanitária dos rebanhos apresenta-se como essencial para diminuir a ocorrência de doenças infecciosas e parasitárias nas populações ao redor do mundo⁹. O combate às doenças não zoonóticas também é essencial para a manutenção da saúde humana, uma vez que rebanhos saudáveis são mais produtivos e resistentes às doenças, o que contribui para a segurança alimentar. Assim, iniciativas que busquem aumentar a sanidade dos rebanhos bem como a sua produtividade apresentam potencial impacto positivo sobre a saúde humana.

1.2 Infestações por carrapatos e seu impacto sobre os rebanhos bovinos

A atividade pecuária bovina é uma das mais importantes e lucrativas atividades do agronegócio mundial¹⁰, sendo representada por um rebanho de aproximadamente 1 bilhão de animais (2016)². No Brasil encontra-se o maior rebanho bovino comercial do mundo, com 218 milhões de cabeças de gado (2016)². A ocorrência de doenças infecciosas e parasitárias tem forte impacto sobre a saúde do gado bovino. No ano de 2014, foi estimada uma perda anual de aproximadamente 14 bilhões de dólares na produção bovina brasileira em decorrência de infestações parasitárias; deste total, 3,24 bilhões de dólares foram consumidos em decorrência da infestação pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*¹¹, o principal carrapato parasita de bovinos no Brasil¹² e em muitos países do mundo¹³.

Os carrapatos são artrópodes obrigatoriamente hematófagos que distribuem-se globalmente nas regiões tropicais e subtropicais e parasitam diversas espécies de vertebrados terrestres¹⁴. Apresentam grande relevância médica veterinária, uma vez que são os principais vetores de patógenos para animais domésticos e selvagens e o segundo principal vetor de doenças para humanos, ficando atrás apenas dos mosquitos^{8,15}. As infestações por *R. microplus* em bovinos estão associadas à transmissão de diversos patógenos, entre eles *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, causadores da babesiose, e *Anaplasma marginale*, causador da anaplasmoze, ambas doenças potencialmente letais¹⁵. Por sua vez, a infestação por *Rhipicephalus sanguineus* está associada à transmissão de *Ehrlichia canis*¹⁶ e *Babesia vogeli*¹⁷ para cães, seu hospedeiro preferencial. De forma importante, em regiões da Europa, África e Ásia, esta espécie de carrapato aparece associada à transmissão de microrganismos do gênero *Rickettsia*, causadores de doenças zoonóticas potencialmente letais para humanos¹⁸.

A infestação por carrapatos provoca, além da transmissão de doenças, danos diretos ao hospedeiro em decorrência da hematofagia, como a perda de sangue, irritabilidade, inflamação e hipersensibilidade no local do trauma, desenvolvimento de infecções secundárias e paralisia causada por toxinas salivares¹¹. Em animais de produção que abrigam um grande número de carrapatos, a perda sanguínea gera anemia, caquexia, reduz o ganho de peso e diminui a produção de leite, além de interferir em outros fatores produtivos, causando perdas econômicas significativas¹⁹.

1.3 Controle das infestações por carrapatos

O controle de carrapatos através da aplicação de acaricidas químicos é um método bastante difundido no mundo todo. Esta estratégia, porém, apresenta diversos pontos negativos: (1) efeito limitado sobre a redução da infestação por carrapatos; (2) geração de resíduos químicos contaminantes do meio ambiente, da carne e do leite, o que gera problemas de saúde pública; e (3) seleção de carrapatos resistentes²⁰. A resistência a múltiplos compostos acaricidas tem sido frequentemente descrita para ambos os carrapatos *R. microplus*^{21,22,23,24} e *R. sanguineus*^{25,26,27}. Os problemas associados ao uso de acaricidas e a emergência de doenças transmitidas por carrapatos, juntamente com os prejuízos econômicos e sanitários decorrentes das infestações, apontam para a necessidade de investimentos para o desenvolvimento e uso de métodos alternativos que sejam capazes de substituir os acaricidas no controle de carrapatos²⁸.

A vacinação é uma das alternativas disponíveis atualmente para o controle das infestações por carrapatos e oferece vantagens significativas sobre a utilização de acaricidas químicos, pois apresenta especificidade ao alvo, é ambientalmente segura, não promove o depósito de resíduos na carne e no leite, não gera riscos à saúde humana e animal e apresenta administração simples²⁰. Os resultados obtidos por Allen e Humphreys²⁹ em 1979, que demonstraram que a imunização de bovinos com extratos de carrapatos é capaz de afetar negativamente a alimentação dos parasitas, estimularam a proliferação de estudos em busca de vacinas anti-carrapatos. No entanto, nenhuma vacina anti-carrapatos está disponível para cães, e apenas duas vacinas para bovinos foram comercialmente desenvolvidas até hoje: TickGard™ (Hoechs Animal Health, Austrália) e Gavac™ (Heber Biotec S.A. Havana, Cuba). Ambas são produzidas a partir do antígeno Bm86, uma glicoproteína intestinal de *R. microplus*³⁰, produzida em *Pichia pastoris*. A

imunização com Bm86 promove a redução do número, peso e capacidade reprodutiva das fêmeas ingurgitadas de carrapatos, além de diminuir a prevalência de babesiose nos rebanhos bovinos vacinados^{31,32}. Em média, o nível de proteção obtido com a utilização do antígeno Bm86 é de 50%, dependendo da espécie e cepa de carrapato infestante, mas pode chegar à 90% em alguns estudos³³. O aumento do título de anticorpos IgG anti-Bm86 nos bovinos imunizados e a ocorrência de lesão intestinal em carrapatos alimentados nos animais vacinados parecem estar relacionados com a redução da infestação e da reprodução dos carrapatos^{30,31,34}.

De forma interessante, o uso do antígeno Bm86 é capaz de promover quase 100% de proteção contra a infestação de bovinos com carrapatos *R. annulatus*³⁵. Em diversos estudos, a utilização experimental de antígenos recombinantes homólogos à Bm86 e outros antígenos compartilhados entre diferentes espécies de carrapatos demonstrou que é possível induzir imunidade cruzada entre espécies, indicando ser possível o controle de diferentes espécies de carrapatos com uma única vacina^{30,36,37}.

Cabe ressaltar que as vacinas comerciais anti-carrapatos existentes apresentam limitações importantes: (1) embora sejam capazes de diminuir as aplicações de acaricidas nos rebanhos, não são capazes de eliminar por completo a utilização destes produtos³⁸; (2) a vacinação com Bm86 induz níveis de proteção variados nos rebanhos, o que pode estar relacionado à heterogeneidade da sequência da proteína Bm86 entre as diferentes cepas de *R. microplus* conforme a área geográfica³²; (3) os resultados provindos da vacinação com a Bm86 somente são observados após alguns meses do início do esquema vacinal, o que acaba por desestimular o uso do produto pelos produtores; e (4) a imunidade promovida pela vacinação com Bm86 é pouco duradora (cerca de 6 meses³³), o que leva à necessidade de revacinações frequentes, gerando custos ao produtor^{39,40}. Sendo assim, apesar de existirem vacinas anti-carrapatos comerciais, nenhuma delas parece ser realmente efetiva para o controle a campo do carrapato *R. microplus* ou para diminuir a transmissão de doenças veiculadas por eles⁴¹. Assim, é necessário investir na pesquisa de novos antígenos que possam ser utilizados em formulações vacinais mais eficazes do que as atualmente disponíveis.

1.4 A saliva dos carrapatos e a interface parasita-hospedeiro como alvo vacinal

Desde que descobriu-se que a resistência a carrapatos pode ser modulada pela imunidade adquirida⁴², diversos estudos vêm sendo realizados na busca por antígenos que possam ser utilizados como vacinas anti-carrapatos. Estes estudos focam em dois tipos de antígenos: ocultos e expostos.

Os antígenos ocultos referem-se a proteínas que não são expostas ao sistema imunológico do hospedeiro durante o repasto sanguíneo, a exemplo da proteína Bm86. Diversos antígenos ocultos têm sido testados com resultados de proteção variáveis, como a subolesina⁴³ e aquaporina⁴⁴. No entanto, este tipo de antígeno não é capaz de reestimular a resposta imunológica por rotas não-vacinais, o que leva à necessidade de revacinações frequentes para a manutenção dos anticorpos circulantes⁴⁵.

Os antígenos expostos, por sua vez, são aqueles que naturalmente entram em contato com o hospedeiro durante o processo de hematofagia, a exemplo dos antígenos secretados. São capazes de reestimular o sistema imunológico do hospedeiro durante o processo de alimentação do carrapato, levando ao refinamento da memória imunológica. No entanto, estes antígenos comumente fazem parte de famílias de proteínas secretadas com sequências muito similares entre si e funções redundantes, o que pode dificultar a seleção dos antígenos a serem testados⁴⁵.

Para se alimentar, os carrapatos promovem a laceração da pele e dos vasos sanguíneos cutâneos do hospedeiro através de suas peças bucais, formando uma cavidade de alimentação na qual secreta sua saliva constantemente^{46,47}. A saliva dos carrapatos contém inúmeras moléculas bioativas que são responsáveis por possibilitar o parasitismo: vasodilatadores, imunossupressores, anti-inflamatórios, ligantes de histamina e de imunoglobulinas, inibidores de trombina e da agregação plaquetária, ligantes de quimiocinas, inibidores do sistema complemento, inativadores de bradicinina e anafilotoxina, moléculas de fixação, metaloproteases, entre outras^{48,49,50}. Essas moléculas são essenciais para que as respostas imunológicas e de cicatrização tecidual do hospedeiro sejam suficientemente inativadas e permitam a alimentação prolongada dos carrapatos.

Durante a infestação, algumas espécies de hospedeiros conseguem montar uma resposta imune que inativa ou sobrepõe a função das moléculas salivares do carrapato, o que acaba por interromper a refeição sanguínea e a fixação dos parasitas à pele, com consequente comprometimento do sucesso biológico e

reprodutivo dos mesmos. Respostas eficientes contra o carrapato já foram descritas em diferentes hospedeiros e estão associadas à produção de anticorpos contra as proteínas salivares⁵¹, produção de citocinas e quimiocinas de perfil Th1^{52,53}, proteínas de fase aguda⁵⁴ e desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade cutânea tardia^{55,56}. No entanto, os carrapatos são capazes de se alimentarem com sucesso em uma extensa gama de hospedeiros, indicando que, ao menos para estes, os componentes de saliva não são suficientemente imunogênicos para induzir uma resposta protetora⁵⁷. De forma interessante, alguns antígenos salivares que não induziram resposta imune quando inoculados durante a hematofagia (antígenos silenciosos) são eficientes em induzir resposta protetora contra uma infestação desafio por carrapatos quando administrados como vacinas⁵⁸, demonstrando que antígenos salivares, mesmo silenciosos, apresentam potencial como alvos vacinais.

1.5 O uso da vacinologia reversa para a descoberta de antígenos secretados por carrapatos

Por muitos anos, o desenvolvimento de vacinas foi realizado seguindo-se a sistemática estabelecida por Louis Pasteur em 1880: isolar, inativar e injetar o agente patogênico. Esta estratégia de sucesso foi aplicada para o desenvolvimento de inúmeras vacinas inativadas, atenuadas e de subunidade extensamente utilizadas até os dias atuais. No entanto, estes princípios podem não apresentar sucesso quando aplicados ao desenvolvimento de vacinas contra organismos não cultiváveis em laboratório, com alta variabilidade antigênica ou com antígenos pouco imunogênicos⁵⁹. Com a introdução das tecnologias de sequenciamento de genomas⁶⁰, tornou-se possível a identificação *in silico* de proteínas componentes de agentes patogênicos sem a necessidade de seu isolamento e cultivo; com isso, o desenvolvimento de vacinas passou a ser realizado não mais a partir do cultivo de agentes isolados, mas das informações individuais obtidas do genoma, transcriptoma ou proteoma do mesmo. Esse abordagem é denominada vacinologia reversa⁶¹.

Estudos “ômicos” tem sido conduzidos em diferentes espécies de carrapatos visando identificar os fatores envolvidos nas interações carrapato-hospedeiro e selecionar possíveis antígenos vacinais⁴⁵. Informações sobre os genes transcritos na glândula salivar de carrapatos podem ser obtidas a partir de técnicas de hibridização

em microarranjo e do sequenciamento de bibliotecas de cDNA e de RNA utilizando plataformas de nova geração^{45,62}.

Visando a identificação de antígenos para o desenvolvimento de vacinas anti-carrapatos, nosso grupo de pesquisa analisou os transcritos de carrapatos *R. microplus* em diferentes estágios, alimentados em hospedeiros bovinos resistentes (raça Nelore) ou suscetíveis (raça Holandês). Maruyama e colaboradores⁶³ identificaram os transcritos expressos em larvas não alimentadas e em glândulas salivares isoladas de machos, fêmeas e ninfas que parasitavam bovinos resistentes e suscetíveis, tendo identificado 3.342 *contigs* únicos, empregando sequenciamento Sanger de bibliotecas de cDNA. Dentre as proteínas identificadas, quatro foram selecionadas para serem testadas como antígenos vacinais, considerando-se informações sobre a presença de peptídeo sinal, provável função biológica e nível de expressão. Os antígenos produzidos de forma recombinante foram utilizados para imunizar bovinos posteriormente infestados com carrapatos *R. microplus*; a avaliação dos parâmetros produtivos e reprodutivos dos carrapatos provenientes da infestação indicaram uma eficácia vacinal de 72% para a composição. Anatriello⁶⁴, por sua vez, identificou sequências codificantes de 14 antígenos de *R. microplus* que apresentaram homologia *in silico* com proteínas de carrapatos *R. sanguineus*, e estas foram testadas como vacinas de DNA em camundongos (individualmente) e cães (vacina multicomponente) posteriormente infestados por *R. sanguineus*. Diversos parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos se mostraram alterados nos grupos de animais vacinados, apontando a eficácia da imunização e demonstrando que proteínas específicas de *R. microplus* podem induzir imunidade cruzada contra *R. sanguineus*, possibilitando o desenvolvimento de uma vacina anti-carrapatos comum para bovinos e cães.

Mais recentemente, Garcia⁶⁵ realizou a identificação dos transcritos expressos em larvas não alimentadas e na glândula salivar isolada de machos, fêmeas e ninfas alimentados em bovinos resistentes e suscetíveis através de pirosequenciamento (plataforma 454), o que resultou na identificação de 11.676 sequências únicas codificantes de proteínas. Dentre as sequências obtidas em ambos os trabalhos de sequenciamento, 80 foram selecionadas para patenteamento e exploração como possíveis alvos vacinais. Para a seleção das sequências a serem patenteadas, foram considerados os seguintes parâmetros: (1) presença de peptídeo sinal, indicando alvo secretado – parâmetro obrigatório; (2) função biológica predita *in*

silico^a associada ao parasitismo – alimentação do carrapato ou evasão do sistema imunológico do hospedeiro; (3) expressão gênica diferencial entre as fases do carrapato ou hospedeiros; (4) sequência semelhante às demais proteínas de seu grupo com a mesma função predita, buscando-se antígenos com maior cobertura da redundância de moléculas; e (5) antigênica predita *in silico* superior às demais sequências da mesma classe. Os resultados de proteção e indução de resposta imunológica obtidos nas provas de conceito já descritas também foram considerados. Essas sequências foram patenteadas junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial sob o número BR102013030662-2⁶⁶, em parceria com o National Institutes of Health, Bethesda (EUA) visando o desenvolvimento de vacinas recombinantes anti-carrapatos.

A interação carrapato-hospedeiro mediada pela saliva é bastante complexa. Há um grande número de proteínas secretas na saliva do carrapato responsáveis por diferentes funções na alimentação, e muitas apresentam atividades redundantes. Assim, sugere-se que a capacidade de uma vacina anti-carrapatos em neutralizar as funções salivares a ponto de comprometer a alimentação do parasita seja dependente de uma resposta multigênica^{67,68,69}. Vacinas multi-componentes anti-carrapatos já têm sido estudadas⁶⁸; e esta abordagem tem sido testada com sucesso para doenças como malária^{70,71}, tuberculose⁷², meningite meningocócica⁷³, entre outras. A utilização de diferentes antígenos em uma mesma formulação vacinal pode ser importante para diminuir a falha vacinal associada à restrição genética do hospedeiro e aos mecanismos de escape do parasito, tal como a redundância funcional de moléculas, já descrita para proteínas encontradas na saliva de carrapatos. É possível que, se juntarmos diversos alvos em uma única vacina, consigamos promover níveis superiores de proteção contra a infestação do que o obtido com a vacinação com cada alvo separadamente.

Este trabalho teve por objetivo identificar e testar alvos vacinais de carrapatos *R. microplus* em busca de antígenos protetores anti-carrapatos. Nós selecionamos, dentre as sequências já patenteadas, novos antígenos secretados de carrapatos *R. microplus* que apresentam potencial vacinale os produzimos de forma recombinante em *Escherichia coli*. As proteínas recombinantes foram utilizadas para a imunização de bovinos desafiados com carrapatos *R. microplus*, a fim de determinar a atividade

^a O processo de predição da função biológica foi realizado por Garcia⁶⁵ (manuscrito em preparação) considerando-se o alinhamento de sequências com 13 diferentes bases de dados de sequências

protetora dos antígenos contra a infestação por esta espécie. Ainda, os mesmos antígenos foram utilizados para imunizar cães desafiados com carrapatos *R. sanguineus*, a fim de verificar se nossos antígenos são capazes de induzir uma resposta cruzada protetora contra o carrapato do cão. Os antígenos protetores em ambos os experimentos poderão ser empregados como base para o desenvolvimento de uma vacina recombinante multicomponente anti-carrapatos comum para bovinos e cães.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia vacinal da imunização multicomponente de bovinos e cães com antígenos secretados de carrapatos *R. microplus* contra infestações experimentais por carrapatos *R. microplus* e *R. sanguineus*, visando o desenvolvimento de uma vacina anti-carrapatos comum para bovinos e cães.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar potenciais antígenos vacinais anti-carrapatos a partir de um grupo de sequências secretadas de carrapatos *R. microplus* já patenteadas por nosso grupo para o desenvolvimento de vacinas.
- Expressar e purificar os antígenos candidatos na forma de proteína recombinante utilizando *Escherichia coli* como sistema heterólogo de expressão.
- Imunizar bovinos e cães com os antígenos recombinantes adjuvantados.
- Infestar experimentalmente os bovinos imunizados com carrapatos *R. microplus*, bem como infestar os cães imunizados com carrapatos *R. sanguineus*, a fim de avaliar a proteção vacinal induzida pelos antígenos recombinantes contra as infestações por carrapatos do boi e do cão.
- Avaliar a soroconversão (IgG específica) para os antígenos recombinantes nos bovinos e cães imunizados através de ELISA.

3 Seleção dos antígenos secretados de carrapatos *R. microplus* para produção recombinante e teste de eficácia vacinal anti-carrapatos

Dentre as 80 sequências já patenteadas por nosso grupo⁶⁶, nós selecionamos as sequências que seriam utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, as proteínas foram agrupadas de acordo com a sua função predita *in silico*, e buscou-se selecionar ao menos uma proteína de cada grupo funcional, a fim de cobrir o maior número de funções possíveis. Os grupos funcionais foram definidos ainda na fase de seleção dos antígenos para patenteamento por serem possivelmente essenciais à alimentação do carrapato e evasão do sistema imunológico do hospedeiro.

Para definir quais proteínas seriam utilizadas a partir de cada grupo funcional, foram considerados os seguintes fatores: (1) nível de expressão gênica, visto que proteínas mais expressas devem estar mais ativas no processo de alimentação; (2) expressão gênica para as diferentes fases do carrapato (adultos, larvas ou ninfas), a fim de selecionar ao menos um antígeno de cada fase; (3) presença de resultados preliminares de proteção e indução de resposta imunológica humoral^{63,64}; (4) antigenicidade predita *in silico* utilizando-se ranqueamento combinado pela ferramentas TEPITOPE e BebiPred⁶³, tendo sido selecionadas as sequências com ranqueamento de antigenicidade mais alto dentro de seu grupo funcional. Por fim, nós selecionamos 18 antígenos, dentre os quais seis já foram avaliados de forma preliminar por nosso grupo como vacinas recombinantes anti-carrapatos em bovinos⁶³ e/ou cães⁶⁴, e 12 serão abordados pela primeira vez ao longo deste trabalho. A identificação dos antígenos selecionados e outros parâmetros do mesmo estão apresentados na tabela 1 e uma breve discussão sobre os antígenos selecionados pode ser encontrada a seguir.

Proteínas de fixação/cimento

Proteínas de fixação, também chamadas cimento, são secretadas por carrapatos para promover a fixação de suas peças bucais firmemente à pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo, e estão presente nas espécies e fases do ciclo de carrapatos em que a alimentação ocorre por períodos prolongados⁷⁴. Assim como outros antígenos salivares, as proteínas de cimento são reconhecidas por células de Langerhans presentes na pele do hospedeiro⁷⁵, estando ao alcance dos efeitos

do sistema imunológico. Proteínas de cimento tem sido utilizadas como vacinas contra diferentes espécies de carrapatos com resultados positivos, induzindo forte resposta humoral e resposta de hipersensibilidade tardia, possivelmente relacionadas ao efeito protetor^{36,76,77,78}. Quando testada na forma de vacina de DNA em camundongos, o antígeno 40-CEM foi capaz de afetar negativamente a infestação. Assim, respostas induzidas pela vacinação com os antígenos 40-CEM e 244-CEM podem auxiliar na proteção vacinal de bovinos por prejudicarem o processo de fixação dos carrapatos para alimentação. Ainda, a reatividade cruzada de anticorpos anti-cimento tem sido descritas para proteínas do intestino de carrapatos^{36,77}, indicando um segundo mecanismo pelo quais as proteínas selecionadas podem ser efetivas contra carrapatos.

Metaloproteases

As metaloproteases compreendem um grande grupo de proteínas com funções diversas, com atividades sobre a diferenciação e remodelamento da matriz extracelular, angiogênese, migração e proliferação celular⁷⁹. Em carrapatos, já estão descritas metaloproteases com atividades anti-fibrinolíticas e anti-fibrinogênicas⁸⁰, inibidoras da angiogênese⁸¹ e inibidoras da aderência de leucócitos⁸². O silenciamento gênico de metaloproteases de *Ixodes ricinus* descrito por Decrem e colaboradores⁸³ foi capaz de afetar negativamente a atividade fibrinolítica da glândula salivar dos carrapatos silenciados. Ainda, a imunização de coelhos com a metaloprotease recombinante promoveu diminuição da capacidade de alimentação e ovoposição das fêmeas de carrapatos. De forma semelhante, Ali e colaboradores⁸⁴ demonstraram que o uso de metaloproteases recombinantes de *R. microplus* protege parcialmente os bovinos imunizados. A sequência da proteínas 239-MTL já foi utilizada como vacina de subunidade⁶³ e DNA⁶⁴ recombinante, tendo induzido resposta imune humoral e afetado negativamente os parâmetros da infestação por carrapatos *R. microplus* e *R. sanguineus*. O possível envolvimento das metaloproteases 663-MTL e 239-MTL no processo de alimentação dos carrapatos, em conjunto com os resultados anteriormente obtidos, indicam que estes antígenos são interessantes candidatos à composição de uma vacina anti-carrapatos.

Tabela 1. Antígenos de carrapatos selecionados como alvos vacinais.

	Identificação		Função biológica putativa	Peso molecular (kDa)*	Fases de vida do carrapato em que se detecta expressão da proteína ⁶⁵	Já testado?
	Maruyama <i>et al</i> ⁶³	Garcia ⁶⁵				
Base de dados						
40-CEM	RMallHxN-contig_40	Rm-nr-5791	Cemento/Fixação	18,5	Larva, ninfa, macho (+) e fêmea	Cão
76-IgBP	RMallHxN-contig_76	Rm-nr-25946	Proteína tipo C ligante de imunoglobulina	17,4	Larva, macho (+)	Cão, bovino
197-TSP	RMallHxN-contig_197	Rm-nr-27468	Serina protease semelhante à tripsina	32,9	Macho (+), fêmea	Não
218-Ag5	RMallHxN-contig_218	Rm-tb2-19257	Antígeno 5/endopeptidase	25,5	Larva, ninfa, macho (+) e fêmea	Não
239-MTL	RMallHxN-contig_239	Rm-nr-103593	Metaloprotease	56,6	Macho	Cão, bovino
244-CEM	RMallHxN-contig_244	Rm-nr-39496	Cemento/Fixação	15,5	Larva, macho (+)	Não
274-HBP	RMallHxN-contig_274	Rm-nr-121614	Proteína ligante de histamina/lipocalina	23,2	Ninfa, macho e fêmea (+)	Cão
663-MTL	RMallHxN-contig_663	Rm-nr-173063	Metaloprotease	36,6	Ninfa e fêmea (+)	Não
795-DEF	RMallHxN-contig_795	Rm-nr-172282	Defensina	13,1	Ninfa e fêmea	Não
1735-CPI	RMallHxN-contig_1735	Rm-nr-78235	Inibidor de carboxipeptidase	11,2	Larva, ninfa, macho (+) e fêmea	Não
1756-PI	RMallHxN-contig_1756	Rm-nr_47714	Inibidor de protease - domínio Kunitz (bilaris)	18,0	Macho	Cão
1786-PI	RMallHxN-contig_1786	Rm-tb2-28253	Inibidor de protease - domínio Kunitz (monolaris)	20,2	Macho	Não
2067-NEI	RMallHxN-contig_2067	Rm-nr-117512	Inibidor de elastase de neutrófilo	11,4	Ninfa (+), macho e fêmea	Não
2712-DNAse	RMallHxN-contig_2712	Bm-nr-118610	Desoxirribonuclease II	39,5	Ninfa, macho e fêmea (+)	Não
2879-MLD	RMallHxN-contig_2879	Rm-nr-102870	Proteína putativa contendo domínio ML	16,5	Ninfa, macho (+) e fêmea	Cão
61864-SalpL		Rm-nr-61864	Proteína putativa semelhante à SALP-15	23,3	Larva, ninfa (+), macho e fêmea	Não
173030-F8.9		Rm-tb2-173030	Proteína putativa da família 8.9 kDa	8,5	Ninfa e fêmea (+)	Não
264079-EVA		Rm-nr-264979	Evasina	12,1	Ninfa, macho (+) e fêmea	Não

* Predito utilizando-se ExPASy ProtParam, disponível em <https://web.expasy.org/protparam/> ; (+) fase em que a proteína encontra-se mais expressa

Proteínas ligantes de imunoglobulinas

Durante o repasto sanguíneo, parte das proteínas ingeridas pelo carrapato não é imediatamente digerida, mas transportada do intestino para a hemolinfa. Esse mecanismo é observado para o processamento das imunoglobulinas do hospedeiro, e tem sido sugerido que este possa ser o mecanismo pelo qual anticorpos contra antígenos ocultos (em órgãos como ovários, por exemplo) podem chegar aos seus alvos⁸⁵. No entanto, uma vez na hemolinfa, as imunoglobulinas do hospedeiro são capturadas por proteínas do carrapato ligantes de imunoglobulinas (*immunoglobulin binding protein*, IgBP). De forma interessante, os carrapatos são capazes de regurgitar este complexo imunoglobulina:IgBP de volta para o hospedeiro pela saliva, eliminando as imunoglobulinas de seus tecidos⁸⁶. Devido à sua atividade biológica, a neutralização da atividade das IgBPs pode ser uma interessante forma de se prejudicar a infestação por carrapatos⁸⁷. Quando utilizada como antígeno vacinal em bovinos, a proteína 76-IgBP foi capaz de induzir anticorpos específicos e, em associação com outros antígenos, prejudicar a infestação de carrapatos *R. microplus*. Resultado semelhante foi observado quando camundongos foram imunizados com DNA recombinante e posteriormente infestados com *R. sanguineus*. Esta proteína pode, ainda, apresentar outras atividades inibitórias sobre o sistema imune do hospedeiro, como já demonstrado por Zangirolamo⁸⁸, e por isso a neutralização de proteínas ligantes de imunoglobulinas do carrapato com a indução de anticorpos de alta afinidade pode aumentar a efetividade das respostas do hospedeiro contra o carrapato.

Lipocalinas

As lipocalinas são proteínas largamente expressas na saliva de diversos carrapatos e estão associadas à captura de moléculas pequenas⁸⁹. Lipocalinas de *Dermacentor reticulatus* são capazes de sequestrar histamina e serotonina⁹⁰, enquanto que lipocalinas ligantes de histamina foram descritas em *Rhipicephalus appendiculatus*⁹¹. A histamina é um dos principais mediadores inflamatórios secretados por basófilos e mastócitos em resposta a estímulos inflamatórios e orchestra, em parte, o desenvolvimento da resposta imunológica inata⁸⁹. O bloqueio das atividades mediadas pela histamina pode ser um dos mecanismos utilizados pelo carrapato para evadir a resposta imune do hospedeiro, tornando as lipocalinas interessantes alvos vacinais. A imunização de camundongos com uma lipocalina

recombinante de *Ixodes persulcatus* promoveu atraso no período de ingurgitamento de fêmeas bem como redução do peso final de ingurgitamento⁹². De forma semelhante, a imunização de camundongos com DNA recombinante para a proteína 274-HBP – que apresenta em sua estrutura um domínio de ligação à histamina – foi capaz proteger camundongos da infestação por *R. sanguineus*⁶⁴. Ainda, proteínas da família das lipocalinas também aparecem associadas à inibição do complemento⁹³ e de fatores pró-inflamatórios como aminas bioativas, leucotrienos e tromboxanos⁹⁴, indicando que sua neutralização pode favorecer a resposta protetora do hospedeiro contra o carrapato.

Antígeno 5

Proteínas pertencentes à superfamília CAP (*cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, e pathogenesis-related 1 proteins*) estão abundantemente presentes na saliva de diversos organismos, incluindo artrópodes hematófagos, como mosquitos e carrapatos, e animais venenosos, como vespas⁹⁵. Proteínas da superfamília CAP de *Dipetalogaster maxima* e *Triatoma infestans* apresentam atividade inibidora da agregação plaquetária e da atividade oxidativas de neutrófilos⁹⁶. Em plantas, proteínas desta família apresentam atividade antimicrobiana⁹⁷. As atividades anti-hemostáticas, imunossupressoras e antibacterianas promovidas por estas proteínas em outras espécies indica que este pode ser um mecanismo conservado que pode contribuir para o sucesso da infestação por carrapatos, tornando a proteína 218-Ag5 um potencial alvo vacinal.

Proteínas do sistema inato de defesa do carrapato – domínio ML e defensinas

Os domínios ML são estruturas presentes em proteínas envolvidas na modulação de diversas respostas biológicas através da interação com lipídeos, como reconhecimento de lipídeos da parede celular de microrganismos e participação nas rotas do metabolismo de lipídeos⁹⁸. Embora a função destas proteínas na saliva de carrapatos não tenha sido estudada, outros artrópodes utilizam-se de proteínas com domínio ML para o reconhecimento de fungos e bactérias⁹⁹, sugerindo que esta molécula possa estar associada ao desenvolvimento de uma resposta imune contra patógenos também em carrapatos. A imunização de camundongos com DNA recombinante da proteína 2879-MLD foi capaz de prejudicar a infestação por carrapatos *R. sanguineus*⁶⁴. Outra molécula

potencialmente associada ao sistema imune inato dos carrapatos é a defensina 795-DEF. Assim como outros organismos, carrapatos apresentam uma extensa gama de moléculas antimicrobianas capazes de manter microrganismos comensais e patogênicos em níveis que não comprometam a sua própria performance¹⁰⁰. Defensinas e moléculas relacionadas foram descritas nas glândulas salivares, intestino e hemolinfa de diferentes espécies de carrapatos e exercem atividades imunes inatas sobre a proliferação bacteriana^{101,102,103}. A neutralização das funções inatas de resposta dos carrapatos a possíveis patógenos configura uma estratégia de vacinação que será abordada neste trabalho.

Proteínas imunossupressoras da família SALP-15

A proteína SALP-15 foi identificada na saliva de carrapatos de *Ixodes scapularis*, sendo secretada durante a alimentação. Esta proteína é capaz de suprimir a secreção de IL-2 *in vitro* e inibindo da ativação de linfócitos auxiliares, com consequente inibição do desenvolvimento de respostas T CD4-dependentes, como ativação de linfócitos efetores¹⁰⁴. Esta proteína também apresenta a capacidade de se ligar a patógenos transmitidos por carrapatos e protegê-los da ação de anticorpos do hospedeiro, favorecendo a sua transmissão¹⁰⁵. Estudos tem demonstrado que esta proteína apresenta sequência conservada entre diferentes espécies de carrapatos^{106,107}, sugerindo um mecanismo imunossupressor comum que poderia ser utilizado como alvo vacinal para combater as infestações por carrapatos.

Evasinas

O influxo de leucócitos é um processo imune que se estabelece logo após o início da infestação por carrapatos, e é mediado pela liberação de quimiocinas. O processo de migração celular é inibido por moléculas presentes na saliva do carrapato, chamadas evasinas, que se ligam quimiocinas pró-inflamatórias, impedindo a sua sinalização^{51,108}. O uso de evasinas de carrapatos como antígenos vacinais será abordado neste trabalho.

Endonucleases

Ribonucleases e desoxirribonucleases são enzimas envolvidas na hidrólise de nucleotídeos e catálise de reações de degradação do RNA e DNA. A secreção

destas moléculas na saliva tem sido descrita para vários artrópodes^{49,109} e embora seu efeito sobre o parasitismo de carrapatos não tenha sido avaliado, é possível que a atividade destas proteínas esteja relacionada à remoção do DNA do hospedeiro liberado durante o processo de laceração cutânea e de vasos sanguíneos, bem como inibição de NETs (*neutrophil elastase traps*), favorecendo o estabelecimento da infestação.

Proteínas inibidoras de proteases

Serina proteases são enzimas proteolíticas caracterizadas pela presença de uma serina em seu núcleo catalítico; cerca de um terço de todas as enzimas proteolíticas presentes nos organismos pertencem à classe das serina proteases, e estão envolvidas nos mais distintos processos fisiológicos como digestão, coagulação sanguínea, fibrinólise, fertilização, apoptose e imunidade¹¹⁰. Proteínas inibidoras da função de serina proteases específicas já foram descritas para carrapatos e estão comumente associadas a inibição de processos imunológicos e da coagulação sanguínea.

A elastase neutrofílica é uma serina protease armazenada no interior de grânulos azurófilos de neutrófilos e é mobilizada quando os neutrófilos são ativados¹¹¹. Participa em diversos processos pró-inflamatórios¹¹², além de apresentar atividade antibacteriana^{113,114}. A produção de proteínas inibidoras da elastase de neutrófilos já foi descrita para alguns patógenos¹¹⁵, e representa um conhecido mecanismo de escape de parasitas do sistema imune do hospedeiro que pode ser alvo de vacinas anti-carrapatos.

Proteínas envolvidas em processos hemostáticos também estão presentes na saliva de carrapatos. Inibidores contendo domínios Kunitz estão caracterizados como inibidores de uma grande gama de serina proteases¹¹⁶ e sua atividade anticoagulante e vasodilatadora já está bem descrita^{117,118,119}. Especificamente, a proteína *ornithodorin* de *Ornithodoros moubata* apresenta dois domínios Kunitz que se ligam à trombina bovina¹²⁰, assim como a proteína *boophilin* identificada na saliva de *R. microplus*¹²¹. Análise comparativa entre proteínas inibidoras de serina proteases com domínio Kunitz expressas em carrapatos Argasidae e Ixodidae demonstram que estes inibidores não são filogeneticamente relacionados; ao invés disso, evoluíram distintamente nos dois tipos de carrapato a fim de promover atividades anti-hemostáticas com mecanismos distintos de ligação à trombina e

outros fatores de coagulação¹²². Inibidores de carboxipeptidases também são descritos em carrapatos e foram relacionados ao estímulo da fibrinólise, também afetando as vias hemostáticas do hospedeiro¹²³. Estes dados indicam que proteínas envolvidas na inibição da coagulação exercem papel essencial para a alimentação do carrapato, servindo como um potencial alvo para vacinas.

Serina proteases semelhantes à tripsina

Estas proteínas tem sido descritas na saliva de diversos carrapatos e afetam processos hemostáticos pela indução de fibrinólise^{109,122} e, de forma semelhante às enzimas inibidoras da cascata de coagulação, podem representar úteis alvos vacinais anti-carrapatos.

Proteínas da família 8.9 kDa

Proteínas desta família são encontrados em diversos organismos, mas em carrapatos foram identificadas exclusivamente nos carrapatos *Ixodidae*¹⁰⁹. Embora a função destas proteínas seja desconhecida, especificamente, a proteína 173030-F8.9 apresenta em sua estrutura um domínio único do tipo Von Willebrand tipo C, e estruturas semelhantes são expressas em *Drosophila melanogaster* quando expostas a infecções bacterianas e virais, assim como quando submetidas à limitação nutricional, sugerindo possível atividade imunológica inata destas proteínas¹²⁴.

Para a maioria das proteínas selecionadas neste trabalho, a expressão preferencial ocorria na glândula salivar de machos, sendo algumas exclusivas deste tecido. De forma interessante, Garcia demonstrou que os transcritos classificados como proteínas expressas foram mais abundantemente encontrados na glândula salivar de carrapatos machos do que nas outras fases, especialmente aqueles referentes à peptídeos antimicrobianos, imunossupressores, anti-inflamatórios e anti-hemostáticos⁶⁵. Wang e colaboradores demonstraram que *R. appendiculatus* fêmeas tem sua ingurgitação prejudicada quando alimentadas na companhia de machos em modelos animais imunizados com IgBPs. Como nesta espécie de carrapato as proteínas IgBPs são exclusivas de machos, sugere-se que, de alguma forma, a saliva dos carrapatos machos é responsável, ao menos em parte, pelo sucesso de alimentação das fêmeas¹²⁵. O fato de carrapatos machos apresentarem grande

expressão de proteínas relacionadas à alimentação e evasão da resposta imune do hospedeiro apesar de realizarem alimentação rápida sugere que o bloqueio da atividade salivar de carrapatos machos pode ser uma interessante estratégia para prejudicar a alimentação das fêmeas.

4. Produção recombinantes dos antígenos secretados de *R. microplus*

Para obter as proteínas a serem avaliadas como antígenos vacinais, nós optamos por realizar a produção das mesmas através de sistemas de expressão recombinante. Especificamente, nós escolhemos *E. coli* como organismo de expressão, um dos principais sistemas utilizados na produção de proteínas recombinantes, devido a diversos fatores¹²⁶: (1) a bactéria apresenta uma cinética de crescimento rápido, permitindo a amplificação rápida do material de interesse e obtenção de resultados preliminares em curto prazo quando comparado a outros sistemas; (2) pode ser cultivada em altas densidades em condições específicas sem prejuízo para o seu metabolismo, produzindo grandes quantidades de proteína em um menor espaço físico; (3) o meio de cultivo necessário para seu crescimento ideal pode ser produzido a partir de componentes de baixo custo e facilmente disponíveis, o que torna a produção em *E. coli* mais barata que outros sistemas; (4) a transformação bacteriana para inserção de DNA plasmideal exógeno é um processo rápido e fácil, tornando esse sistema adequado para a expressão de diferentes proteínas em um mesmo mecanismo; (5) grande disponibilidade de plasmídeos e cepas para a expressão otimizada de proteínas de interesse. Considerando estes fatores, o uso de *E. coli* para expressão nos permite, com relativo baixo custo, otimizar a expressão de diferentes antígenos no mesmo sistema de expressão, o que é importante quando se objetiva a produção de diversos antígenos concomitantemente. Ainda, nós optamos por adicionar à nossa construção uma cauda de seis histidinas (6xHisTag) para permitir a purificação por afinidade à metais, a fim de tornar o processo de purificação mais simples e permitir a obtenção de proteínas com adequado grau de pureza.

Para tal, nós realizamos a síntese dos plasmídeos recombinantes de expressão em *E. coli* para 17 alvos escolhidos (um dos alvos já se encontrava clonado). Como estratégia, nós buscamos definir protocolos padrão de produção que pudessem ser utilizados para os diferentes alvos. Quando os protocolos iniciais não foram aplicados com sucesso para a produção de alvos específicos, alguns procedimentos de otimização foram aplicados, e embora apenas alguns resultados sejam apresentados, eles estarão citados ao longo deste trabalho.

4.1 Delineamento, síntese e propagação dos plasmídeos

Para a construção dos plasmídeos para expressão dos antígenos recombinantes em *Escherichia coli*, as sequências de aminoácidos das proteínas deste estudo (que foram obtidas por análise transcriptômica) foram submetidas à análise *in silico* para identificação das regiões de peptídeo sinal utilizando-se o servidor online da ferramenta SignalP 4.1^b. Em seguida essas regiões foram retiradas, uma vez que, *in vivo*, estas sequências são clivadas e não entram em contato com o hospedeiro, não sendo necessária a indução de resposta imunológica contra as mesmas. Em seguida, as sequências de aminoácidos das proteínas foram encaminhadas para serviço terceirizado (GenScript) para a construção dos genes sintéticos e clonagem em vetor de expressão. Para a construção dos genes, foi aplicado algoritmo proprietário para otimização dos códons de expressão em *E. coli* e inserção de regiões flanqueadoras para clonagem. Os genes sintéticos foram então clonados em vetor de expressão pET28a(+), digerido com as enzimas de restrição BamHI e NdeI, gerando configuração de inserção de 6xHisTag na porção n-terminal da sequência e a presença de um sítio de clivagem por trombina entre a porção 6xHisTag e a sequência da proteína de interesse. Apenas a proteína 239-MTL, que foi previamente clonada por Maruyama e colaboradores⁶³, foi inserida em vetor pET100D-TOPO, que também codifica uma cauda de seis histidinas junto à porção n-terminal da proteína. A sequência desta proteína foi modificada para produção truncada, conforme previamente descrito por Maruyama⁶³.

Os plasmídeos liofilizados foram ressuspensos em água ultrapura, conforme orientações do fabricante e foram propagados em *E. coli* TOP10 (Thermo Fisher) para amplificação. Para isso, *E. coli* TOP10 foi cultivada em meio Luria Bertani (LB) ágar através de esgotamento e cultivada à 37°C/16 h, a fim de se obter colônias isoladas para a transformação bacteriana. Para a transformação por choque térmico, uma colônia isolada da cepa foi adicionada a 100 µL de solução de CaCl₂ 100 mM a 4°C contendo 1 µL do plasmídeo de expressão (sem prévia quantificação). O choque térmico foi realizado por incubação em gelo por 15 min, seguida de incubação em banho-maria a 42°C por 1 minuto e nova incubação em gelo por dois minutos. Imediatamente após, foi adicionado 500 µL de meio de cultivo LB caldo e o material foi submetido à incubação em agitação orbital 200 rpm/37 °C.

^b Disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

Após 1 h, o material foi utilizado para inocular 10 mL de meio LB caldo contendo o antibiótico marcador de seleção dos plasmídeos, canamicina (pET28a(+), 50 µg/mL) ou ampicilina (pET100, 100 µg/mL) e cultivado em agitação orbital (200 rpm/37 °C) por 16 h. O cultivo obtido foi utilizado para extração dos plasmídeos propagados utilizando-se *illustra plasmidPrep Spin Kit* (GE Life Sciences) seguindo-se as recomendações do fabricante. Os plasmídeos purificados foram armazenados à -20°C até o uso.

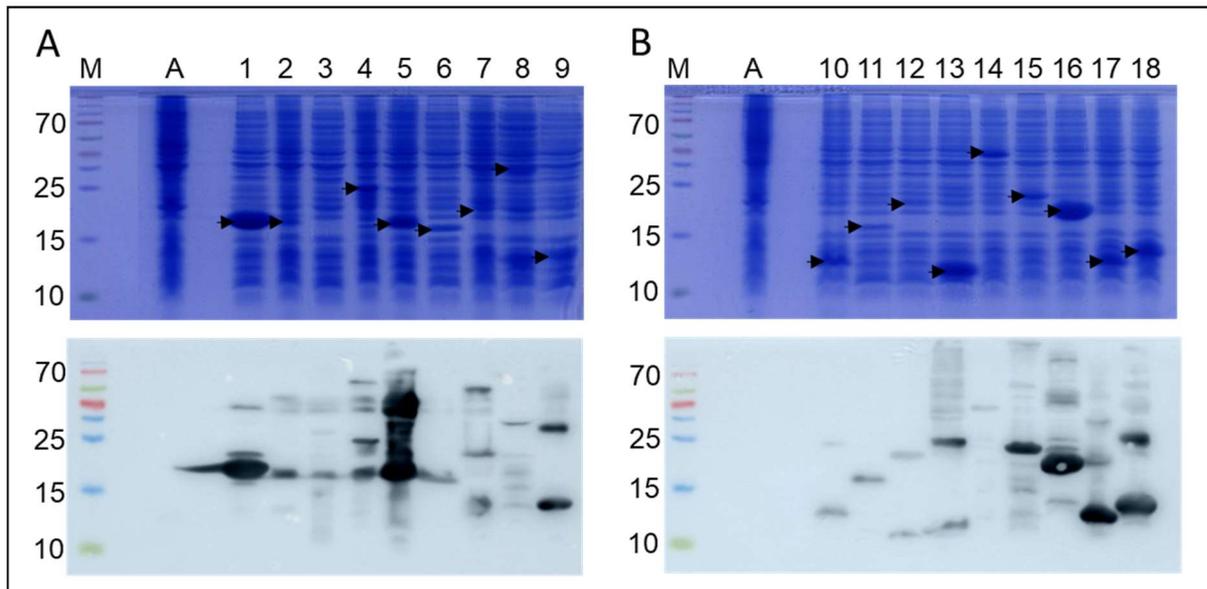
4.2 Determinação da expressão dos antígenos recombinantes em *E. coli* através de cultivo em pequena escala

Inicialmente, realizamos um teste de expressão em pequena escala para padronizar as condições de expressão das proteínas em *E. coli* Rosetta (DE3). A cepa foi transformada por choque térmico (conforme já descrito) utilizando-se os plasmídeos de expressão, adicionando-se o antibiótico marcador de seleção da cepa, cloranfenicol (50 µg/mL). O material expandido foi utilizado como pré-inóculo do teste de expressão. Para a fase efetiva de indução, 0,1 mL do pré-inóculo foi utilizado para a inoculação de 10 mL de meio LB (adicionado dos antibióticos de seleção da bactéria e do plasmídeo). O material foi incubado em tubo cônico de 50 mL, em agitação orbital a 200 rpm/37°C. O crescimento bacteriano foi acompanhado por espectrofotometria (A_{600nm}) até que atingisse densidade óptica entre 0,6 e 0,8, quando foi realizada a indução da expressão de proteína com *isopropyl β-1-D* thyogalactopyranoside (IPTG) 0,5 mM. O cultivo foi mantido em indução por 4 h e depois foi centrifugado (16.000xg/5 min/4°C). A biomassa obtida foi ressuspensa em 1 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) e uma alíquota de 10 µl foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% desnaturante (100 V por 1,5 h); o gel foi corado com Coomassie *blue* ou submetido à transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose (90 V por 1,5 h) para realização de *Western blot* para identificação das proteínas recombinantes no cultivo total através de reatividade das mesmas com anticorpo anti-histidina. Para tal, a membrana foi bloqueada (solução de leite em pó desnatado 5% diluído em PBS) por 2 h à 37°C. Após três lavagens com PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20), a membrana foi incubada com anticorpo anti-histidina (Sigma Aldrich, A7058), diluído 1:50.000 (v/v) em PBS por 1,5 h à 37°C. Após três lavagens com

PBS-T, a reação foi revelada utilizando-se solução colorimétrica de *tetramethylbenzidine* (TMB).

Para grande parte das proteínas, foi possível observar a presença de uma banda proteica com tamanho esperado tanto no gel de SDS-PAGE (figura 1A) quanto no *Western blot* (banda reconhecida pelo anticorpo anti-histidina, figura 1B) (tabela 2). Especificamente para a proteína 197-TSP, não foi possível visualizar a expressão da proteína em SDS-PAGE, porém a expressão foi confirmada no *Western blot*.

Figura 1. Perfil de expressão das proteínas recombinantes.



Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) corado com azul de Coomassie *blue* (A e B superior) e *Western blot* (A e B inferior) utilizando anticorpo anti-6xHisTag indicando a expressão das proteínas recombinantes. M: marcador de peso molecular. Coluna lateral: peso molecular (kDa). A: *E. coli* Rosetta não transformada. As setas indicam a posição a banda correspondente à proteína recombinante. 1. 40-CEM. 2. 76-IgBP. 3. 197-TSP. 4. 218-Ag5. 5. 239-MTL. 6. 244-CEM. 7. 274-HBP. 8. 663-MTL. 9. 795-DEF. 10. 1735-CPI. 11. 1756-PI. 12. 1786-PI. 13. 2067-NEI. 14. 2712-DNAse. 15. 2819-MLD. 16. 61864-Salp15. 17. 173030-F8.9. 18. 264079-EVA.

Tabela 2. Perfil de expressão predito das proteínas recombinantes

Identificação	Peso molecular predito de expressão* (kDa)	Ponto isoelétrico predito*
40-CEM	20,6	9,74
76-IgBP	19,6	9,35
197-TSP	35	9,3
218-Ag5	27,7	10,1
239-MTL	20,5	5,81
244-CEM	17,7	6,74
274-HBP	25,3	8,94
663-MTL	38,7	7,63
795-DEF	15,2	6,47
1735-CPI	13,3	9,36
1756-PI	20,0	8,94
1786-PI	22,4	9,67
2067-NEI	13,6	6,62
2712-DNAse	41,7	9,67
2879-MLD	18,7	6,7
61864-SalpL	25,5	6,92
173030-F8.9	10,4	6,42
264079-EVA	14,2	5,93

*Predito utilizando-se ExPASy ProtParam, disponível em <https://web.expasy.org/protparam/>; o peso molecular predito de expressão: adição de cerca de 2 kDa referentes à cauda de histidina + sítio de clivagem por trombina, co-expressos.

Cabe ressaltar que apesar dos genes codificantes das proteínas terem sofrido otimização de códons para expressão em *E. coli* (algoritmo de otimização proprietário da empresa GenScript), nós testamos várias cepas de *E. coli* em busca de uma melhor expressão. A cepa de *E. coli* Rosetta (DE3) foi a que forneceu o maior nível de expressão. Outras cepas de *E. coli*, diferentes tempos de indução, diferentes temperaturas e concentrações de IPTG foram testados, mas nenhuma das condições promoveu aumento na expressão das proteínas em questão (dados não mostrados).

4.3 Expressão dos antígenos recombinantes

Uma vez confirmada a expressão das proteínas recombinantes em pequena escala nas configurações de tamanho e reatividade com anticorpo anti-histidina esperadas, os plasmídeos foram novamente transformados em *E. coli* Rosetta (DE3) para expressão em maior escala, conforme já descrito. No entanto, como já havíamos observado que a presença de antibióticos de seleção reduzia expressão de alguns antígenos (dados não mostrados), optamos por realizar a produção em larga escala na ausência de antibióticos. Para melhor selecionar apenas as bactérias transformadas, realizamos um processo de seleção dupla do pré-inóculo, em que o repique foi realizado em dois dias consecutivos na presença de antibióticos de seleção. Para a expressão em larga escala, o pré-inóculo da segunda seleção, no volume de 10 mL, foi adicionado à 500 mL de meio LB caldo em frasco Erlenmeyer de 2 L nas condições de cultivo e indução já descritas no item anterior. Ao final do cultivo, o material foi centrifugado (10.000xg/15 min/4°C) e a biomassa foi congelada a -20°C para posterior solubilização. Uma amostra do material foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida, transferida para membrana de nitrocelulose e submetida à técnica de *Western blot* utilizando anticorpos anti-histidina, conforme já descrito, confirmando-se a manutenção da expressão de todas as proteínas após a expansão de cultivo, em condições similares àquelas observada para a expressão em pequena escala.

4.4 Solubilização das proteínas recombinantes em condição desnaturante e não desnaturante

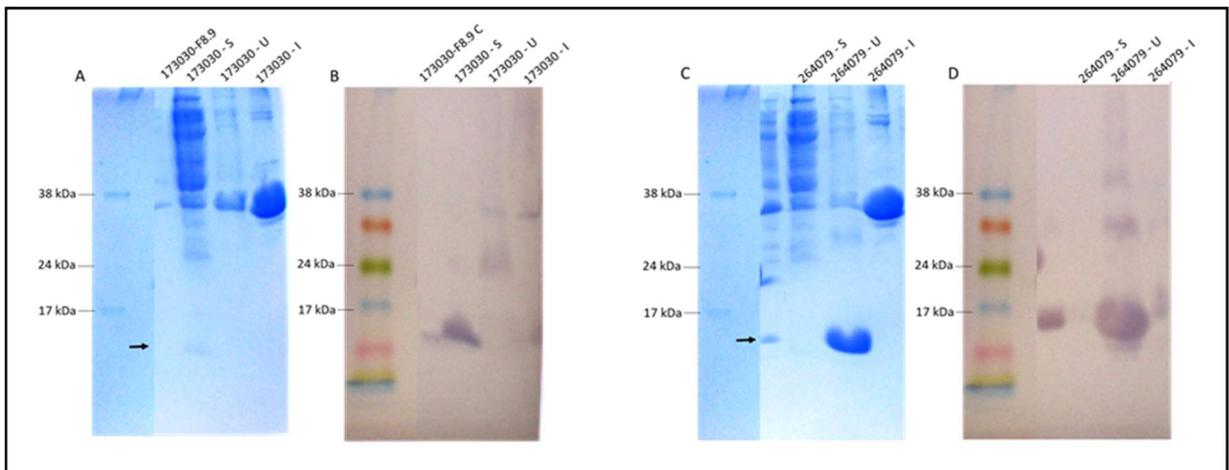
Uma vez que a manutenção da estrutura conformacional das proteínas é importante para a indução da produção de anticorpos ligantes de epítopos conformacionais, e que a solubilidade após a produção é um indicativo de uma conformação proteica estável e, possivelmente, semelhante à encontrada *in vivo*, a solubilidade das proteínas em condição não-desnaturante foi avaliada. Para tal, a biomassa produzida após a expressão em larga escala foi ressuspensa em tampão de solubilização (Na₂HP0₄ 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, pH 7,4) na proporção 10 mL tampão/g de biomassa, e submetida a procedimento de lise enzimática através de incubação com lisozima (100 µg/mL) por 30 min/25°C, seguida de lise mecânica por sonicação (60% de intensidade, 15 pulsos de 15 s com intervalos de 15 s) e agitação orbital a 4°C/16 h. Após, o sobrenadante foi separado

da biomassa insolúvel por centrifugação (16.000xg/1,5 h/4°C) e a solubilidade das proteínas recombinantes foi avaliada após eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, que foi submetida à *Western blot* usando anticorpos anti-histidina, conforme descrito.

Utilizando-se este procedimento, apenas as proteínas 2067-NEI e 173030-F8.9 apresentaram solubilidade nestas condições (figura 2). As demais proteínas apresentaram baixa ou nenhuma solubilidade nas condições testadas. Buscando-se obter uma estrutura solúvel, diversos protocolos de solubilização não-desnaturante, incluindo variações de pH do tampão fosfato, adição de detergentes (Triton X-100; N-lauroylsarcosine), alteração nas configurações da lise mecânica, alteração de temperatura e período de expressão (37°C/4 h; 28°C/ 16 h), expressão em *E. coli* Arctic Express (Agilent) (13°C/16 h ou 4 h) foram testadas, sem sucesso.

Aplicamos, então, um protocolo de solubilização desnaturante com tampão fosfato contendo ureia. Para tal, os mesmos procedimentos iniciais de solubilização foram aplicados. No entanto, após a lise mecânica, o material foi centrifugado (10.000xg/10 min /4°C) e a biomassa insolúvel foi lavada três vezes com PBS + Triton-X-100 0,1%. Após as lavagens, o material foi ressuspenso em tampão de solubilização contendo ureia 6 M e mantido em agitação orbital a 4°C/16 h. Após, o sobrenadante foi clarificado por centrifugação (16.000xg/1,5 h/4°C) e a solubilidade das proteínas foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida seguida por *Western blot* empregando anticorpos anti-histidina. A partir deste procedimento foi possível observar que todas as proteínas se tornaram solúveis (figura 2).

Figura 2. Perfil de solubilização das proteínas recombinantes 173030-F8.9 e 264079-EVA.



Presença das proteínas recombinantes 173030-F8.9 (A, B) ou 264079-EVA (C, D) no cultivo celular expresso pré-tratamento (C), ou no sobrenadante após solubilização sem desnaturante (S), após solubilização com 6M de uréia (U) ou proteína residual insolúvel (I), verificada através de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com *Coomassie blue* (A, C) ou submetido à *Western blot* com anticorpo anti-histidina (B, D). A seta indica a posição da proteína expressa.

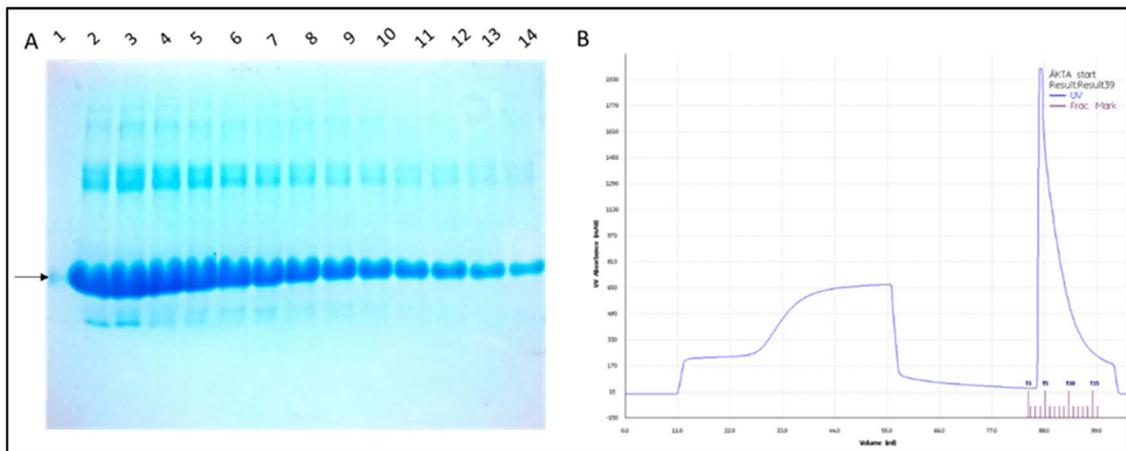
4.5 Purificação das proteínas solubilizadas por cromatografia de afinidade ao níquel

Uma vez que as proteínas foram expressas contendo uma cauda de seis histidinas, as mesmas foram purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel. Para tal, o conteúdo solúvel obtido a partir de cultivo em larga escala (em condição desnaturante ou não) foi clarificado utilizando-se filtração sequencial em membranas de nylon 0,8 e 0,45 μm . O material clarificado foi submetido à purificação em coluna de cromatografia com níquel HisTrap (GE Healthcare Life Sciences) utilizando-se sistema de purificação Äkta Start (GE Healthcare Life Sciences). A coluna com a proteína ligada foi lavada com 20 volumes de solução de solubilização contendo ou não ureia; e a proteína foi eluída da coluna utilizando-se tampão de solubilização contendo ou não ureia acrescido de imidazol 500 mM. A eluição com gradiente de imidazol foi testada, porém não houve acréscimo significativo de pureza, motivo pelo qual o método isocrático de eluição foi padronizado. A qualidade da purificação das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Como resultado, as proteínas 40-CEM, 218-AG5; 239-MTL, 244-CEM, 795-DEF, 1753-CPI, 2067-NEI, 2879-MLD, 173030-F8.9, 264079-EVA, 61864-SalpL e 197-TSP foram purificadas com sucesso, com rendimento e pureza suficientes, conforme exemplificado para a proteína 239-MTL (Figura 3). As proteínas 76-IgBP,

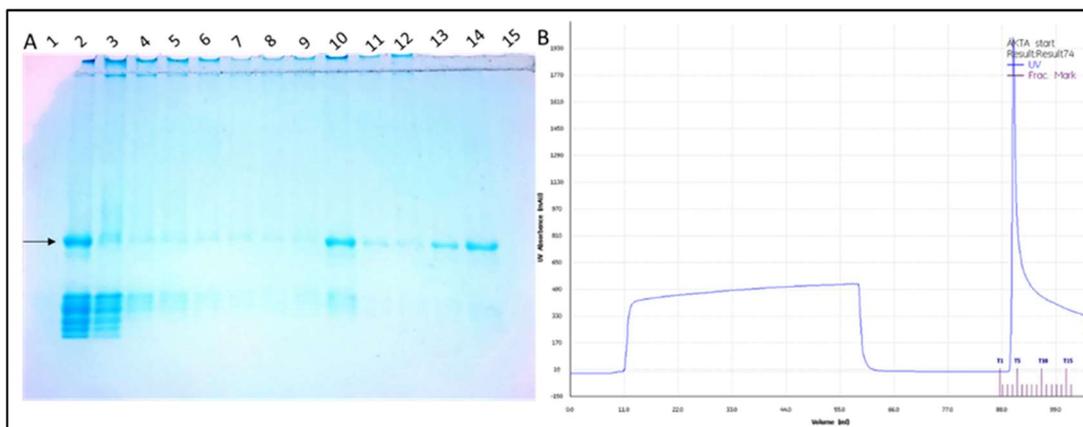
274-HBP, 663-MTL, 1786-PI, 1756-PI e 2712-DNAse apresentaram baixo rendimento e/ou evidências de degradação durante a purificação, mesmo após tentativa de purificação utilizando-se coluna de cobalto, conforme exemplificado para a proteína 274-HBP (Figura 2). Nós optamos, então, por continuar trabalhando apenas com as proteínas que foram purificadas com sucesso.

Figura 3. Perfil de purificação da proteína recombinante 239-MTL.



Purificação em cromatografia de afinidade ao níquel da proteína recombinante 239-MTL solúvel em tampão contendo ureia 6 M. A) Gel de poliacrilamida 15% corado com Coomassie blue. Colunas: eluição seriada da proteína da coluna com tampão contendo 500 mM de imidazol. B) Cromatograma da purificação. A seta indica a localização predita da proteína recombinante em conformação monomérica.

Figura 4. Perfil de purificação da proteína recombinante 274-HBP.



Purificação em cromatografia de afinidade ao níquel da proteína recombinante 274-HBP solúvel em tampão contendo ureia 6M. A) Gel de poliacrilamida 15% corado com Coomassie blue. Colunas: eluição seriada da proteína da coluna com tampão contendo 500 mM de imidazol. B) Cromatograma da purificação. A seta indica a localização predita da proteína recombinante em conformação monomérica.

4.6 Diálise e concentração

Após a purificação, a concentração das proteínas foi determinada pelo método BCA (BCA Protein Assay Kit, Pierce) e a concentração foi ajustada para 250 µg/mL para diálise. As proteínas 2067-NEI e 173030-F8.9 foram submetidas à diálise rápida em membrana de celulose com poro de 3,5 kDa imersa em PBS na proporção 1 mL de proteína/100 mL de PBS, mantida a 4°C em agitação por 16 h. As demais proteínas foram submetidas à diálise lenta para redobramento em membrana de celulose durante sete dias à 4°C sob agitação, conforme descrito anteriormente, porém com troca gradual e progressiva do tampão contendo ureia por PBS, com redução programada de 0,25 M de ureia a cada troca, realizada a cada 8 h, até a diluição máxima da ureia na última troca completa por PBS. As proteínas dialisadas foram centrifugadas e filtradas para a retirada de precipitados e o conteúdo solúvel foi concentrado em nova membrana de celulose recoberta com açúcar cristal, até redução do volume para cerca de um quarto do volume inicial.

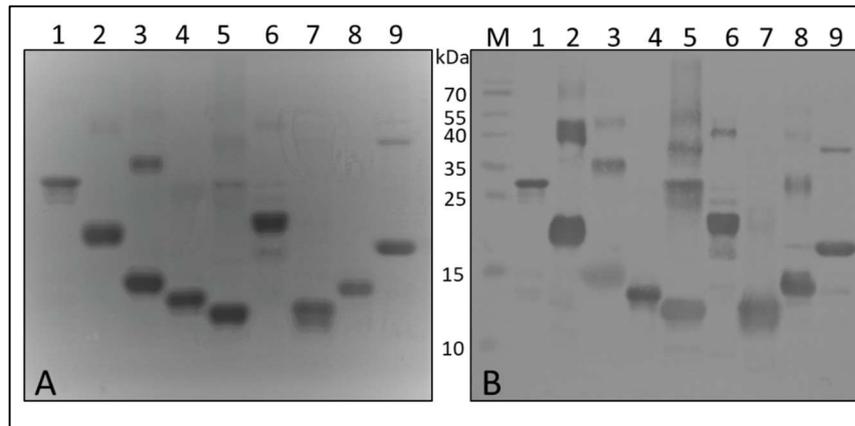
A quantificação de proteínas foi realizada para acompanhamento após a diálise e após a concentração. Neste processo, dentre as proteínas purificadas com sucesso, as proteínas 61864-Salp15, 40-CEM e 197-TSP sofreram precipitação completa na diálise, não havendo proteína solúvel ao final. Para estas proteínas, o processo de diálise foi testado e ajustado múltiplas vezes, sem sucesso. Não houve perda significativa das demais proteínas durante o processo de concentração. A tabela 3 resume os resultados obtidos em cada etapa para cada proteína. Ao fim deste processo, encontravam-se aptas para utilização em experimentos de vacinação as proteínas 218-AG5; 239-MTL, 244-CEM, 795-DEF, 1735-CPI, 2067-NEI, 2879-MLD, 173030-F8.9 e 264079-EVA (figura 5).

Tabela 3. Perfil da produção de proteínas em larga escala, com detalhamento dos resultados obtidos para cada etapa da produção.

Identificação	Condição de solubilidade	Rendimento da purificação	Rendimento após diálise	Uso
40-CEM	Desnaturante	1-3 mg/L	Nulo	Não
76-IgBP	Desnaturante	< 500 ug/L	NR	Não
197-TSP	Desnaturante	< 500 ug/L	Nulo	Não
218-Ag5	Desnaturante	1-3 mg/L	1-3 mg/L	Sim
239-MTL	Desnaturante	> 3 mg/L	> 3 mg/L	Sim
244-CEM	Desnaturante	1-3 mg/L	1-3 mg/L	Sim
274-HBP	Desnaturante	Sem sucesso	NR	Não
663-MTL	Desnaturante	< 500 ug/L	NR	Não
795-DEF	Desnaturante	> 3 mg/L	> 3 mg/L	Sim
1735-CPI	Desnaturante	< 500 ug/L	1-3 mg/L	Sim
1756-PI	Desnaturante	< 500 ug/L	NR	Não
1786-PI	Desnaturante	Sem sucesso	NR	Não
2067-NEI	Solúvel	> 3 mg/L	> 3 mg/L	Sim
2712-DNAse	Desnaturante	Sem sucesso	NR	Não
2879-MLD	Desnaturante	> 3 mg/L	> 3 mg/L	Sim
61864-SalpL	Desnaturante	< 500 ug/L	Nulo	Não
173030-F8.9	Solúvel	> 3 mg/L	> 3 mg/L	Sim
264079-EVA	Desnaturante	> 3 mg/L	> 3 mg/L	Sim

NR: não avaliado.

Figura 5. Gel de poliacrilamida (A) e *Western blot* (B) com anticorpo anti-histidina das proteínas concentradas.



Proteínas purificadas. A) Eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrando o perfil eletroforético das proteínas purificadas após a concentração – proteínas prontas para uso. B) *Western blot* utilizando-se detecção com anticorpo anti-histidina (1:50.000) para detecção da cauda de histidinas, confirmando a natureza recombinante das proteínas purificadas. M: marcador de peso molecular (kDa). 1) 218-AG5 (27,7 kDa); 2) 239-MTL (20,5 kDa); 3) 795-DEF (15,2 kDa); 4) 1735-CPI (13,3 kDa); 5) 2067-NEI (13,6 kDa); 6) 2879-MLD (18,7 kDa); 7) 173030-F8.9 (10,4 kDa); 8) 264079-EVA (14,2 kDa); 9) 244-CEM (17,7 kDa).

5 Proteção anti-carrapatos *R. microplus* conferida pela imunização de bovinos com os antígenos recombinantes

Para avaliar a atividade protetora anti-carrapatos *R. microplus* de nossos antígenos recombinantes, realizamos dois ensaios de imunização em bovinos que serão descritos ao longo desta seção. Os ensaios foram realizados em períodos distintos, e serão descritos na ordem de execução. Os procedimentos comuns para ambos os ensaios serão detalhados a seguir.

5.1 Animais e procedimentos experimentais

5.1.1 Animais e estrutura experimental

Os experimentos foram desenvolvidos no Centro Experimental Nowavet Agro (CENA) – Nowavet LTDA Pesquisa Clínica em Medicina Veterinária, localizado na zona rural do município de Coimbra-MG, próximo de Viçosa-MG e foram financiados pela Bayer Saúde Animal. Para ambos os ensaios, foram utilizados bovinos machos não castrados da raça Holandesa, de 12 meses de idade, identificados por brincos numerados. Os animais receberam acompanhamento veterinário e zootécnico ao longo de todo o experimento, sob responsabilidade do CENA. Apenas foram incluídos no ensaio animais de escore corporal entre 3-4 e sem sinais clínicos de doença. Os animais passaram por exames clínicos e laboratoriais periódicos, concentrados principalmente antes e após cada imunização e infestações com carrapatos.

Durante as etapas de imunização, os animais foram mantidos em curral experimental de piso concretado. Já durante as infestações com carrapatos, os animais foram mantidos em baias individuais de 8m² com sistema de esgoto independente, em prédio com telhado vedado e janelas teladas. As baias apresentavam piso vazado de forma a permitir a coleta de teleóginas. Os ofícios de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais para realização das atividades experimentais podem ser consultados no Anexo I.

5.1.2 Infestação experimental

Em ambos os experimentos, foram realizados procedimentos de infestação experimental de bovinos com larvas de carrapatos *R. microplus* com idade entre 7 e 21 dias, provenientes da colônia mantida no CENA. Embora o número de larvas

aplicadas tenha variado entre os experimentos, o procedimento de infestação foi padronizado e será descrito a seguir.

Para as infestações, os bovinos foram imobilizados com cabresto para evitar lambeduras e tiveram a cauda amarrada a fim de evitar chicoteamento. Estas condições foram mantidas por 3 h após a infestação. As larvas de *carrapatos R. microplus* foram aplicadas nas regiões do pescoço, região lombar e escroto. Após as infestações, os animais foram mantidos no isolamento de bovinos do CENA, sendo alocado um animal por baia. As baias eram ripadas, com piso vazado para recuperação das teleóginas, continham bebedouro e cocho para alimentação e eram limpadas diariamente. Os animais permaneceram no isolamento até que não houvesse mais a liberação de teleóginas.

5.1.3 Coleta de teleóginas e avaliação dos parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos

As teleóginas naturalmente desprendidas dos bovinos foram coletadas diariamente durante toda a infestação. Para tal, as baias foram lavadas com água sob pressão e todo o conteúdo sólido foi coletado na saída do sistema de esgoto. As fêmeas foram manualmente separadas do resíduo, lavadas, secas e contadas. Do total de fêmeas recuperadas, 25% das fêmeas de cada animal foram aleatoriamente coletadas e pesadas em balança analítica com precisão de três casas decimais. Estas fêmeas foram acondicionadas em placas individuais e incubadas (estufa B.O.D., 28°C, 80% de umidade) para avaliação da postura 20 dias após a coleta. A massa de ovos de cada fêmea foi pesada, e os ovos do mesmo grupo foram agrupados em alíquotas de 0,5 g acondicionados em tubos tampados com chumaço de algodão e incubados em estufa por 26 dias, quando foi realizada a pesagem das larvas. Os valores individuais foram anotados em formulários específicos e utilizados para os cálculos de eficácia vacinal.

5.1.4 Determinação da eficácia vacinal

A eficácia vacinal (EV) foi determinada de acordo com a fórmula¹²⁷:

$$EV = 100 [1 - (NTV/NTC) (WTV/WTC) (PATV/PATC) (PPLOV/PPLOC)]$$

Onde: NTV = número total de fêmeas ingurgitadas no grupo imunizado; NTC = número total de fêmeas ingurgitadas no grupo controle; WTV: peso médio das fêmeas ingurgitadas no grupo imunizado; WTC: peso médio das fêmeas ingurgitadas no grupo controle; PATV = peso médio dos ovos no grupo imunizado; PATC: peso médio dos ovos no grupo controle; PPLOV: peso médio das larvas/mg de ovos no grupo imunizado; PPLOC: peso médio das larvas/mg de ovos no grupo controle.

Os valores médios dos parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos coletados durante a infestação experimental foram comparados utilizando-se teste U de Mann-Whitney em GraphPad Prism 6.0 para verificação de significância estatística.

5.1.5 Determinação da soroconversão de IgG antígeno-específico

A soroconversão antígeno-específica de IgG foi determinada através de ELISA indireto utilizando-se soros dos animais dos grupos experimentais. Para tal, placas de poliestireno com alta capacidade de ligação de proteínas (MaxiSorp, Nunc) foram sensibilizadas com 100 ng/poço (100 µL, 1 µg/mL) de proteína recombinante diluída em tampão carbonato-bicarbonato (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, pH 9,4) por 16 h/4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T, incubadas com PBS + leite em pó desnatado a 5% (200 µL/poço) (solução de bloqueio) por 2 h à temperatura ambiente e lavadas novamente. Os soros dos animais foram diluídos 1:1000 em solução de bloqueio e aplicados nas placas (100 µL/poço), mantidas em incubação por 3 h à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e incubadas por 2h à temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-IgG bovino conjugado com peroxidase (Biorad AA123P, 1:100.000, 100 µL/poço) diluído em PBS. Após nova lavagem, a reação foi revelada com 100 µL de solução de revelação de TMB e, após 15 minutos, a reação foi finalizada com 50 µL de uma solução de H₂SO₄ a 3%. A reação foi determinada usando um espectrofotômetro a 450 nm (Multiskan GO, Thermo Fisher). As reações foram

realizadas em triplicata, de modo individual para cada animal, e a diluição dos soros dos animais e anticorpo secundários foi determinada após ensaios de padronização. A comparação de médias foi realizada utilizando-se os valores de densidade óptica de cada grupo para cada proteína em um mesmo dia experimental. Análise estatística foi realizada através de teste U de Mann-Whitney em GraphPad Prism 6.0.

5.2 Avaliação da atividade protetora anti-carrapatos *R. microplus* e indução de resposta humoral em bovinos inoculados com oito proteínas recombinantes adjuvantadas com Montanide Gel 01 (Seppic)

Para avaliar a eficácia vacinal dos antígenos recombinantes produzidos, em nosso primeiro teste, as proteínas recombinantes 218-AG5; 239-MTL, 795-DEF, 1753-CPI, 2067-NEI, 2879-MLD, 173030-F8.9 e 264079-EVA foram utilizadas em conjunto para imunizar bovinos, que foram posteriormente submetidos à infestação experimental com carrapatos *R. microplus*. O antígeno 244-CEM ainda não havia sido purificado em quantidade suficiente no momento marcado para o início deste ensaio, e por isso não foi incluído no mesmo. O calendário resumido do estudo pode ser consultado na tabela 4, que descreve os dias experimentais em que cada uma das atividades ocorreu. O calendário completo de atividades e coleta de materiais realizados neste estudo pode ser consultado no Apêndice I.

Tabela 4. Atividades do estudo de teste de eficácia vacinal anti-carrapatos em bovinos utilizando oito antígenos recombinantes associados à Montanide Gel 01 (Seppic).

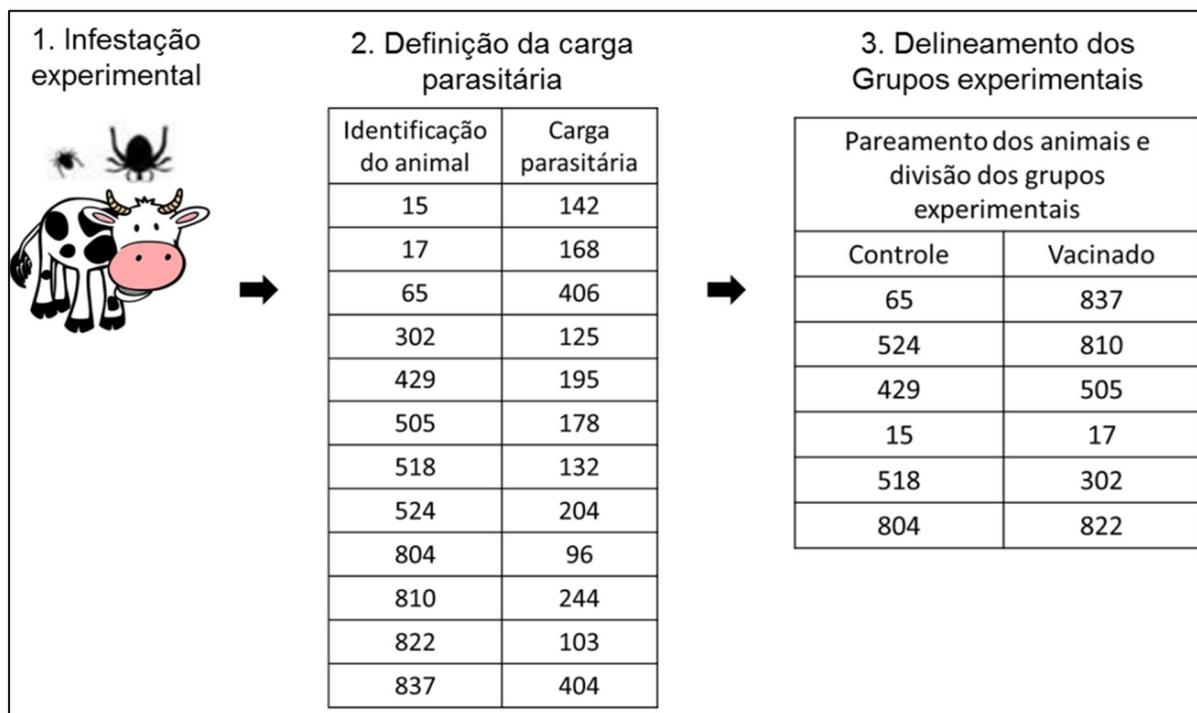
Dia experimental	Atividade
-50	Início da infestação pré-vacinação – aplicação das larvas
-20	Final da infestação pré-vacinação – coleta da última teleógina
0	Coleta de sangue, 1ª Imunização
28	2ª Imunização
59	3ª Imunização
71	Coleta de sangue
75	Infestação – 1ª aplicação de larvas
76	Infestação – 2ª aplicação de larvas
77	Infestação – 3ª aplicação de larvas
84	Coleta de sangue
97	Início da coleta de teleóginas
104	Coleta de sangue
109	Final da coleta de teleóginas
117	Início da pesagem de ovos
129	Final da pesagem de ovos
142	Início da pesagem de larvas
150	Final da pesagem de larvas

5.2.1 Infestação com carrapatos pré-vacinação para alocação dos animais nos grupos experimentais

Embora tenhamos utilizado bovinos de raça suscetível, os níveis de infestação individuais podem apresentar grande variação, o que torna necessária a composição dirigida dos grupos de estudo para avaliação efetiva da eficácia vacinal. Para alocação dirigida dos grupos experimentais (seis animais por grupo), os animais foram submetidos a uma infestação controlada com carrapatos *R. microplus* antes da imunização, onde receberam uma aplicação diária de 2.500 larvas do carrapato durante três dias seguidos, totalizando 7.500 larvas na infestação. Ao final da infestação, os animais tiveram os carrapatos adultos contados, a fim de definir a carga parasitária e nível de susceptibilidade/resistência à infestação de cada animal. Por fim, os animais foram organizados em ordem de susceptibilidade de forma

pareada, garantindo uma distribuição homogênea dos animais resistentes e suscetíveis dentre os grupos experimentais (Figura 6). Após o fim das contagens, os animais foram tratados com carrapaticida para o início do estudo.

Figura 6. Sistema de distribuição dos animais nos grupos experimentais após infestação artificial por carrapatos *R. microplus* seguida de pareamento por nível de susceptibilidade/resistência à infestação.



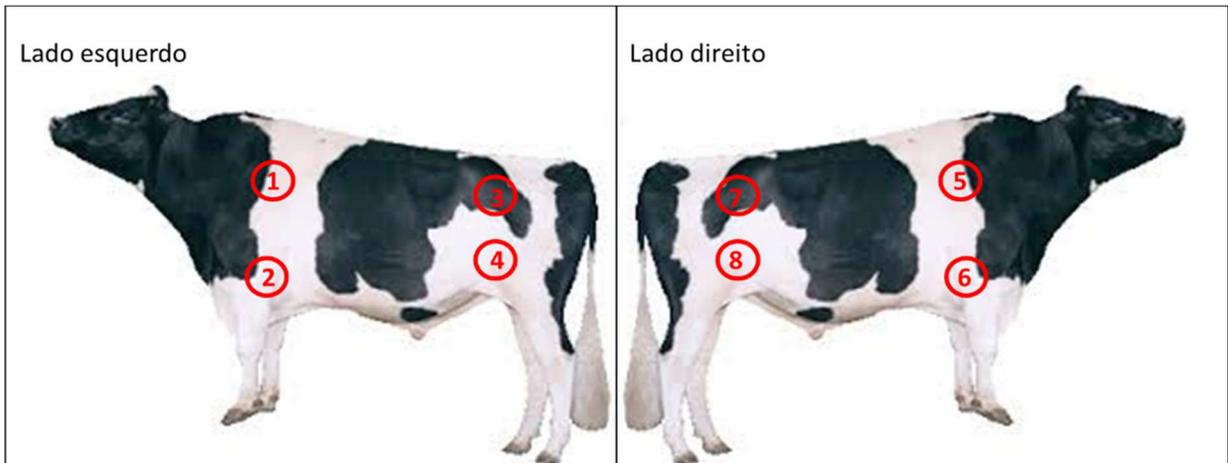
5.2.2 Preparação das formulações vacinais e imunização dos animais

Para o preparo dos inóculos, no dia anterior às imunizações, as proteínas recombinantes foram diluídas em tampão PBS estéril e adjuvadas com Montanide Gel 01 (Seppic) conforme instruções do fabricante. Os inóculos contendo proteína + adjuvante foram mantidos em agitação orbital (200 rpm/TA/10 min) para completa homogeneização e então armazenados à 4°C até o uso. Foram preparados 8 inóculos, um para cada proteína, contendo 50 µg/mL de proteína recombinante e adjuvante na concentração final de 5%, além de um inóculo extra, contendo apenas PBS e adjuvante na concentração de 5%, o qual foi aplicado no grupo controle.

Para a imunização, os animais do grupo imunizado receberam 1 mL de cada um dos inóculos individuais, por via subcutânea, em oito sítios diferentes de aplicação (figura 7). Os animais do grupo controle receberam 8 imunizações com

PBS + adjuvante nos mesmos sítios indicados na figura 7. Os animais foram imunizados três vezes, nos dias 0, 28 e 59 do estudo.

Figura 7. Sítios de aplicação dos oito inóculos avaliados.



Sítios de inoculação das formulações individuais contendo os antígenos recombinantes. O círculo vermelho indica o local anatômico da inoculação, enquanto o número interior indica a formulação aplicada.

5.2.3 Infestação-desafio dos animais experimentais com carrapatos *R. microplus*

Após 16 dias da última imunização, os animais foram submetidos a uma infestação-desafio com carrapatos *R. microplus*. Para isso, os animais foram infestados com 2.500 larvas de carrapatos/dia, em três dias consecutivos, totalizando 7.500 larvas/bovino. Durante todo o período de infestação-desafio, os animais foram mantidos nas baias isoladas. A infestação foi acompanhada diariamente, e as teleóginas que se desprenderam espontaneamente foram coletadas e utilizadas para a avaliação dos parâmetros biológicos e reprodutivos com objetivo de determinar a eficácia vacinal.

5.2.4 Coleta de sangue e avaliação da soroconversão de IgG antígeno-específica

A fim de determinar a soroconversão antígeno específica dos animais, soros foram obtidos a partir da coleta de sangue da veia jugular nos períodos pré-imunização (dia 0), após a terceira imunização (dia 71), durante a infestação experimental (dia 84) e nos dias finais da coleta de carrapatos ingurgitados (dia 104). A soroconversão de IgG antígeno-específica foi avaliada por ELISA indireto e a

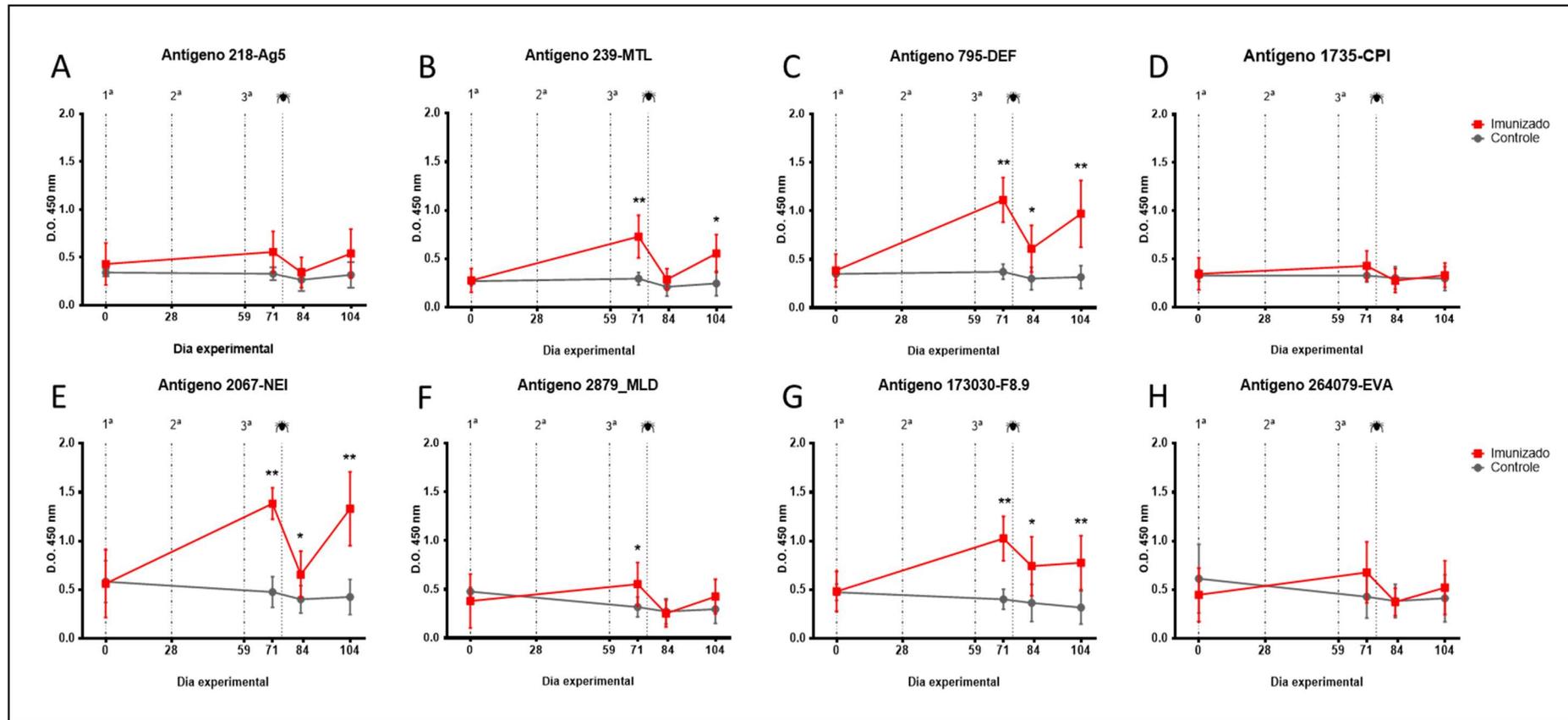
comparação de médias entre grupos foi realizada utilizando-se teste U de Mann-Whitney, conforme descrito anteriormente.

Conforme pode ser observado na figura 8, foi detectada soroconversão de IgG para os antígenos 239-MTL, 795-DEF, 1735-CPI, 2067-NEI, 2879-MLD e 173030-F8.9 após a terceira imunização; para estes antígenos, a diferença de anticorpos foi significativamente distinta entre os grupos controle e imunizado treze dias após a última imunização (dia 71). No entanto, não foi detectada soroconversão de IgG em qualquer momento experimental para os antígenos 218-Ag5, 1735-CPI e 264079-EVA. Após os animais serem submetidos à infestação com carrapatos *R. microplus*, observa-se uma queda sistemática na detecção de anticorpos nove dias após o início da infestação (D84), quando há presença de larvas e ninfas; esta queda de anticorpos é revertida para a maioria dos antígenos após 29 dias do início da infestação (D104), quando ocorre a presença de carrapatos adultos.

Não é possível determinar se a queda de IgG antígeno-específica após a terceira imunização até o período de infestação foi um efeito cinético da curva de anticorpos que independeu da ocorrência de infestação ou se existe algum processo de imunomodulação promovido pela infestação em sua fase inicial. O aumento de anticorpos de forma significativa para alguns antígenos na fase tardia da infestação, por sua vez, pode estar relacionado ao maior desafio antigênico promovido pela infestação por carrapatos adultos. A presença de quantidade suficiente de antígenos salivares foi capaz de estimular a resposta imunológica de memória que havia sido induzida durante as imunizações, que neste momento responde com a elevação dos anticorpos específicos circulantes. Esse efeito foi observado mesmo para o antígeno que foi significativamente mais abundante nas glândulas salivares de ninfas, 2067-NEI. Cinética semelhante foi observada por Mallon e colaboradores¹²⁸, em que a infestação por carrapatos promoveu aumento nos níveis de anticorpos contra o antígeno P0, utilizado para imunização e também encontrado na saliva dos carrapatos⁶⁵. No entanto, é necessário o acompanhamento mais detalhado da cinética de anticorpos específicos ao longo da infestação para determinar se o aumento de resposta humoral está relacionado, de fato, à infestação por carrapatos na fase adulta. Infelizmente, o manejo diário dos animais necessário para as coletas de sangue em menor intervalo pode prejudicar o adequado desenvolvimento da infestação e, com isso, as avaliações de eficácia vacinal.

Em relação à ausência de soroconversão para os antígenos 218-Ag5, 1735-CPI e 264079-EVA, quando utilizados para imunizar cães (resultados no capítulo 6) e galinhas (dados não mostrados), estes antígenos foram capazes de estimular a produção de anticorpos específicos. Em ambos os casos, porém, foram utilizados outros adjuvantes (sais de alumínio em cães e adjuvante de Freund em galinhas). De forma semelhante, o uso destes antígenos adjuvantados com sais de alumínio em outro estudo de imunização de bovinos foi capaz de estimular anticorpos específicos (resultados do próximo item). Sendo assim, não parece plausível que a ausência de indução de anticorpos neste experimento seja devido à instabilidade dos antígenos ou mesmo à baixa imunogenicidade dos mesmos, visto que os lotes de proteína utilizados para ambos os experimentos foram os mesmos. O adjuvante Montanide Gel 01 (Seppic) é um adjuvante aquoso formado por um polímero sintético de poliacrilato de sódio com capacidade adsortiva, e tem sido testado com sucesso para a indução de anticorpos neutralizantes do vírus influenza em galinhas¹²⁹, bem como é capaz de induzir anticorpos ativadores do sistema]complemento em suínos¹³⁰. Porém, quando utilizado para adjuvantação de Bm86, este adjuvante foi menos eficiente para gerar anticorpos em bovinos do que formulações a base de óleo¹³¹, bem como menos eficiente do que outros adjuvantes em proteger cabras da infecção por *M. agalactiae* utilizando os mesmos antígenos¹³². Assim como para outros adjuvantes, a capacidade de indução de resposta imunológica por este composto parece ser influenciada por diversos fatores, incluindo variações de antígeno e espécie. É possível, portanto, que alguma incompatibilidade entre os antígenos e o adjuvante utilizado seja responsável pelos resultados obtidos, porém nós não temos dados que suportem ou refutem esta hipótese.

Figura 8. Soroconversão de IgG antígeno-específica dos bovinos imunizados com oito antígenos recombinantes associados à Montanide



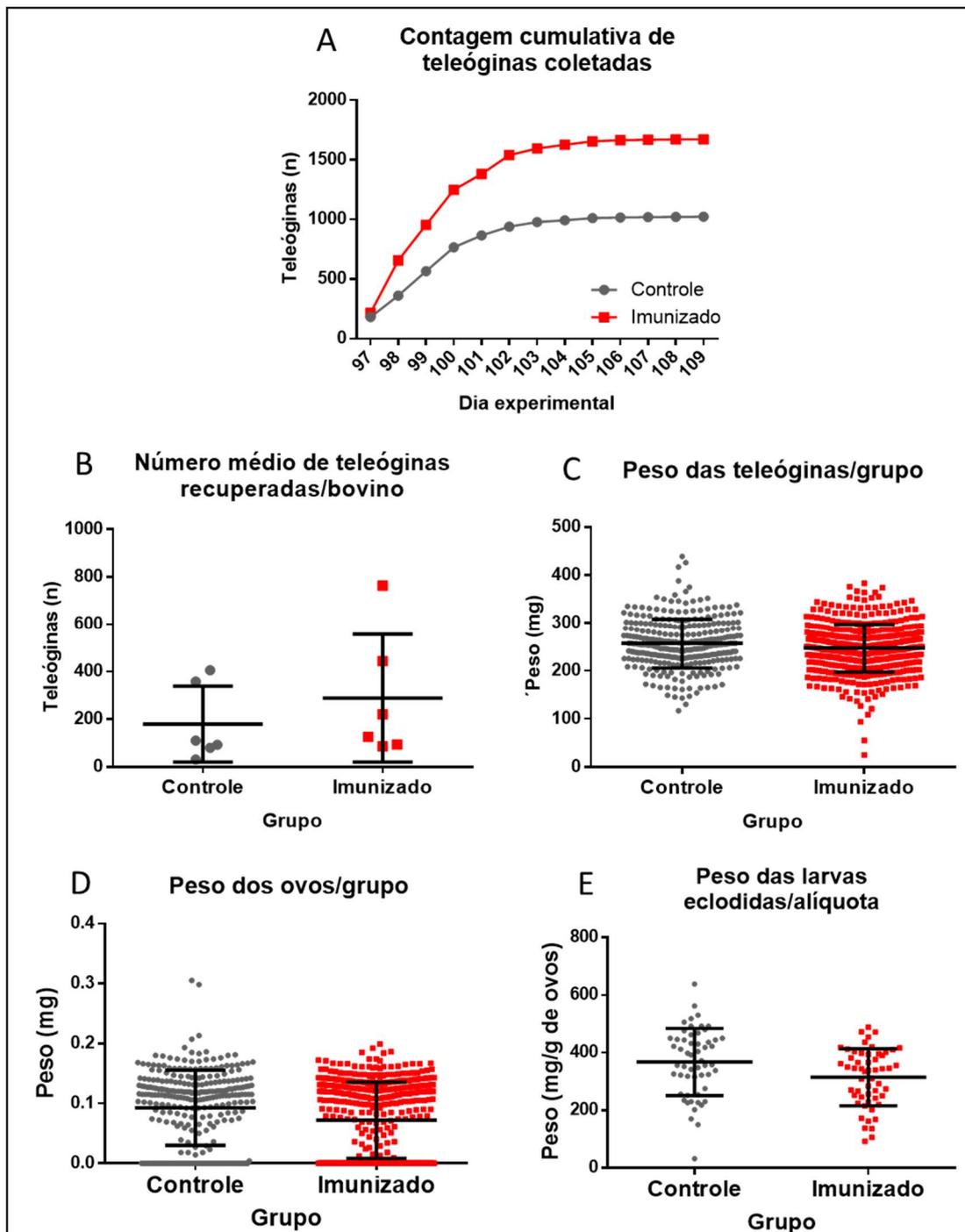
Detecção de IgG sérica bovina antígeno-específica por ELISA. Placa sensibilizada com 100 ng/poço da proteína recombinante indicadas. Soros dos animais dos grupos controle e imunizado em diferentes tempos experimentais foram usados como anticorpo primário (1:1000). Anticorpo anti IgG bovino-HRP (1:100.000) foi utilizado para detecção. O teste foi realizado em triplicata. Valores em Y representam média \pm SD da reação lida a 450 nm após revelação com TMB. Valores no eixo X representam os dias experimentais, sendo que os dias 0, 28 e 59 compreendem os dias das imunizações (linha tracejada); infestação no dia 75 (linha pontilhada); ponto de coleta durante a infestação (dia 84); e último ponto de recuperação das teleóginas (dia 104). A-H) Resultado para cada antígeno individual. A comparação estatística de médias foi realizada utilizando-se teste U de Mann-Whitney em GraphPad Prism 6.0; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.2.5 Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos após infestação-desafio

Para determinar a eficácia vacinal, os bovinos dos grupos imunizado e controle foram submetidos à uma infestação-desafio com carrapatos *R. microplus* 16 dias após a terceira imunização. Foram contabilizadas todas as teleóginas desprendidas de cada animal; o desprendimento iniciou-se no 22º dia (dia 97) após a infestação e seguiu-se até o 34º dia após a infestação (dia 109). Do total de teleóginas desprendidas por animal, 25% foram coletadas, pesadas e mantidas em incubação para avaliação da ovipostura e eclodibilidade das larvas.

O número de teleóginas recuperadas em um desafio com carrapatos pós-vacinação é um dos principais fatores a ser considerado para a determinação da eficácia vacinal anti-carrapatos, visto que comumente é o mais afetado¹³³. No entanto, apesar da soroconversão observada, nós obtivemos um número maior de carrapatos recuperados no grupo imunizado (figura 9A e B, tabela 5). Houve uma pequena redução de 4% no peso médio das teleóginas recuperadas do grupo imunizado (figura 9C), bem como redução de 5% no peso médio da ovipostura (figura 9D) e de 15% no peso das larvas eclodidas (figura 9E), nosso resultado mais expressivo. A eficácia vacinal determinada para esta formulação contendo oito antígenos recombinantes adjuvantados com Montanide Gel 01(Seppic) foi de 22% (tabela 5), tendo sido, portanto, pouco eficiente em proteger os bovinos das infestações por carrapatos *R. microplus*.

Figura 9. Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos *R. microplus* alimentados nos bovinos experimentais.



Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos *R. microplus* recuperados dos bovinos imunizados ou controles após a imunização com os antígenos recombinantes adjuvantedos com Montanide Gel 01. A) Contagem cumulativa total das teleóginas recuperadas por grupo experimental. B) Número médio de teleóginas recuperadas por animal. C) Peso das teleóginas recuperadas por grupo; cada ponto representa o peso de uma teleógina individual.; D) Peso da ovipostura por grupo; cada ponto representa o peso da massa de ovos de uma teleógina. E) Peso das larvas eclodidas por grupo; cada ponto representa o peso das larvas eclodidas por alíquota de 1 g de ovos.

Tabela 5. Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos *R. microplus* e eficácia vacinal da formulação anti-carrapatos contendo oito proteínas recombinantes adjuvantadas com Montanide Gel 01.

Parâmetros	Grupo		p***
	Controle	Imunizado (TR%*)	
Número total de fêmeas ingurgitadas	1.023	1.671 (-60%)	0,238
Peso médio das fêmeas ingurgitadas (mg)**	257±51	247±51 (4%)	0,675
Peso médio da massa de ovos/grupo (mg)**	164±105	156±101 (5%)	0,571
Peso médio das larvas/grupo (mg de larvas/g de ovos)**	367±116	315±98 (15%)	N.A.
Eficácia vacinal = 22%			
EV = 100[1 - (1)(247/257)(156/164)(153/178)]			

*TR: taxa de redução do parâmetro no grupo imunizado em relação ao controle, calculado através da fórmula: $100 \times [1 - (\text{valor no grupo vacinado} / \text{valor no grupo controle})]$; quando o valor retornado é negativo, o percentual é considerado 0 (valor não multiplicado ou 1); **Média ± SD. *** Comparativo de médias entre grupos utilizando teste U de Mann-Whitney. N.A.: não avaliado, amostras tratadas em *pool*.

5.3 Proteção anti-carrapatos *R. microplus* conferida pela imunização de bovinos com nove proteínas recombinantes adjuvantadas com sais de alumínio

Um novo ensaio clínico com imunização de bovinos foi realizado para avaliar a eficácia vacinal dos antígenos recombinantes produzidos, onde as proteínas recombinantes 218-AG5, 239-MTL, 795-DEF, 1735-CPI, 2067-NEI, 2879-MLD, 173030-F8.9, 264079-EVA e 244-CEM foram utilizadas em conjunto para imunizar bovinos, que foram posteriormente submetidos à infestação experimental com carrapatos *R. microplus*. Em relação ao primeiro experimento, três pontos principais foram alterados: 1) inclusão do antígeno 244-CEM no conjunto de proteínas vacinais; 2) adjuvantação dos antígenos com sais de alumínio; e 3) realização de duas infestações experimentais para determinar eficácia. O calendário resumido do estudo pode ser consultado na tabela 6, que descreve os dias experimentais em que cada uma das atividades descritas a seguir foi realizada. O calendário completo de

atividades e coleta de materiais realizados neste estudo pode ser consultado no Apêndice I.

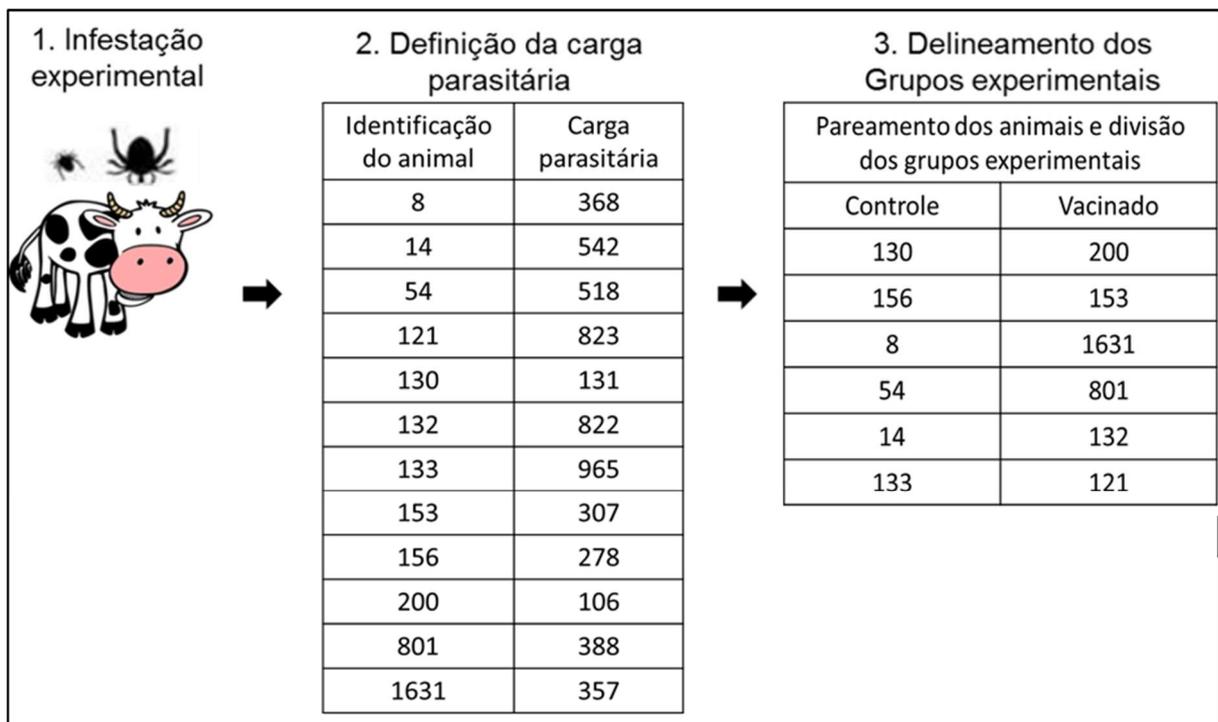
Tabela 6. Dias experimentais e atividades do estudo I de imunização de bovinos.

Dia Experimental	Atividade	
-3 a -1	Contagem de teleóginas para randomização	
0	Coleta de sangue, 1ª imunização	
28	2ª imunização	
56	3ª imunização	
70	Coleta de sangue	
1ª Infestação	84	Coleta de sangue, infestação – 1ª aplicação
	86	Infestação – 2ª aplicação
	88	Infestação – 3ª aplicação
	91	Infestação – 4ª aplicação
	93	Infestação – 5ª aplicação
	95	Infestação – 6ª aplicação
	102	Coleta de sangue
	109	Início da coleta de teleóginas
	123	Início da pesagem de ovos
	133	Final da coleta de teleóginas
	147	Final da pesagem de ovos
	149	Início da pesagem de larvas
	173	Final da pesagem de larvas
	2ª Infestação	160
162		Infestação – 2ª aplicação
181		Coleta de sangue
187		Início da coleta de teleóginas
201		Início da pesagem dos ovos
210		Final da contagem de teleóginas
224		Final da pesagem dos ovos
226		Início da pesagem das larvas
249	Final da pesagem das larvas	

5.3.1 Infestação com carrapatos pré-vacinação e alocação dos animais nos grupos experimentais

Para alocação dirigida dos grupos experimentais, os animais foram avaliados quanto à infestação natural por carrapatos, uma vez que se encontravam infestados no período determinado para a infestação experimental. Os animais foram estabulados e as teleóginas da infestação natural foram coletados por três dias consecutivos e contabilizados para determinar o nível de susceptibilidade/resistência à infestação de cada animal. Por fim, os animais foram organizados em ordem de susceptibilidade de forma pareada, de forma a garantir uma distribuição homogênea dos animais resistentes e suscetíveis dentre os grupos experimentais (figura 10). Após o final das contagens, os animais foram tratados com carrapaticida para o início do estudo.

Figura 10. Sistema de distribuição dos animais nos grupos experimentais após pareamento por nível de susceptibilidade/resistência à infestação por carrapatos.



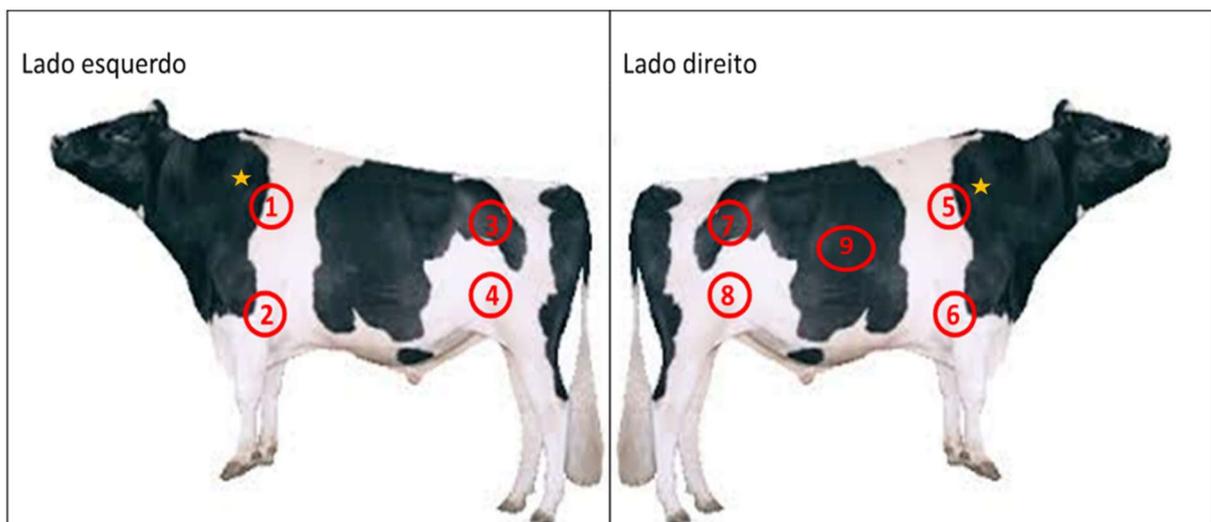
Esquema de alocação dos bovinos nos grupos experimentais a partir da avaliação da carga parasitária pré-imunização.

5.3.2 Preparação das formulações vacinais e imunização dos animais

Para o preparo dos inóculos, no dia anterior às imunizações, as proteínas recombinantes foram diluídas em tampão PBS estéril e adjuvantadas com sais de alumínio. Para as proteínas 218-Ag5 e 1735-CPI, que apresentam ponto isoelétrico predito básico (tabela 2), foi realizada adsorção com fosfato de alumínio (Adju-Phos®, Brenntag). Para as demais proteínas, que apresentam ponto isoelétrico predito negativo ou próximo da neutralidade, foi realizada adsorção com hidróxido de alumínio (Alhydrogel® 2%, Brenntag). Os inóculos contendo proteína + adjuvante foram mantidos em agitação orbital (200 rpm/TA/10 min) para completa homogeneização e então armazenados à 4°C até o uso. Foram preparados 9 inóculos, um para cada proteína, contendo 25 µg/mL de proteína recombinante 0,5 mg/mL de alumínio. Para os controles negativos foram preparadas duas formulações, cada uma contendo 0,5 mg/mL de alumínio proveniente de Adju-Phos® ou Alhydrogel®.

Para a imunização os animais do grupo imunizado receberam 2 mL de cada um dos inóculos individuais, por via subcutânea, em nove sítios diferentes de aplicação (figura 11). Os animais do grupo controle receberam 9 com PBS + adjuvante nos mesmos sítios indicados na figura 8. Os animais foram imunizados três vezes, nos dias 0, 28 e 56 do estudo.

Figura 11. Sítio de aplicação dos inóculos.



Sítios de inoculação das formulações individuais contendo os antígenos recombinantes. O círculo vermelho indica o local anatômico da inoculação, enquanto o número interior indica a formulação aplicada. As formulações 1 e 5 (estrela) contêm fosfato de alumínio, enquanto as demais contêm hidróxido de alumínio. Nos animais controle, os mesmos adjuvantes foram aplicados nas mesmas posições anatômicas.

5.3.3 Infestação-desafio dos animais experimentais com carrapatos *R. microplus*

Após 28 dias da última imunização, os animais foram submetidos a uma infestação-desafio com carrapatos *R. microplus*. Para isso, os animais foram infestados com 2.500 larvas de carrapatos/dia, em seis dias intercalados, totalizando 15.000 larvas/bovino. Durante o período de infestação-desafio, os animais foram mantidos em baias isoladas. A infestação foi acompanhada diariamente e os carrapatos que se desprenderam espontaneamente foram coletados e utilizados para a avaliação dos parâmetros biológicos e reprodutivos (previamente descritos) com objetivo de determinar a eficácia vacinal. A fim de verificar a durabilidade da resposta vacinal, uma segunda infestação foi realizada 104 dias após a última imunização, sem revacinação. Nesta infestação, os animais receberam um total de 5.000 larvas de carrapatos *R. microplus* cada, em duas aplicações intervaladas de 2.500 larvas. Os carrapatos foram coletados e processados de forma idêntica em ambas as infestações.

5.3.4 Coleta de sangue e avaliação da soroconversão de IgG antígeno-específica

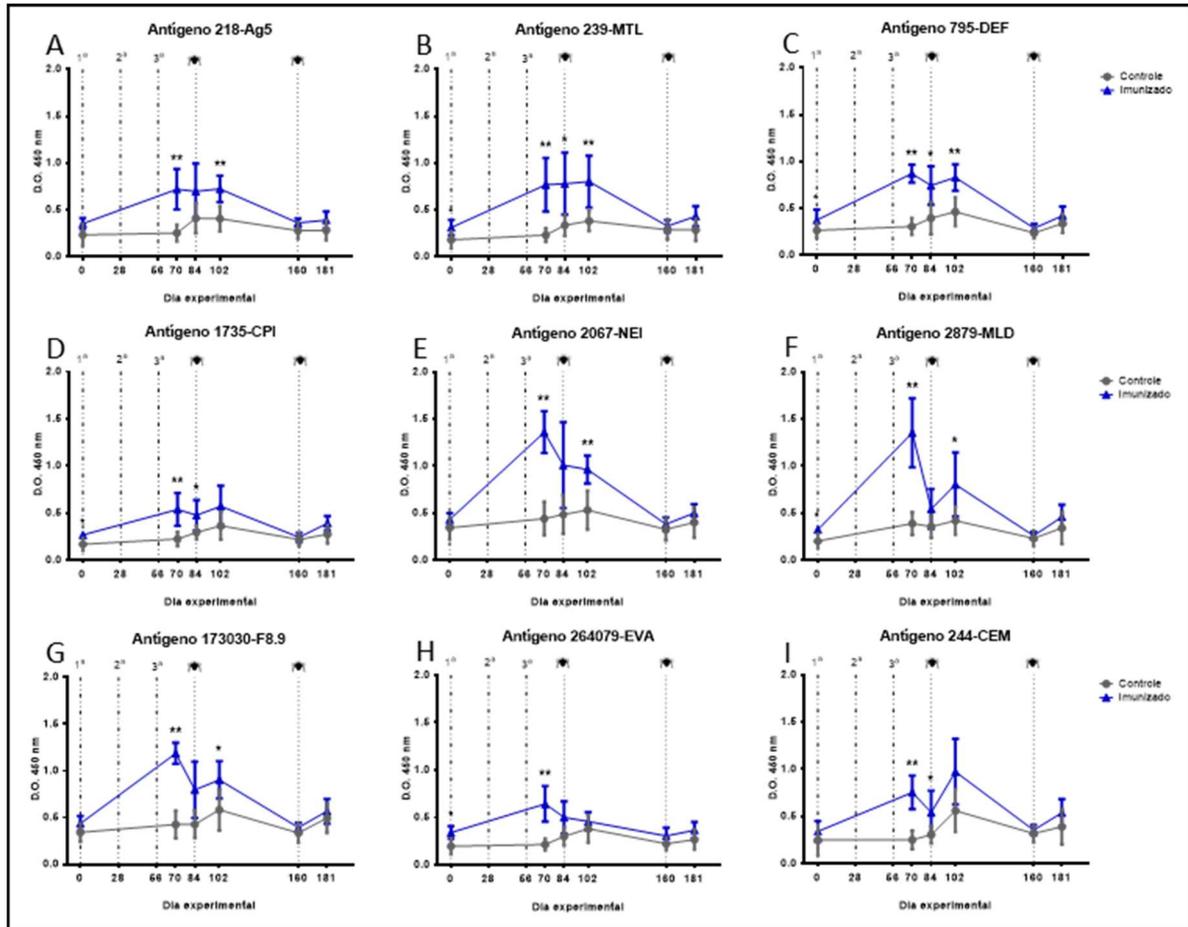
A fim de determinar a soroconversão antígeno específica dos animais do experimento II, os soros foram obtidos a partir da coleta de sangue da veia jugular nos períodos pré-imunização (dia 0), após a terceira imunização (dia 70), antes (dia 84) e durante a primeira infestação experimental (dia 102) e antes (dia 160) e durante (dia 181) a segunda infestação experimental (dia 181). A soroconversão de IgG antígeno-específica foi avaliada por ELISA indireto e a comparação de médias entre grupos foi realizada utilizando-se teste U de Mann-Whitney, conforme descrito anteriormente.

Conforme pode ser observado na figura 12, após 14 dias da terceira imunização, foram detectados níveis aumentados de anticorpos IgG específicos para todos os antígenos inoculados nos animais imunizados. Este resultado difere daquele apresentado para o experimento anterior, em que não houve indução de resposta para os antígenos 281-Ag5, 1735-CPI e 264079-EVA, reforçando a hipótese de que o sistema de adjuvantação não foi adequado para estes antígenos anteriormente.

De forma semelhante ao experimento anterior, houve uma tendência de queda dos níveis de anticorpos contra alguns antígenos após o pico observado na pós-imunização. Porém, aqui foi possível observar que esta queda ocorre antes mesmo do início do processo de infestação (dia 84). Em conjunto com os dados anteriores, é possível sugerir que a queda dos anticorpos específicos é um processo decorrente da cinética de imunoglobulinas para estes antígenos e não um efeito direto da infestação. Foi verificada a persistência de anticorpos específicos circulantes contra os antígenos 239-MTL, 795-DEF e 244-CEM nos animais do grupo vacinado mesmo aos 28 dias da última dose, sugerindo que estes antígenos possam estar gerando uma resposta imune mais duradoura (melhor memória imunológica).

Durante a infestação experimental, cinco dias após o início da coleta de teleóginas (dia 102), observa-se um aumento expressivo dos anticorpos reativos à alguns antígenos nos animais imunizados. Com exceção dos antígenos 1735-CPI, 264079-EVA e 244-CEM, os demais induziram mais anticorpos após a infestação de carrapatos (fase de adultos), reforçando a sugestão de que a alimentação do carrapato é capaz de reestimular o sistema de memória imunológica, que passa a produzir mais anticorpos em resposta ao reconhecimento destes antígenos salivares. De fato, apenas para o antígeno 264079-EVA parece haver redução real dos anticorpos circulantes antígeno-específicos. Para os demais, observa-se um discreto aumento na detecção de anticorpos, acompanhado também do aumento de anticorpos nos soros dos animais do grupo controle. Após 58 dias do pico de anticorpos intrainfestação, o título de anticorpos específicos volta a cair. Após a nova infestação não foi possível observar a recuperação nos níveis de anticorpos nos animais imunizados como anteriormente visualizado. Isto, porém, pode estar relacionado ao período de coleta dos soros, que neste momento (dia 181) é anterior ao período de desprendimento das teleóginas. Ainda que o número de carrapatos utilizado na segunda infestação tenha sido três vezes menor do que na primeira, o número de larvas aplicadas na segunda infestação (5000/animal) configura uma carga parasitária alta e deve ser capaz de estimular uma resposta de memória. A avaliação da soroconversão em período posterior é necessária para indicar se de fato a resposta está suprimida ou se é dependente do estímulo antigênico ocasionado pela alimentação de carrapatos adultos, como parecem sugerir os resultados de soroconversão observados para o dia 102.

Figura 12. Soroconversão de IgG antígeno-específica dos bovinos imunizados com oito antígenos recombinantes associados a sais de alumínio – experimento II.



Detecção de IgG sérica bovina antígeno-específica por ELISA. Placa sensibilizada com 100 ng/poço da proteína recombinante indicadas. Soros dos animais dos grupos controle e imunizado em diferentes tempos experimentais foram usados como anticorpo primário (1:1000). Anticorpo anti IgG bovino-HRP (1:100.000) foi utilizado para detecção. O teste foi realizado em triplicata. Valores em Y representam média \pm SD da reação lida a 450 nm após revelação com TMB. Valores no eixo X representam os dias experimentais, sendo que os dias 0, 28 e 58 compreendem os dias das imunizações (linha tracejada); infestações no dia 84 e 160 (linha pontilhada); pontos de coleta durante as infestações nos dias 102 e 181. A-I) Resultado para cada antígeno individual. A comparação estatística de médias foi realizada utilizando-se teste U de Mann-Whitney em GraphPad Prism 6.0; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.3.5 Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos após infestação-desafio

Para determinação da eficácia vacinal dos antígenos recombinantes, os bovinos dos grupos imunizado e controle foram submetidos à uma infestação-desafio com carrapatos *R. microplus*, conforme descrito anteriormente, 28 dias após a terceira imunização (dia 84) e novamente após 104 dias (dia 160) sem

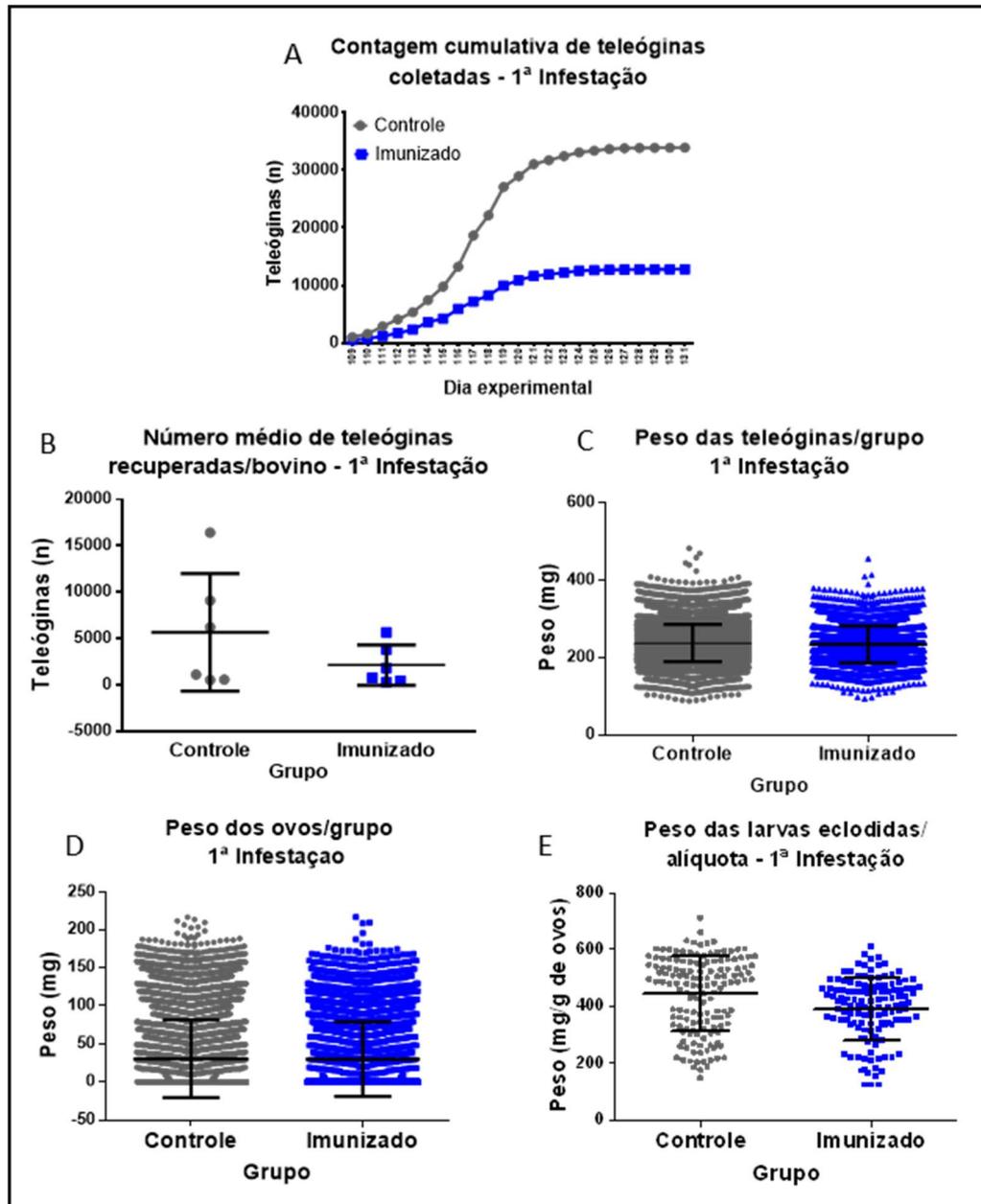
revacinação. Foram contabilizadas as teleóginas desprendidas de cada animal. Para a primeira infestação, o desprendimento iniciou-se no 25° dia (dia 109) após a infestação e seguiu-se até o 49° dia (dia 133) dias após o início da infestação. Para a segunda infestação, o desprendimento iniciou-se no 27° dia (dia 187) após a infestação e seguiu-se até o 50° dia (dia 210) pós-infestação. Do total de teleóginas desprendidas por animal, 25% foram coletadas, pesadas e mantidas em incubação para avaliação da ovipostura e eclodibilidade das larvas. A comparação de médias entre grupos para determinação de significância estatística foi realizada utilizando-se teste U de Mann-Whitney.

Diferentemente do observado para o experimento anterior, em ambas as infestações foi possível verificar a redução no número de teleóginas desprendidas no grupo imunizado com os antígenos adjuvantados com sais de alumínio. Na primeira infestação, a redução foi de 62% (figura 13 A e B, tabela 7), enquanto que a redução observada na segunda infestação foi de 70% (figura 14 A e B). Não houve redução relevante no peso das fêmeas ingurgitada em ambas as infestações (figuras 13C e 14C). A redução no peso da ovoposição das teleóginas alimentadas nos animais imunizados foi semelhante em ambas as infestações, sendo de 10% e 11% para a primeira e segunda infestações, respectivamente (figuras 13D e 14D, tabela 7). De modo interessante, a redução da eclodibilidade das larvas foi de 12% após a primeira infestação (figura 13E), mas de apenas 2% após a segunda infestação (figura 14E, tabela 7). A eficácia vacinal da formulação contendo nove antígenos recombinantes adjuvantados com sais de alumínio foi de 70% na primeira infestação, e 75% na segunda infestação (tabela 7).

Neste experimento, nós verificamos uma proteção significativa dos animais imunizados com a vacina multicomponente contra a infestação por carrapatos *R. microplus*, que foi acompanhada da emergência de uma resposta imune humoral contra os antígenos componentes da formulação. Respostas humorais aparecem associadas à resistência a carrapatos desde que Roberts e Kerr¹³⁴ demonstraram que a transferência de soro de bovinos resistentes para bovinos nunca antes infestados é capaz de diminuir em 50% o número de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* nos animais receptores, enquanto a transferência de soro de bovinos suscetíveis não apresenta qualquer efeito sobre a infestação. O título de anticorpos antígeno-específicos é correlacionado com a proteção conferida pela imunização com a proteína Bm86^{30,31}, embora os mecanismos moleculares envolvidos na

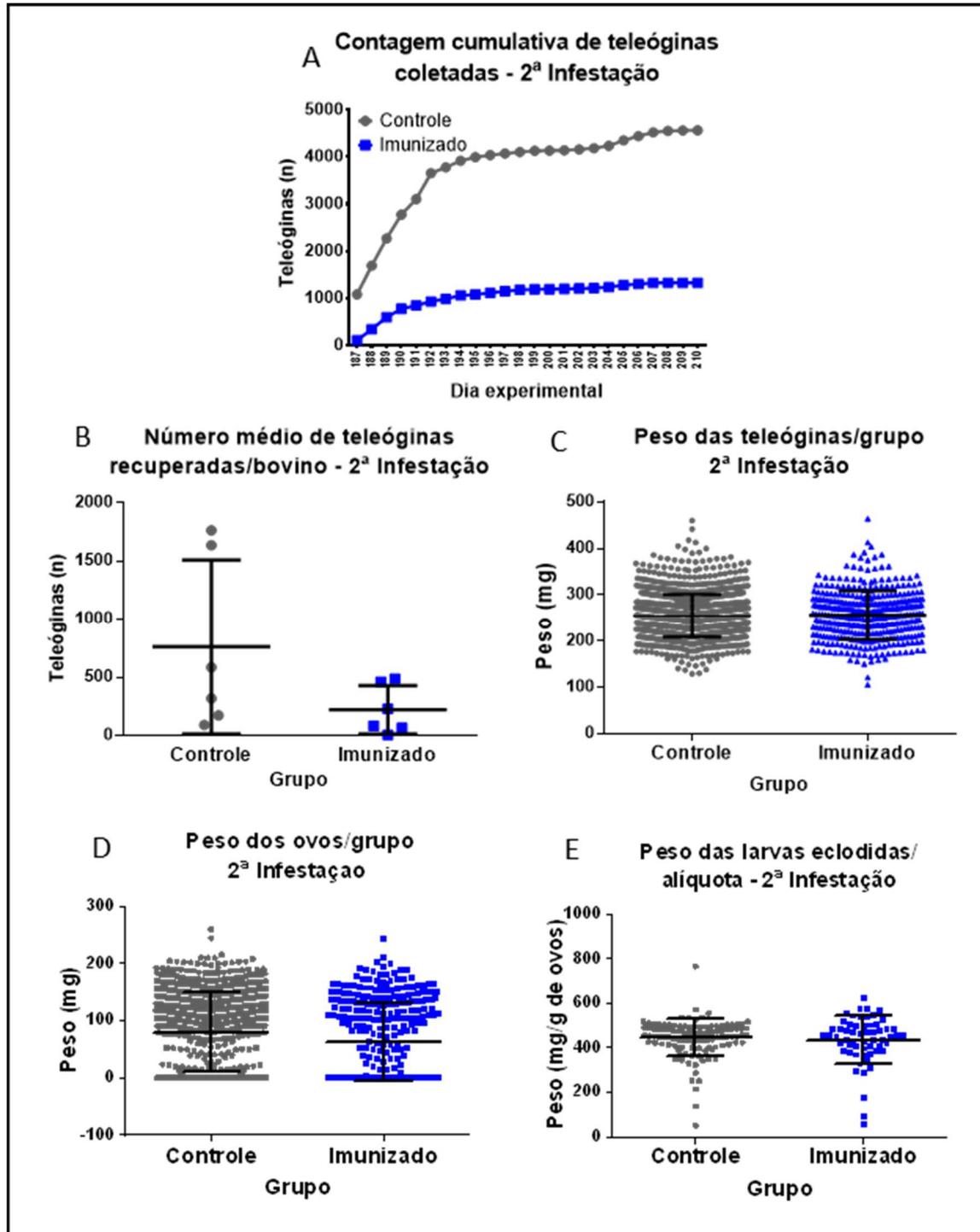
proteção por este antígeno não tenham sido elucidados até os dias atuais, sendo assim, não é possível garantir que a resposta de anticorpos seja essencial na proteção.

Figura 11. Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos *R. microplus* alimentados nos bovinos experimentais imunizados com nove proteínas recombinantes adjuvantadas com sais de alumínio – 1ª infestação.



Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos *R. microplus* recuperados da primeira infestação de bovinos imunizados ou não com os antígenos recombinantes adjuvantados com sais de alumínio. A) Contagem cumulativa total das teleóginas recuperadas por grupo experimental. B) Número médio de teleóginas recuperadas por animal. C) Peso das teleóginas recuperadas por grupo; cada ponto representa o peso de uma teleógina individual. D) Peso da ovipostura por grupo; cada ponto representa o peso da massa de ovos de uma teleógina. E) Peso das larvas eclodidas por grupo; cada ponto representa o peso das larvas eclodidas por alíquota de 1g de ovos.

Figura 12. Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos *R. microplus* alimentados nos bovinos experimentais imunizados com nove proteínas recombinantes adjuvantadas com sais de alumínio – 2ª infestação.



Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos *R. microplus* recuperados da segunda infestação de bovinos imunizados ou não com os antígenos recombinantes adjuvantados com sais de alumínio. A) Contagem cumulativa total das teleóginas recuperadas por grupo experimental. B) Número médio de teleóginas recuperadas por animal. C) Peso das teleóginas recuperadas por grupo; cada ponto representa o peso de uma teleóquina individual. D) Peso da ovipostura por grupo; cada ponto representa o peso da massa de ovos de uma teleóquina. E) Peso das larvas eclodidas por grupo. cada ponto representa o peso das larvas eclodidas por alíquota de 1g de ovos.

Tabela 7. Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos *R. microplus* e eficácia vacinal da formulação anti-carrapatos contendo nove proteínas recombinantes adjuvantadas com sais de alumínio – experimento II.

Parâmetros	1ª Infestação			2ª Infestação		
	Grupos			Grupos		
	Controle	Imunizado (TR%*)	p value***	Controle	Imunizado (TR%*)	p value***
Número total de fêmeas ingurgitadas	33.935	12.803 (62)	0,305	4.563	1328 (71)	0,130
Peso das fêmeas ingurgitadas (mg)**	236±48	233±47 (1)	0,898	255±47	256±53 (0)	0,675
Peso médio da massa de ovos/grupo (mg)**	38±15	34±10 (10)	0,787	74±19	66±25 (11)	0,474
Peso médio das larvas/grupo (mg de larvas/g de ovos)**	442±132	390±109 (12)	N.A.	444±85	435±105 (2)	N.A.
Eficácia vacinal = 70%			Eficácia vacinal = 75%			
EV = 100[(12803/33935)(233/236)(34/38)(390/442)]			EV=100[(1.328/4.563)(1)(66/74)(435/444)]			

*TR: taxa de redução do parâmetro no grupo imunizado em relação ao controle, calculado através da fórmula: $100 \times [1 - (\text{valor no grupo vacinado} / \text{valor no grupo controle})]$; quando o valor retornado é negativo, o percentual é considerado 0 (valor não multiplicado ou 1); **Média ± SD. *** Comparativo de médias entre grupos utilizando teste U de Mann-Whitney. N.A.: não avaliado, amostras tratadas em *pool*.

A ocorrência de moléculas ligantes de imunoglobulinas na saliva dos carrapatos capazes de sequestrar e remover anticorpos da hemolinfa⁸⁶ é um forte indício de que respostas anti-carrapatos mediadas por anticorpos do hospedeiro podem ser protetoras contra a infestação, a ponto de induzir o desenvolvimento de uma resposta de evasão específica por parte do parasita. Este argumento se fortalece quando demonstrado que o bloqueio da atividade destas moléculas por anticorpos neutralizantes afeta negativamente a sobrevivência do parasita¹²⁵.

No entanto, não há um consenso sobre a importância dos anticorpos na resistência às infestações por carrapatos¹³⁵. Alguns autores demonstram que, quando submetidos à infestação, bovinos de raças suscetíveis apresentam aumento de IgG total no sangue sem adquirir fenótipo de resistência^{136,137}, inclusive com aumento de anticorpos específicos para glândulas salivares e intestinos dos carrapatos¹³⁸. Ao contrário, outros estudos indicam que bovinos suscetíveis apresentam menores títulos de anticorpos IgG1 e IgG2 contra proteínas salivares¹³⁹. Cabe ressaltar que estes estudos não avaliam a existência de anticorpos contra antígenos específicos nem sua afinidade, e seus resultados devem ser considerados com cautela para explicar ou refutar hipóteses relacionadas à indução de resposta imunológica mediadas por anticorpos após imunizações. De modo interessante, Garcia e colaboradores¹⁴⁰ demonstraram que apesar de haver um aumento nos níveis de IgG1 e IgG2 contra proteínas salivares totais de carrapatos em bovinos suscetíveis continuamente infestados, o soro desses animais é capaz de reconhecer um número menor de antígenos salivares específicos do que o soro de bovinos resistentes, sugerindo que o reconhecimento de antígenos salivares específicos, e não a quantidade total de anticorpos circulantes, está relacionado ao fenótipo de resistência. O mapeamento de antígenos salivares diferencialmente reconhecidos pelo soro de bovinos suscetíveis ou resistentes à infestação pode representar uma valiosa ferramenta para a seleção de antígenos vacinais, e foi aplicada de forma complementar a outros parâmetros para selecionar os antígenos secretados de carrapatos *R. microplus* que foram patenteados para o desenvolvimento de vacinas.

Devido às diferenças de protocolo experimental entre os dois estudos aqui realizados, não é possível compararmos de forma simplificada a resposta imune humoral induzida pelos diferentes adjuvantes e correlacioná-la com a proteção observada. A presença de um antígeno extra na vacina multicomponente adjuvantada com sais de alumínio torna impossível determinar a importância do

adjuvante utilizado sobre a resposta protetora. No entanto, é possível afirmar que o uso de sais de alumínio promoveu soroconversão superior em nosso modelo, visto que foi capaz de induzir a geração de anticorpos contra todos os antígenos testados, sugerindo que seu uso pode ser positivo para o teste de novos antígenos. Nós não temos evidências de que os antígenos 218-Ag5, 1735-CPI e 264079-EVA induzem imunidade protetora anti-carrapatos, visto que os mesmos nunca foram testados anteriormente. Por isso, não é possível afirmar que a presença de anticorpos específicos para esses antígenos seja fator limitante para a atividade protetora da vacina multicomponente testada. Ensaio posteriores utilizando estes antígenos em novas formulações ou em ensaios individuais poderão ser capazes de definir a real importância dos mesmos para respostas anti-carrapatos.

Mesmo que o título e especificidade de anticorpos induzidos pela imunização dos antígenos adjuvantados com sais de alumínio esteja relacionado com a proteção, outros fatores podem ser tão ou mais importantes para definir a efetividade dos anticorpos, como a afinidade dos mesmos. Nós acreditamos que a proteção anti-carrapatos associada à nossa estratégia possa ser decorrente da neutralização das funções salivares através da reatividade dos anticorpos induzidos pela vacinação com seus alvos, o que acaba por interferir no repasto sanguíneo⁶³. Como a neutralização eficiente de antígenos virais e toxinas é dependente da geração de anticorpos de alta afinidade aos mesmos^{141,142}, determinar a afinidade dos anticorpos gerados nos dois ensaios pode trazer informações sobre o mecanismo de ação da vacina e sua correlação com a proteção conferida, caso a afinidade dos anticorpos gerados para as proteínas compartilhadas sejam consistentemente diferentes nos dois grupos.

A adição do antígeno 244-CEM é um importante fator que pode estar relacionado à proteção vacinal superior observada no experimento II. Antígenos de fixação já foram testados como vacinas anti-carrapatos por Trimnel e colaboradores³⁶, que demonstraram que a utilização da proteína de cimento 64P como imunógeno é capaz de prejudicar a infestação por carrapatos em animais de laboratório. Nos animais vacinados, a infestação estimula respostas celulares locais caracterizadas por hiperplasia cutânea e infiltrado basofílico e eosinofílico no local da fixação do carrapato, além da presença de mastócitos e células dendríticas circundando o cone de cimento. Ainda, a imunização promoveu altos títulos de anticorpos anti-64P, que podem estar relacionados com a proteção. A ocorrência de

resposta celular cutânea à infestação por carrapatos caracterizada pelo infiltrado de eosinófilos e basófilos é característica de bovinos de raças resistentes, enquanto animais suscetíveis apresentam maior infiltrado mononuclear e neutrofílico¹⁴³. Franzin e colaboradores¹⁴⁴ demonstraram que, em bovinos de raças resistentes, o infiltrado inflamatório promovido pela infestação é capaz de desestabilizar o cone de cimento, o que pode estar relacionado à redução da infestação; ainda, a transcrição de fatores associados à ativação de basófilos, mastócitos e eosinófilos também aparece aumentada na pele infestada dos animais de raça resistente. De forma interessante, carrapatos secretam abundantemente em sua saliva proteínas ligantes de histamina¹⁴⁵, sugerindo que a atividade inflamatória mediada pelas células que liberam grânulos contendo histamina apresenta papel importante no processo de resistência do hospedeiro.

Não está claro, no entanto, de que forma a imunização com antígenos de fixação poderia levar ao desenvolvimento de uma resposta local específica. Não há qualquer evidência da importância de IgE, anticorpo classicamente ligado à degranulação de basófilos, mastócitos e eosinófilos¹⁴⁶, para o desenvolvimento de um fenótipo de resistência às infestações em bovinos. Cabe ressaltar, no entanto, que poucos estudos abordaram a quantificação de IgE nos bovinos infestados, e seus resultados não podem ser considerados conclusivos. Mecanismos de degranulação mediados por IgG poderiam explicar a indução de resposta celular local frente a estímulo antigênico específico após a imunização, a exemplo do que acontece em humanos¹⁴⁷, porém não há evidências de que isso ocorra em bovinos. A análise temporal das reações locais à infestação por carrapatos nos animais imunizados com os antígenos recombinantes pode ser realizada no futuro para uma melhor caracterização das respostas celulares possivelmente associadas à proteção verificada.

De forma interessante, os resultados obtidos após a segunda infestação por carrapatos *R. microplus* no experimento II indicam um aumento da resistência dos animais imunizados à infestação mesmo na ausência de revacinação. Em estudo paralelo realizado por nosso grupo, em que os animais foram imunizados com 25 µg de cada um dos nove antígenos utilizados neste estudo mais um antígeno adicional, o mesmo efeito foi observado, sendo que a proteção induzida pela vacinação foi de 50% após a primeira infestação e de 70% após a segunda infestação (dados não mostrados). Em ambos os estudos, houve um aumento no título de anticorpos contra

diversos antígenos após a infestação, o que sugere fortemente que a estratégia de desenvolvimento de vacinas anti-carrapatos utilizando antígenos salivares não é capaz somente de induzir resposta imunológica protetora contra a infestação, mas também promove o reforço da memória imunológica através da infestação natural, sem necessidade de revacinação. Este é um grande avanço do ponto de vista estratégico em relação às vacinas anti-carrapatos disponíveis, visto que o “*boost natural*” pode diminuir o número de revacinações necessárias para a manutenção de uma resposta imunológica ativa e protetora nos rebanhos, uma das limitações apresentadas pelas vacinas atualmente comercializadas²⁰. Estudos de longa duração com o acompanhamento dos níveis de anticorpos e dos padrões de infestação natural em animais imunizados com os antígenos recombinantes utilizados neste estudo são necessários para determinar se o aumento da resposta protetora observado por nosso grupo é significativo em condições de campo, e se é mantido após múltiplas infestações. Estes estudos são essenciais também para determinar precocemente o surgimento de carrapatos resistentes à imunidade vacinal e caracterizar seus mecanismos de escape, a fim de antecipar o desenvolvimento de novas formulações vacinais capazes de atingir os parasitas resistentes.

Outra limitação importante das vacinas comerciais é o longo período entre o início das imunizações e diminuição efetiva das infestações à campo²⁰. O aparecimento “tardio” dos efeitos da vacinação com o antígeno Bm86 está relacionado ao mecanismo de ação da vacina, que afeta principalmente a fertilidade das fêmeas infurgitadas¹⁴⁸, com pouco efeito sobre o ingurgitamento imediato das teleóginas. O acompanhamento de rebanhos vacinados sistematicamente com o antígeno Bm86 demonstra que a vacinação protege parcialmente os animais das infestações por *R. microplus* e é capaz de diminuir a necessidade de aplicação de acaricidas³³. No entanto, a ausência da percepção de proteção por parte do produtor leva ao abandono da vacinação sistemática onde ela não é obrigatória, e os efeitos protetores são perdidos. A formulação testada neste trabalho, ao contrário, exerce seu maior efeito sobre o número de teleóginas que chegam à fase final de ingurgitamento, possivelmente por interferir no sucesso do repasto sanguíneo. Com uma redução visível no número de carrapatos no rebanho logo após a primeira imunização, a percepção da atividade protetora da vacina pelo produtor tende a ser positiva, estimulando a adoção sistemática da vacinação.

Os resultados aqui apresentados sugerem fortemente que a imunização de bovinos com antígenos secretados de carrapatos é capaz de promover proteção aos animais e, com isso, diminuir as infestações a campo. Estudos adicionais são necessários para verificar a reprodutibilidade destes dados e o efeito da aplicação desta estratégia na redução das infestações de bovinos à campo. Ainda, é essencial estabelecer os mecanismos imunológicos envolvidos na proteção gerada pela formulação aqui testada, a fim de identificar pontos-chave que podem ser utilizados como guias para a triagem de novos antígenos vacinais secretados

6 Proteção anti-carrapatos *R. sanguineus* conferida pela imunização de cães com nove proteínas recombinantes adjuvantadas com hidróxido de alumínio

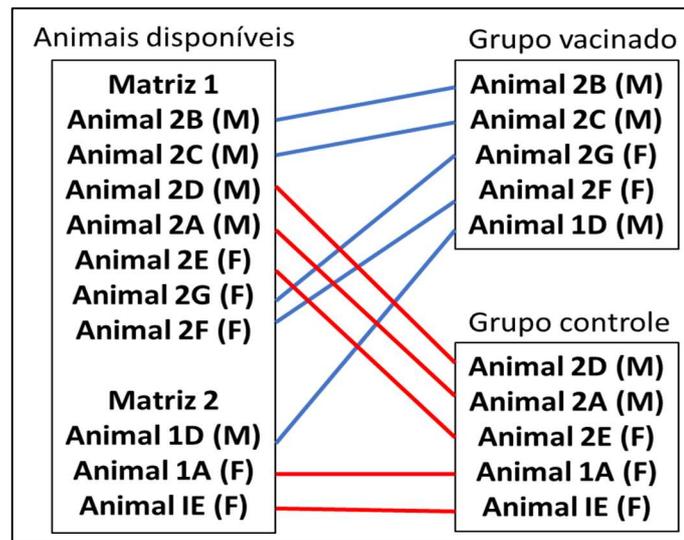
As proteínas recombinantes 218-AG5, 239-MTL, 795-DEF, 1753-CPI, 2879-MLD, 264079-EVA, 2067-NEI, 173030-F8.9 e 244-CEM foram utilizadas como vacinas em cães que posteriormente foram submetidos à infestação experimental com carrapatos *R. sanguineus*. Este experimento foi realizado no Biotério do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Minas Gerais, localizado em Belo Horizonte, MG, em parceria com o Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e o Prof. Dr. Rodolfo Giunchetti. O ofício de aprovação do CEUA referente a este experimento encontra-se disponível no Anexo I. Apenas serão abordadas neste capítulo as datas experimentais cujos resultados são apresentados. O calendário completo de coletas e experimentos realizados pode ser consultado no Apêndice I.

6.1 Cães e composição dos grupos experimentais

Para este experimento, foram utilizados 10 cães de ambos os sexos, sem raça definida (SRD), entre 5-6 meses de idade, provenientes de duas ninhadas e identificados por padrão de pelagem e sexo. Os animais nasceram e foram mantidos no biotério experimental de cães da UFMG, que conta com estrutura de vedação e telas para evitar a entrada de animais e artrópodes e, portanto, os cães não apresentavam histórico de infestações prévias por carrapatos em período anterior ao experimento. Os cães receberam acompanhamento médico-veterinário durante o experimento. Não houve restrição de alimento ou água em nenhum momento experimental. Os animais foram mantidos na mesma baía de seus pares durante todo o período experimental, exceto na etapa de infestação, em que uma realocação dos animais foi realizada a fim de diminuir os riscos de perda das câmaras de alimentação de carrapatos.

Para a composição dos grupos experimentais, os animais foram alocados de forma dirigida, a fim de dividir os irmãos de uma mesma ninhada entre os dois grupos experimentais, bem como manter número equivalente de machos e fêmeas dentro de cada grupo (figura 15). Diferentemente do realizado para bovinos, nenhum procedimento de verificação de susceptibilidade ou resistência à infestação por carrapatos foi realizado antes do início do experimento. Os animais não foram identificados individualmente, visto que o padrão de pelagem permitiu a diferenciação dos animais.

Figura 15. Divisão dos grupos experimentais para o experimento de imunização de cães.



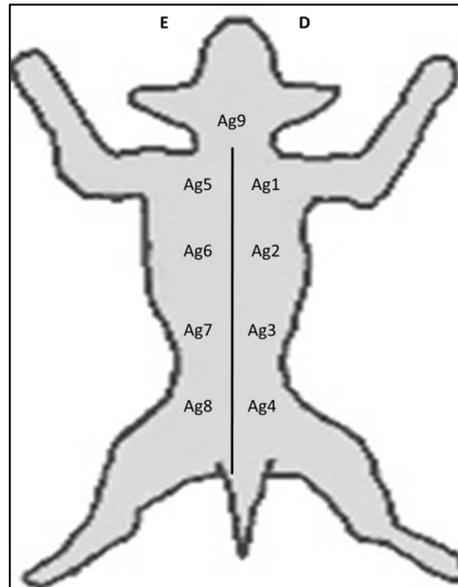
6.2 Preparação das formulações vacinais e imunização dos cães

Para este experimento, as proteínas diluídas em tampão PBS foram adsorvidas ao adjuvante Allhydrogel® 2% (Brenntag), de forma individual, para compor as formulações vacinais de 1 a 9. A formulação 10 foi composta de adjuvante e PBS, e foi utilizada para inoculação do grupo controle. Os inóculos contendo proteína e adjuvante foram preparados no dia anterior ao uso. Para tal, os inóculos foram homogeneizados com o uso de pipetador sorológico à temperatura ambiente por 10 minutos e então armazenados à 4°C até o dia seguinte. Foram preparados 9 inóculos, um para cada proteína, contendo 50 µg/mL de proteína recombinante e 50 µg/mL de Alhydrogel® 2% (Brenntag).

Para a imunização, a pele dos animais foi desinfetada na região da aplicação utilizando-se algodão e álcool 70%. Os cães foram contidos manualmente. Os cães do grupo imunizado receberam 1 mL de cada uma das formulações de 1 a 9, por via subcutânea, em nove sítios diferentes de inoculação (figura 16) localizados ao longo do dorso. Os animais do grupo controle receberam nove inoculações da formulação 10 (adjuvante+PBS), nos mesmos sítios. Na primeira semana após cada imunização, os animais foram diariamente examinados para análise de alterações locais ou sistêmicas indicativas de reações adversas. Os animais foram acompanhados por exames hematológicos e bioquímicos na semana seguinte à cada imunização, e não foram relatadas alterações neste período. Apenas um dos

animais do grupo imunizado apresentou uma pequena área com alopecia, porém sem prurido ou lesão na região de administração do antígeno 9 após a primeira dose, que não necessitou intervenção para resolução.

Figura 16. Sítios de aplicação dos inóculos 1 a 9 na região dorsal dos cães do experimento.



Esquema de aplicação das formulações vacinais. Visão dorso-ventral. E: lado esquerdo do animal. D: lado direito do animal. Identificação dos antígenos em seus locais de aplicação.

6.3 Coleta de sangue e avaliação da soroconversão antígeno-específica dos cães vacinados

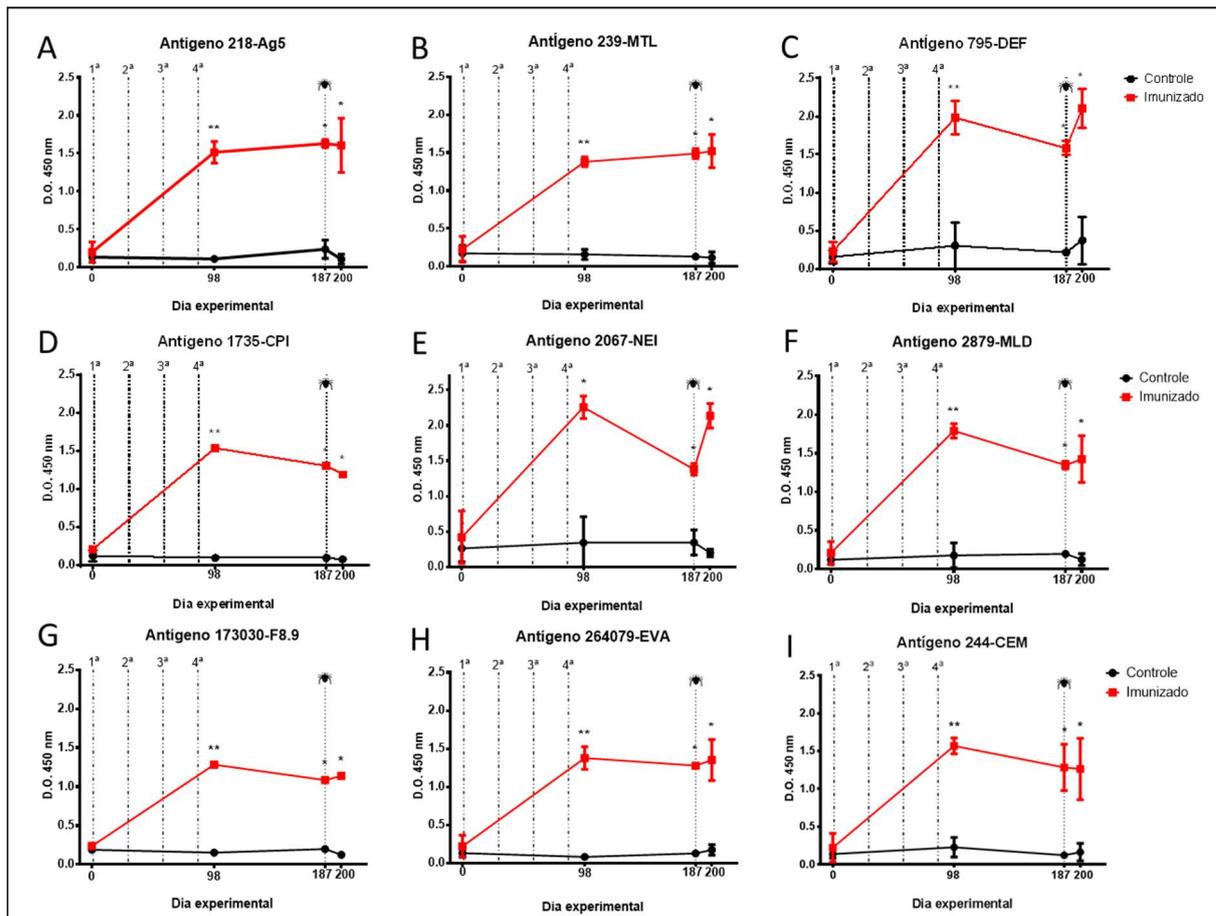
A fim de determinar a soroconversão dos cães imunizados, os animais foram manualmente contidos para coleta de sangue da veia jugular para obtenção do soro. A soroconversão de IgG antígeno-específica foi determinada através de ELISA indireto utilizando-se soro dos animais coletado no período pré-imunização (dia 0), 14 dias após a quarta imunização (dia 98), no momento prévio à infestação (dia 187) e após a infestação, quando as câmaras foram retiradas (dia 200). O protocolo para realização de ELISA foi o mesmo descrito para bovinos. As únicas alterações realizadas referem-se à 1) utilização do soro canino como anticorpo primário na diluição 1:400; e 2) utilização de anticorpo secundário anti-IgG canino conjugado à peroxidase (Biorad, AAI32, 1:50.000).

Diferentemente do observado para bovinos, todos os cães responderam de forma significativa à imunização com os antígenos recombinantes 14 dias após a

quarta dose (figura 17). Nós realizamos o acompanhamento sorológico dos animais 14 dias após a terceira dose (dados não mostrados), e observamos que apenas um animal do grupo imunizado não havia respondido para dois dos antígenos, motivo pelo qual optamos por aplicar uma quarta dose. Embora esteja presente uma tendência de queda nos níveis de IgG específicas circulantes após a quarta dose e o início do período de infestação (um período de 15 semanas), a mesma não é expressiva a ponto de eliminar a diferença estatística entre os grupos imunizados e controles. Durante este intervalo, os animais foram submetidos à um teste intradérmico de hipersensibilidade em que 5 µg de cada um dos antígenos recombinantes foi aplicado por via intradérmica para avaliar a indução de resposta de hipersensibilidade tardia (associada à proteção à carrapatos). Embora os animais não tenham apresentado reação de hipersensibilidade, é possível que esta aplicação tenha promovido algum *boost* vacinal que possa justificar, pelo menos em parte, a prolongada manutenção dos anticorpos circulantes; portanto, o observado não pode ser atribuído unicamente ao regime de imunizações.

Diferentemente de *R. microplus*, que realiza todas as suas mudas sobre o mesmo hospedeiro, carrapatos *R. sanguineus* realizam a troca de hospedeiro durante as mudas (carrapato trioxeno). Por isso utilizamos as três fases do carrapato: larva, ninfa e adultos para infestar; ou seja, durante o período de desafio os animais encontravam-se infestados com carrapatos *R. sanguineus* nas três fases. Realizamos o acompanhamento sorológico dos cães antes e depois das infestações experimentais. Os resultados mostraram que após a infestação desafio não ocorreu uma mudança significativa na cinética de anticorpos que se mostrou durante a alimentação dos carrapatos. Isto é, os cães imunizados permaneceram positivos para a circulação de anticorpos antígeno-específicos durante todo o período analisado, sugerindo que a infestação, neste caso, não foi capaz de alterar a resposta do hospedeiro à vacinação. Em adição à isso, também não foi observado aumento de anticorpos circulantes após a vacinação em resposta ao desafio, não sendo possível sugerir um *boost* vacinal induzido pela infestação neste modelo, diferentemente do que foi observado para bovinos.

Figura 17. Soroconversão de IgG antígeno-específica dos cães imunizados com oito antígenos recombinantes associados a Alhydrogel®.



Detecção de IgG sérica canina antígeno-específica por ELISA. Placa sensibilizada com 100 ng/poço da proteína recombinante indicadas. Soros dos animais dos grupos controle e imunizado em diferentes tempos experimentais foram usados como anticorpo primário (1:400). Anticorpo anti IgG canino-HRP (1:50.000) foi utilizado para detecção. O teste foi realizado em triplicata. Valores em Y representam média \pm SD da reação lida a 450 nm após revelação com TMB. Valores no eixo X representam os dias experimentais, sendo que as linhas tracejadas representam os dias das imunizações; infestação foi realizada no dia 187 (linha pontilhada); ponto de coleta após a quarta imunização (dia 98) e após a infestação (dia 200) A-I) Resultado para cada antígeno individual. A comparação estatística de médias foi realizada utilizando-se teste U de Mann-Whitney em GraphPad Prism 6.0; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

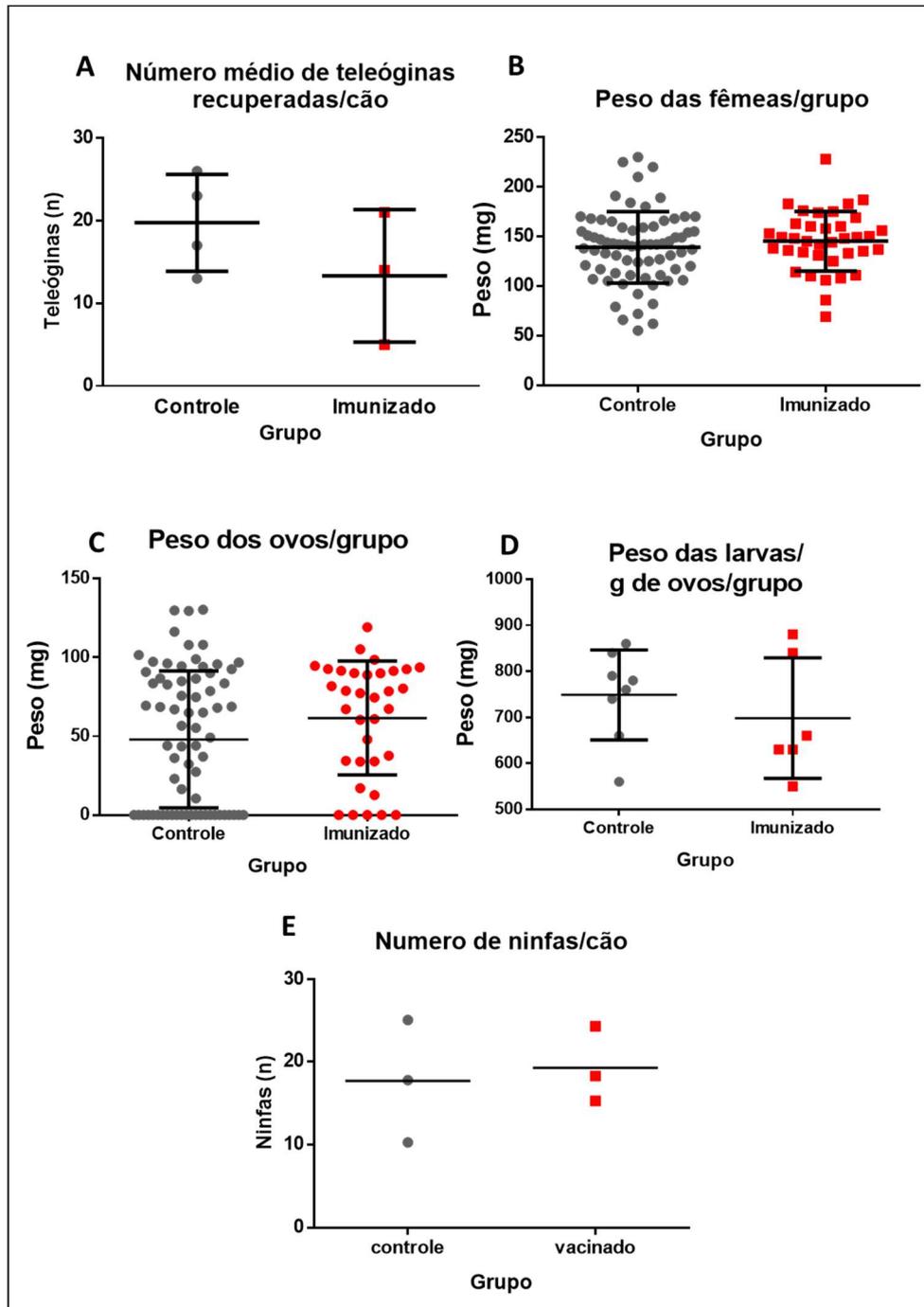
6.4. Infestação experimental dos cães com carrapatos *R. sanguineus*

Após 104 dias da quarta imunização, os animais foram infestados experimentalmente com carrapatos *R. sanguineus* para avaliação da eficácia vacinal. Para tal, os animais tiveram o dorso tricotomizado e receberam a instalação de três câmaras de alimentação, confeccionadas em plástico e borracha, coladas com um adesivo de contato (cola Brascoplast) e esparadrapo. Foram colocados colares elisabetanos em todos os cães e os mesmos foram mantidos em grupos de

2 a 4 animais por unidade do canil. Em cada câmara de alimentação foram colocados carrapatos *R. sanguineus* de uma única fase, sendo 350 larvas ou 100 ninfas ou 25 casais de carrapatos adultos. A infestação foi acompanhada diariamente, com abertura e limpeza das câmaras a partir do quarto dia de infestação e coleta dos carrapatos naturalmente destacados.

Quando da abertura das câmaras, os carrapatos já se encontravam fixados. Para as fases de larva e ninfa, os carrapatos destacados foram contados. Apenas um animal do grupo imunizado e um animal do grupo controle originaram larvas alimentadas, tendo sido recuperadas 339 larvas do animal do grupo controle e 119 larvas do animal do grupo imunizado. Três animais de cada um dos grupos experimentais apresentaram ninfas alimentadas, tendo sido recuperadas 212 ninfas ingurgitadas dos animais do grupo controle e 231 ninfas ingurgitadas dos animais do grupo imunizado. Para a fase de adulto, apenas quatro animais do grupo controle e três animais do grupo vacinado mantiveram as câmaras fixas até o final da infestação, tendo sido recuperados em média 19,75 carrapatos adultos/animal do grupo controle e 13,3 carrapatos/animal do grupo imunizado. O peso médio das fêmeas ingurgitadas adultas foi de 139 mg para o grupo controle, e de 145 mg para o grupo imunizado. As fêmeas adultas ingurgitadas foram incubadas em estufa B.O.D. (28°C, 85% umidade) para determinação do peso de ovos e taxa de eclosão das larvas. Após finalizar a incubação das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* recuperadas após a infestação experimental, foi possível avaliar a eficácia vacinal. Houve redução de 32% no número de fêmeas ingurgitadas no grupo vacinado quando comparado ao controle, enquanto uma redução de 5% na eclodibilidade das larvas foi observada no grupo imunizado (figura 18, tabela 2). Os demais parâmetros não foram afetados. A eficácia vacinal final foi calculada em 36%.

Figura 18. Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos *R. sanguineus* alimentados nos cães experimentais imunizados com nove proteínas recombinantes adjuvantadas com Alhydrogel®.



Parâmetros biológicos e reprodutivos dos carrapatos *R. sanguineus* recuperados da infestação de cães imunizados ou não com os antígenos recombinantes adjuvantados com Alhydrogel®. A) Média de teleóginas por animal B) Peso das teleóginas por grupo. C) Peso dos ovos por grupo D) Peso das larvas por grupo (mg/g de ovos) E) Número de ninfas por animal.

Tabela 8. Parâmetros biológicos e reprodutivos de carrapatos coletados de cães imunizados com nove antígenos recombinantes associados à Alhydrogel®.

Parâmetros avaliados	Grupo		TR*	**p-value
	Imunizado	Controle		
Número médio de teleóginas desprendidas/animal	13,3±6,5 (n=3)	19,75±5,06 (n=4)	32,4%	>0,999
Peso médio das teleóginas desprendidas/grupo (mg)	145,2±30,1 (n=3)	139,7±36,5 (n=4)	0%	0,857
Número médio de ninfas desprendidas/grupo	77±14 (n=3)	70,6±24 (n=3)	0%	0,9
Peso médio dos ovos/grupo	62,4 mg	47,35 mg	0%	0,857
Eclodibilidade/grupo	70,72%	74,45%	5%	
Eficácia vacinal* = 100[1 - (13,3/19,5) (70,72/74,45)] = 36%				

*TR: taxa de redução de cada parâmetro calculado através da fórmula: $100 \times [1 - \text{valor no grupo vacinado/valor no grupo controle}]$; quando o valor retornado é negativo, o percentual é considerado 0.

** Comparativo de médias realizado utilizando-se teste U de Mann-Whitney em GraphPad Prism 6.0.

Neste trabalho verificamos que uma vacina multicomponente baseada em antígenos secretados de carrapatos *R. microplus* foi capaz de induzir anticorpos específicos em cães quando administrada em conjunto com alumínio, além de ter induzido resposta cruzada potencialmente protetora contra o carrapato do cão, *R. sanguineus*. Embora tenha sido determinada a ocorrência de proteção vacinal considerando-se a fórmula matemática descrita anteriormente, este resultado deve ser cuidadosamente avaliado, visto que um pequeno número de animais do grupo imunizado (n=3) foi submetido à infestação experimental com sucesso. A repetição da fase de infestação experimental nos animais imunizados pode ser necessária, portanto, para que se possa definir qual a real contribuição da imunização sobre a imunidade anti-carrapatos nos cães experimentais.

De forma semelhante ao verificado para bovinos, os cães imunizados com os antígenos associados ao alumínio apresentaram soroconversão para todos os alvos inoculados. No entanto, nos cães a concentração de anticorpos se manteve estável por longos períodos após a última imunização, e não sofreu alteração na infestação-desafio. Apesar disso, a proteção vacinal calculada para cães foi menor do que a observada para bovinos (36 e 70%, respectivamente).

R. sanguineus é o principal carrapato parasita de cães no Brasil e em diversas regiões do mundo¹². Apesar de estar associado à transmissão de doenças potencialmente letais para humanos em alguns países^{8,149}, pouco é conhecido sobre a resposta imunológica dos hospedeiros contra este carrapato em comparação com *R. microplus*. O ciclo de vida do carrapato *R. sanguineus* inclui um sistema de alimentação em três hospedeiros, no qual o carrapato solta-se do cão em que está se alimentando logo após o ingurgitamento, realiza a muda no ambiente e busca por um novo hospedeiro para a próxima fase de alimentação. Este comportamento “promíscuo” torna o carrapato *R. sanguineus* um potente vetor de patógenos entre diferentes hospedeiros⁸. Embora tenha o cão como hospedeiro preferencial, os estágios imaturos podem parasitar roedores e pequenos mamíferos, enquanto carrapatos adultos oportunisticamente podem parasitar espécies maiores, tendo sido descritos em humanos com certa frequência^{150,151}. Para o repasto sanguíneo, o carrapato fixa suas peças bucais à pele do hospedeiro através de um cone de cemento e realiza a abertura da cavidade de alimentação. A formação e manutenção da cavidade de alimentação é dependente da ação da saliva do parasita, secretada em períodos alternados aos de ingestão de sangue¹⁷.

A saliva de carrapatos *R. sanguineus* contém diversas moléculas moduladoras da resposta imunológica do hospedeiro, incluindo vasodilatadores, anestésicos, anti-hemostáticos, moléculas imunossupressoras e componentes ligantes de histamina¹⁰⁹. Assim como para outros carrapatos, as atividades mediadas pela saliva são responsáveis pelo sucesso da alimentação do carrapato *R. sanguineus*²⁰. Cães imunizados com extrato de glândula salivar de *R. sanguineus* apresentam maior proteção contra a infestação do que cães imunizados com extrato intestinal ou após sucessivas infestações¹⁵², indicando que, assim como para bovinos, o uso de antígenos salivares como alvos vacinais pode exercer efeito protetor significativo sobre as infestações.

Como previamente descrito, os mecanismos de proteção associados à infestação por *R. sanguineus* estão pouco elucidados. Devido à heterogeneidade das respostas anti-carrapatos apresentada na população canina, a identificação de perfis de resposta associados à resistência e susceptibilidade de cães à infestação por *R. sanguineus* são mais difíceis de serem estabelecidos quando comparado ao carrapato bovino. Análises comparativas em busca de perfis de susceptibilidade e resistência são comumente realizadas utilizando-se cobaias como hospedeiros

resistentes, pois estas são capazes de desenvolver resposta protetora ao carrapato de forma rápida e crescente após sucessivas infestações¹⁷. Estudo realizado por Szabó e colaboradores¹⁵³ mostrou que não há diferença significativa na titulação de anticorpos totais IgG em cobaias e cães durante a infestação, embora os níveis de IgE circulantes sejam maiores nos cães. Os níveis de IgG ou IgE específicas para antígenos salivares totais também não é modulado diferencialmente nas duas espécies hospedeiros. No entanto, Ferreira e colaboradores¹⁵⁴ descrevem o reconhecimento diferencial de antígenos derivados de extrato de larva por soros de cães ou cobaias, sendo que o soro de cobaias reconhece um maior número de antígenos provenientes do carrapato. Estes resultados são semelhantes àqueles descritos por Garcia¹⁴⁰, e indicam que, também neste modelo, a eficácia da resposta imunológica pode estar relacionada à especificidade do antígeno. A expansão da base de dados de proteínas de carrapatos *R. sanguineus* é relevante para a identificação de antígenos potencialmente protetores para esta espécie e homólogos à antígenos de *R. microplus*, visando o desenvolvimento de uma vacina compartilhada.

Análise do transcriptoma salivar de carrapatos *R. sanguineus* alimentados por três ou cinco dias em cães foi realizado por Anatriello e colaboradores⁵⁰ com uso do sequenciamento Sanger de bibliotecas de cDNA dos transcritos salivares totais. Assim como já é descrito para *R. microplus*⁶³, a principal classe de proteínas secretadas identificada foi a de lipocalinas, responsável pela ligação e inativação de molécula pequenas, como a histamina¹⁴⁵. Em seguida, encontram-se presentes de forma significativa proteínas ricas em glicina, inibidores de proteases, peptídeos antimicrobianos, proteínas imunossupressoras da família Dap36 e evasinas, mucinas, metaloproteases e proteínas de cemento⁵⁰. A maquinaria salivar apresentada por *R. sanguineus* assemelha-se àquela identificada para outros carrapatos^{63,155,156}, sugerindo mecanismos conservados de alimentação e necessidade de evasão da resposta imunológica do hospedeiro entre as diferentes espécies.

A utilização de uma região peptídica da proteína P0 (antígeno estrutural presente em diferentes carrapatos) como vacina conjugada em coelhos infestados com carrapatos *R. sanguineus* foi capaz de afetar diversos parâmetros do hospedeiro, promovendo proteção de 90%¹⁵⁷. O mesmo antígeno apresentou atividade protetora contra *R. microplus*¹²⁸, confirmando que respostas cruzadas

entre os dois carrapatos são factíveis para o desenvolvimento de uma vacina comum. De forma complementar, o uso do antígeno Bm86 (isolado de carrapatos bovinos) para a imunização de cães infestados com *R. sanguineus* também se mostrou eficiente contra a infestação¹⁵⁸. A alta similaridade entre as sequências destes antígenos expressos no carrapato bovino e canino indicam que a seleção de antígenos homólogos pode ser uma ferramenta útil para o desenvolvimento de uma vacina anti-carrapatos única para diferentes espécies.

A homologia entre antígenos de *R. microplus* e antígenos de carrapatos *R. sanguineus* patenteada pelo nosso grupo para uso vacinal foi previamente avaliada por Anatriello⁶⁴. De modo geral, pouca homologia foi encontrada entre as sequências dos dois carrapatos, embora as funções preditas se sobrepusessem. Um dos motivos para tal é a baixa qualidade de transcritos anotados de *R. sanguineus*, o que coloca em dúvida se a ausência de alta homologia se deve de fato às variações antigênicas entre os carrapatos ou a artefatos. Apenas dois transcriptomas de carrapatos *R. sanguineus* encontram-se publicados até o momento, um dos quais publicados apenas no último ano^{50,159}. O uso de bases de dados de carrapatos relacionados apresenta-se como uma alternativa para a seleção de antígenos vacinais para *R. sanguineus* através da função predita *in silico*.

Utilizando esta estratégia de seleção de antígenos de acordo com a classe funcional predita, Anatriello⁶⁴ avaliou a eficácia vacinal de um *pool* de sete antígenos de carrapatos *R. microplus* contra a infestação por *R. sanguineus*, obtendo uma eficácia de 80%. Devido às limitações de produção de proteínas recombinantes, dentre os antígenos previamente testados por Anatriello, apenas o antígeno 2879-MLD esteve presente em nossa construção final. Outros antígenos foram substituídos por sequências de função semelhante, enquanto alguns como 76-IgBP e 274-HBP não contavam com homólogos para substituição. É possível que a diferença de resposta observada esteja relacionada à ausência de alvos que parecem ter grande importância no processo de alimentação, como proteínas ligantes de imunoglobulina e histamina. Ainda, ambas as vacinas contam com sistemas de entrega bastante diferentes, proteína ou DNA recombinante. Sendo o carrapato um organismo eucarioto, é possível que o sistema de expressão em *E. coli* seja menos eficiente do que o sistema de DNA em produzir os antígenos de interesse com estrutura semelhantes àquele naturalmente expressos pelo parasita.

O sistema de entrega por DNA apresenta-se mais promissor para a manutenção da estrutura original do antígeno expresso.

Diversos trabalhos mostram que a resposta imunológica local estimulada pela infestação ou inoculação de extrato de glândula salivar de *R. sanguineus* difere significativamente entre cães e modelos animais mais resistentes a carrapatos. Enquanto o extrato salivar de carrapatos é capaz de induzir uma forte resposta de hipersensibilidade tardia em cobaias, com predominância de infiltrados celulares basofílicos na pele, em cães ocorre uma resposta de hipersensibilidade imediata do tipo I, caracterizada pela degranulação de mastócitos no local da aplicação^{160,161}. Os antígenos recombinantes produzidos nesta tese não foram capazes de induzir resposta de hipersensibilidade imediata ou tardia quando inoculados intradermicamente nos cães imunizados. Os antígenos testados por Anatriello, no entanto⁶⁴, apresentaram a indução de hipersensibilidade tardia em cobaias inoculadas com as vacinas de DNA. Estes dados indicam que a triagem prévia de antígenos com a indução de respostas cutâneas tardias, associadas com a proteção contra carrapatos, pode auxiliar na escolha de alvos mais protetores para cães no futuro.

Os resultados aqui demonstrados, em conjunto com os dados previamente publicados por nosso grupo, evidenciam que o desenvolvimento de uma vacina multicomponente capaz de proteger bovinos e cães de infestações por carrapatos é exequível. Porém, novos sistemas de seleção, produção e entrega de antígenos podem ser necessários para que a construção multivalente apresente resultados ainda melhores de proteção contra ambas as espécies de carrapato.

7 Considerações finais e perspectivas futuras

Neste trabalho, nós selecionamos e produzimos, de forma recombinante, antígenos secretados identificados em sialotranscriptomas de carrapatos *R. microplus*. Estes antígenos foram capazes de induzir resposta imune humoral específica nos animais imunizados, bem como protegê-los, mesmo que parcialmente, da infestação por carrapatos *R. microplus* e *R. sanguineus*. O principal efeito das vacinas foi sobre a redução do número de teleóginas ao final da infestação dos animais imunizados, um resultado facilmente visualizado pelo produtor/proprietário, caso a vacina seja comercializada. Isso estimularia a adoção de um regime de vacinação sistemática contra carrapatos, podendo levar ao estabelecimento da imunidade dos rebanhos. Ainda, uma única formulação multicomponente foi capaz de induzir resposta protetora em hospedeiros bovinos e apresentou potencial para proteger também hospedeiros caninos contra as infestações por carrapatos *R. microplus* e *R. sanguineus*, respectivamente, indicando ser possível a produção de uma vacina anti-carrapatos multicomponente comum para ambas as espécies.

Embora o efeito protetor da formulação multicomponente tenha sido observado, os mecanismos indutores de imunidade protetora não foram elucidados neste trabalho. Entender como se desenvolve a imunidade protetora contra antígenos específicos é essencial para o desenvolvimento e triagem racional de novos antígenos a serem testados como vacinas de subunidade associadas ou não a outros antígenos. Entender como se estabelece a imunidade protetora pode ser importante também para desvendar mecanismos associados à resistência e susceptibilidade mediada por variabilidade genética, o que pode auxiliar no delineamento mais eficaz de estratégias de seleção de animais resistentes para composição dos rebanhos bovinos.

Por fim, este trabalho mostra que antígenos salivares são indutores de resposta imunológica de memória capaz de ser reestimulada pela infestação natural para bovinos, o que pode levar ao aumento progressivo da proteção vacinal, ou ao menos estabelecimento de níveis estáveis de componentes imunológicos protetores nos rebanhos vacinados. A continuidade deste trabalho, através da caracterização dos mecanismos protetores induzidos pela vacinação, produção e teste de novos antígenos e construção de vacinas baseadas em epítomos das diversas proteínas testadas, apresenta potencial para a produção de uma vacina comercial anti-

carrapatos capaz de diminuir os prejuízos e transmissão de doenças associados à infestação por estes parasitas.

Referências bibliográficas

- 1 STEINFELD, H. et al. Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options. Rome, FAO, 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/010/a0701e/a0701e00.HTM>>. Acesso em: 23/06/2018.
- 2 FAOSTAT. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QA>>. Acesso em: 23/06/2018.
- 3 FAO. Mapping supply and demand for animal source foods to 2030. Animal Production and Health Working Paper. No 2. FAO, 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/014/i2425e/i2425e00.pdf>>. Acesso em: 23/06/2018.
- 4 FAO. World Livestock 2011: Livestock in food security world. Rome, FAO, 2011. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/014/i2373e/i2373e.pdf>>. Acesso em: 23/06/2018.
- 5 FAO. Livestock contribution to food security in the Near East and North Africa. FAO Regional Conference for the Near East, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-mp852e.pdf>>. Acesso em: 23/06/2018.
- 6 THORNTON, P. K. Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 365, n. 1554, p. 2853–2867, 2010.
- 7 TAYLOR, L. H.; LATHAM, S. M.; WOOLHOUSE, M. E. J. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 356, n. 1411, p. 983–989, 2001.
- 8 JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. *Parasitology*, v. 129 Suppl, n. 07, p. S3-14, 2004.
- 9 GEBREYES, W. A. et al. The global One Health paradigm: challenges and opportunities for tackling infectious diseases at the human, animal, and environment interface in low-resource settings. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 11, p. e3257, 2014.
- 10 ROBINSON, T. P. et al. Mapping the global distribution of livestock. *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, p. e96084, 2014.
- 11 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.
- 12 VIEIRA, A. Manual de vigilância acarológica São Paulo: Secretaria Estadual de Saúde do Estado de São Paulo, Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), 2002. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/downloads/arquivos-de-febre-maculosa/manual_de_vigilancia_acarologica_2004.pdf>. Acesso em 23/06/2018.
- 13 RODRIGUEZ-VIVAS, R. I. et al. The prevalence of pyrethroid resistance phenotype and genotype in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, v. 184, n. 2–4, p. 221–229, 2012.
- 14 ESTRADA-PEÑA, A. et al. The known distribution and ecological preferences of

- the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental and Applied Acarology*, v. 38, n. 2–3, p. 219–235, 2006.
- 15 FUENTE, J. DE LA. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience*, n. 13, p. 6938, 2008.
- 16 GROVES, M. G. et al. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American journal of veterinary research*, v. 36, n. 7, p. 937–40, 1975.
- 17 DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary parasitology*, v. 152, n. 3–4, p. 173–85, 2008.
- 18 DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends in Parasitology*, v. 28, n. 10, p. 437–446, 2012.
- 19 RAJPUT, Z. I. et al. Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *Journal of Zhejiang University Science B*, v. 7, n. 11, p. 912–921, 2006.
- 20 WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. *Parasitology*, v. 129 Suppl, n. 7, p. S367-87, 2004.
- 21 DUTTA, S. et al. Detection of amitraz and malathion resistance in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Jammu region of India. *Experimental and Applied Acarology*, v. 71, n. 3, p. 291–301, 2017.
- 22 MUYOBELA, J.; NKUNIKA, P. O. Y.; MWASE, E. T. Resistance status of ticks (Acari: Ixodidae) to amitraz and cypermethrin acaricides in Isoka District, Zambia. *Tropical Animal Health and Production*, v. 47, n. 8, p. 1599–1605, 2015.
- 23 RODRÍGUEZ-HIDALGO, R. et al. The current status of resistance to alpha-cypermethrin, ivermectin, and amitraz of the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) in Ecuador. *PLOS ONE*, v. 12, n. 4, p. e0174652, 2017.
- 24 RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research*, v. 117, n. 1, p. 3–29, 2018.
- 25 EIDEN, A. L. et al. Detection of permethrin resistance and fipronil tolerance in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the United States. *Journal of Medical Entomology*, v. 52, n. 3, p. 429–436, 2015.
- 26 RODRIGUEZ-VIVAS, R. I. et al. First report of amitraz and cypermethrin resistance in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato infesting dogs in Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 31, n. 1, p. 72–77, 2017.
- 27 RODRIGUEZ-VIVAS, R. I. et al. First documentation of ivermectin resistance in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v. 233, p. 9–13, 2017.
- 28 PARIZI, L. F. et al. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. *Veterinary Journal*, v. 194, n. 2, p. 158–165, 2012.
- 29 ALLEN, J. R.; HUMPHREYS, S. J. Immunisation of guinea pigs and cattle against

ticks. *Nature*, v. 280, n. 5722, p. 491–493, 1979.

30 FRAGOSO, H. et al. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *off. Vaccine*, v. 16, n. 20, p. 1990–2, 1998.

31 VALLE, M. R. et al. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac. *Experimental & Applied Acarology*, v. 34, n. 3–4, p. 375–82, 2004.

32 GARCÍA-GARCÍA, J. C. et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*, v. 18, n. 21, p. 2275–87, 2000.

33 DE LA FUENTE, J. et al. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal health research reviews*, v. 8, n. 1, p. 23–8, 2007.

34 RODRÍGUEZ, M. et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Veterinary Parasitology*, v. 57, n. 4, p. 339–349, 1995.

35 MILLER, R. et al. Exploring the use of an anti-tick vaccine as a tool for the integrated eradication of the cattle fever tick, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Vaccine*, v. 30, n. 38, p. 5682–5687, 2012.

36 TRIMNELL, A. R. et al. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*, v. 23, n. 34, p. 4329–41, 2005.

37 RODRÍGUEZ-VALLE, M. et al. Efficacy of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 against *Hyalomma dromedarii* and *Amblyomma cajennense* tick infestations in camels and cattle. *Vaccine*, v. 30, n. 23, p. 3453–3458, 2012.

38 VARGAS, M. et al. Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavac plus vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. *BMC Veterinary Research*, v. 6, n. 1, p. 1, 2010.

39 RODRÍGUEZ, M. et al. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. *Vaccine*, v. 13, n. 18, p. 1804–8, 1995.

40 DALTON, J.; MULCAHY, G. Parasite vaccines — a reality? *Veterinary Parasitology*, v. 98, n. 1–3, p. 149–167, 2001.

41 DE LA FUENTE, J.; CONTRERAS, M. Tick vaccines: Current status and future directions. *Expert Review of Vaccines*, v. 14, n. 10, p. 1367–1376, 2015.

42 TRAGER, W. Acquired Immunity to Ticks. *The Journal of Parasitology*, v. 25, n. 1, p. 57, 1939.

43 DE LA FUENTE, J. et al. Subolesin/akirin vaccines for the control of arthropod vectors and vectorborne pathogens. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 60, n. SUPPL.2, p. 172–178, 2013.

44 GUERRERO, F. D. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. *Parasites and*

Vectors, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2014.

45 VALLE, M. R.; GUERRERO, F. D. Anti-tick vaccines in the omics era. *Frontiers in Bioscience (Elite edition)*, v. 10, n. 2, p. 122–136, 2018.

46 BERGMAN, D. Mouthparts and feeding mechanisms of haematophagous arthropods. In: WIKEL, S. K. (Ed.). *The Immunology of Host- Ectoparasitic Arthropod Relationships*. CAB International, Wallingford, U.K., p. 30–61, 1996.

47 ALLEN, J. R.; KHALIL, H. M.; GRAHAM, J. E. The location of tick salivary antigens, complement and immunoglobulin in the skin of guinea-pigs infested with *Dermacentor andersoni* larvae. *Immunology*, v. 38, n. 3, p. 467–72, 1979.

48 FRANCISCHETTI, I. M. B. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, v. 56, n. 7, p. 1130–44, 2010.

49 FRANCISCHETTI, IVO, M. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience*, n. 14, p. 2051, 2009.

50 ANATRIELLO, E. et al. An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *BMC Genomics*, v. 11, n. 1, 2010.

51 PETERKOVÁ, K. et al. Immunomodulatory arsenal of nymphal ticks. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 22, n. 2, p. 167–171, 2008.

52 SCHOELER, G. B.; MANWEILER, S. A.; WIKEL, S. K. *Ixodes scapularis*: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. *Experimental Parasitology*, v. 92, n. 4, p. 239–248, 1999.

53 BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Immunology of interactions between ticks and hosts. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 11, n. 3, p. 270–6, 1997.

54 CARVALHO, W. A. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Experimental parasitology*, v. 118, n. 4, p. 587–91, 2008.

55 BECHARA, G. H.; MORELLI JÚNIOR, J.; SZABÓ, M. P. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, n. 1, p. 570–5, 2000.

56 FERREIRA, B. R. et al. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. *Veterinary parasitology*, v. 115, n. 1, p. 35–48, 2003.

57 WIKEL, S. K. Tick-host-pathogen systems immunobiology: an interactive trio. *Frontiers in Bioscience*, v. 23, p. 265–283, 2018.

58 KOTSYFAKIS, M. et al. Cutting edge: Immunity against a “silent” salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 8, p. 5209–5212, 2008..

59 RAPPUOLI, R. From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. *Nature Medicine*, v. 10, n. 11, p. 1177–1185, 2004.

- 60 FLEISCHMANN, R. D. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, v. 269, n. 5223, p. 496–512, 1995.
- 61 RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*, v. 3, p. 445–450, 2000.
- 62 ANDREOTTI, R.; GIACHETTO, P. F.; CUNHA, R. C. Advances in tick vaccinology in Brazil: from gene expression to immunoprotection. *Frontiers in Bioscience (Scholar edition)*, v. 10, p. 127–142, 2018.
- 63 MARUYAMA, S. R. et al. Mining a differential sialotranscriptome of *Rhipicephalus microplus* guides antigen discovery to formulate a vaccine that reduces tick infestations. *Parasites and Vectors*, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2017.
- 64 ANATRIELLO, E. Vacina de DNA multicomponente baseada em genes codificantes de proteínas salivares de *Rhipicephalus microplus* induz imunidade cruzada contra infestações por *Rhipicephalus sanguineus* em camundongos e cães. Universidade de São Paulo, 2012.
- 65 GARCIA, G. R. Estudo do proteoma e imunoproteoma salivar do carrapato de bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para identificação e caracterização de antígenos silenciosos. Universidade de São Paulo, 2013.
- 66 SANTOS, I. K. F. DE M. et al. Processo de seleção de antígenos de carrapatos e composições antigênicas anticarrapatos. Brasil, 2013.
- 67 ALMAZÁN, C. et al. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine*, v. 30, n. 2, p. 265–272, 2012.
- 68 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.
- 69 MORENO-CID, J. A. et al. Control of multiple arthropod vector infestations with subolesin/akirin vaccines. *Vaccine*, v. 31, n. 8, p. 1187–1196, 2013.
- 70 SHI, Y. P. et al. Development, expression, and murine testing of a multistage *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate. *Vaccine*, v. 18, n. 25, p. 2902–2914, 2000.
- 71 CAI, Q. et al. Immunogenicity and *in vitro* protective efficacy of a polyepitope *Plasmodium falciparum* candidate vaccine constructed by epitope shuffling. *Vaccine*, v. 25, n. 28, p. 5155–5165, 2007.
- 72 SKEIKY, Y. A. W. et al. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *The Journal of Immunology*, v. 172, n. 12, p. 7618–7628, 2004.
- 73 TONEATTO, D. et al. The first use of an investigational multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) in humans. *Human Vaccines*, v. 7, n. 6, p. 646–653, 2011.
- 74 OLIVER, J. H. Biology and systematics of ticks (Acari:Ixodida). *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 20, n. 1, p. 397–430, 1989.
- 75 NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J. R. Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from tick-sensitized guinea-pigs. *Immunology*, v. 55, n. 1, p. 157–63,

1985.

76 TRIMNELL, A. R.; HAILS, R. S.; NUTTALL, P. A. Dual action ectoparasite vaccine targeting “exposed” and “concealed” antigens. *Vaccine*, v. 20, n. 29–30, p. 3560–3568, 2002.

77 HAVLÍKOVÁ, S. et al. Functional role of 64P, the candidate transmission-blocking vaccine antigen from the tick, *Rhipicephalus appendiculatus*. *International Journal for Parasitology*, v. 39, n. 13, p. 1485–1494, 2009.

78 LABUDA, M. et al. An antivector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathogens*, v. 2, n. 4, p. e27, 2006.

79 CHANG, C.; WERB, Z. CHANG, Chieh; WERB, Zena. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in cell biology*, v. 11, p. S37-S43, 2001.

80 FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 305, n. 4, p. 869–75, 2003.

81 FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 94, n. 1, p. 167–74, 2005.

82 GUO, X. et al. Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 6, p. 2320–2329, 2009.

83 DECREM, Y. et al. The impact of gene knock-down and vaccination against salivary metalloproteases on blood feeding and egg laying by *Ixodes ricinus*. *International Journal for Parasitology*, v. 38, n. 5, p. 549–60, 2008.

84 ALI, A. et al. Immunoprotective potential of a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* metalloprotease. *Veterinary Parasitology*, v. 207, n. 1–2, p. 107–114, 15 2015.

85 JASINSKAS, A.; BARBOUR, A. G. The Fc fragment mediates the uptake of immunoglobulin C from the midgut to hemolymph in the ixodid tick *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 42, n. 3, p. 359–66, 2005.

86 WANG, H.; NUTTALL, P. A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology*, v. 109, n. 4, p. 525–530, 1994.

87 WANG, H.; NUTTALL, P. A. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, v. 56, n. 3–4, p. 286–295, 1999.

88 ZANGIROLAMO, A. F. Associação de alótipos de IgG1 e IgG2 bovina com raças geneticamente resistentes e suscetíveis a carrapatos e suas interações com a proteína ligante de IgG (IGBP-C) da saliva do carrapato do boi *Rhipicephalus microplus*. Universidade de São Paulo, 2017.

89 VALDÉS, J. J. Antihistamine response: a dynamically refined function at the host-

tick interface. *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 491, 2014.

90 SANGAMNATDEJ, S. et al. A high affinity serotonin and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect Molecular Biology*, v. 11, n. 1, p. 79–86, 2002.

91 PAESEN, G. C. et al. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Molecular Cell*, v. 3, n. 5, p. 661–71, 1999.

92 KONNAI, S. et al. Molecular identification and expression analysis of lipocalins from blood feeding taiga tick, *Ixodes persulcatus*. *Experimental Parasitology*, v. 127, n. 2, p. 467–474, 2011.

93 BARRATT-DUE, A. et al. *Ornithodoros moubata* complement inhibitor is an equally effective C5 inhibitor in pigs and humans. *The Journal of Immunology*, v. 187, n. 9, p. 4913–4919, 2011.

94 MANS, B. J.; RIBEIRO, J. M. C. Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, n. 9, p. 841–52, 2008.

95 RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology*, v. 48, n. 1, p. 73–88, 2003.

96 ASSUMPÇÃO, T. C. F. et al. Salivary antigen-5/CAP family members are Cu²⁺-dependent antioxidant enzymes that scavenge O₂^{•-} and inhibit collagen-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative burst. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 20, p. 14341–61, 2013.

97 LI, W. F.; MA, G. X.; ZHOU, X. X. Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure–function relationships and mode of action. *Peptides*, v. 27, n. 9, p. 2350–2359, 2006.

98 INOHARA, N.; NUÑEZ, G. ML – a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 27, n. 5, p. 219–221, 2002.

99 IMLER, J. L. et al. LPS-induced immune response in *Drosophila*. *Journal of Endotoxin Research*, v. 6, n. 6, p. 459–62, 2000.

100 HAJDUŠEK, O. et al. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, p. 26, 2013.

101 FOGAÇA, A. C. et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: Isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 28, n. 3, p. 191–200, 2004.

102 CHRUDIMSKÁ, T. et al. New defensins from hard and soft ticks: similarities, differences, and phylogenetic analyses. *Veterinary Parasitology*, v. 167, n. 2–4, p. 298–303, 2010.

103 TSUJI, N. et al. Babesial vector tick defensin against *Babesia sp.* parasites. *Infection and Immunity*, v. 75, n. 7, p. 3633–3640, 2007.

104 ANGUITA, J. et al. Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation. *Immunity*, v. 16, n. 6, p. 849–859, 1 jun. 2002.

105 SCHUIJT, T. J. et al. The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of

- serum-sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 7, p. 2888–2894, 2008.
- 106 HOVIUS, J. W. R. et al. Identification of Salp15 Homologues in *Ixodes ricinus* Ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 7, n. 3, p. 296–303, 2007.
- 107 MORI, A. et al. Two novel Salp15-like immunosuppressant genes from salivary glands of *Ixodes persulcatus* Schulze tick. *Insect Molecular Biology*, v. 19, n. 3, p. 359–365, 2010.
- 108 VANČOVÁ, I. et al. Anti-chemokine activities of ixodid ticks depend on tick species, developmental stage, and duration of feeding. *Veterinary Parasitology*, v. 167, n. 2–4, p. 274–278, 2010.
- 109 VALENZUELA, J. G. Exploring tick saliva: from biochemistry to ‘sialomes’ and functional genomics. *Parasitology*, v. 129, n. 7, p. S83–S94, 2004.
- 110 DI CERA, E. Serine proteases. *IUBMB Life*, v. 61, n. 5, p. 510–515, 2009.
- 111 LEE, W. L.; DOWNEY, G. P. Leukocyte Elastase. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 164, n. 5, p. 896–904, 2001.
- 112 GINZBERG, H. H. et al. Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 281, n. 3, p. G705–G717, 2001.
- 113 WEINRAUCH, Y. et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature*, v. 417, n. 6884, p. 91–94, 2002.
- 114 MAJEWSKI, P. et al. Inhibitors of serine proteases in regulating the production and function of neutrophil extracellular traps. *Frontiers in immunology*, v. 7, p. 261, 2016.
- 115 STAPELS, D. A. C. et al. *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 36, p. 13187–13192, 2014.
- 116 CORRAL-RODRÍGUEZ, M. Á. et al. Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 39, n. 9, p. 579–595, 2009.
- 117 KWONG, P. D. et al. Structure of β 2-bungarotoxin: potassium channel binding by Kunitz modules and targeted phospholipase action. *Structure*, v. 3, n. 10, p. 1109–1119, 1995.
- 118 SASAKI, S. D.; TANAKA, A. S. rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick *Boophilus microplus*, its cloning, expression and biochemical characterization. *Veterinary Parasitology*, v. 155, n. 1–2, p. 133–141, 2008.
- 119 PREVOT, P.-P. et al. Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine*, v. 25, n. 17, p. 3284–92, 2007.
- 120 VAN DE LOCHT, A. et al. The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *The EMBO Journal*, v. 15, n. 22, p. 6011–7, 1996.
- 121 MACEDO-RIBEIRO, S. et al. Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PloS*

One, v. 3, n. 2, p. e1624, 2008.

122 MANS, B. J. et al. Comparative sialomics between hard and soft ticks: implications for the evolution of blood-feeding behavior. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, n. 1, p. 42–58, 2008.

123 GONG, H. et al. Characterization of a carboxypeptidase inhibitor from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Insect Physiology*, v. 53, n. 10, p. 1079–1087, 2007.

124 SHELDON, T. J. et al. A novel family of single VWC-domain proteins in invertebrates. *FEBS Letters*, v. 581, n. 27, p. 5268–5274, 2007.

125 WANG, H. et al. Male ticks help their mates to feed. *Nature*, v. 391, n. 6669, p. 753, 1998.

126 ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, n. APR, p. 1–17, 2014.

127 CANALES, M. et al. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnology*, v. 9, n. 1, p. 29, 2009.

128 RODRÍGUEZ-MALLON, A. et al. High efficacy of a 20 amino acid peptide of the acidic ribosomal protein P0 against the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 6, n. 4, p. 530–537, 2015.

129 LONE, N. A.; SPACKMAN, E.; KAPCZYNSKI, D. Immunologic evaluation of 10 different adjuvants for use in vaccines for chickens against highly pathogenic avian influenza virus. *Vaccine*, v. 35, n. 26, p. 3401–3408, 2017.

130 BARASUOL, B. M. et al. New insights about functional and cross-reactive properties of antibodies generated against recombinant TbpBs of *Haemophilus parasuis*. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 10377, 2017.

131 PETERMANN, J. et al. Evaluation of three adjuvants with respect to both adverse effects and the efficacy of antibody production to the Bm86 protein. *Experimental and Applied Acarology*, v. 72, n. 3, p. 303–315, 2017.

132 CAMPOS, A. C. et al. Efficiency of inactive vaccines against contagious agalactia in Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 65, n. 5, p. 1394–1402, 2013.

133 SCHETTERS, T. et al. Cattle tick vaccine researchers join forces in CATVAC. *Parasites and Vectors*, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2016.

134 ROBERTS, J. A.; KERR, J. D. *Boophilus microplus*: Passive transfer of resistance in cattle. *The Journal of Parasitology*, v. 62, n. 3, p. 485–489, 1976.

135 DE LA FUENTE, J. et al. Strategies for new and improved vaccines against ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*, v. 38, n. 12, p. 754–769, 2016.

136 REHAV, Y. Resistance of Brahman and Hereford cattle to African ticks with reference to serum gamma globulin levels and blood composition. *Experimental & Applied Acarology*, v. 3, n. 3, p. 219–232, 1987.

- 137 PIPER, E. K. et al. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 126, n. 1–2, p. 110–9, 2008.
- 138 PIPER, E. K. et al. Peripheral cellular and humoral responses to infestation with the cattle tick *Rhipicephalus microplus* in Santa Gertrudis cattle. *Parasite Immunology*, v. 39, n. 1, p. e12402, 2017.
- 139 KASHINO, S. S. et al. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Experimental Parasitology*, v. 110, n. 1, p. 12–21, 2005.
- 140 GARCIA, G. R. et al. Immune recognition of salivary proteins from the cattle tick *Rhipicephalus microplus* differs according to the genotype of the bovine host. *Parasites & Vectors*, v. 10, n. 1, p. 144, 2017.
- 141 PLOTKIN, S. A. Vaccines: Correlates of Vaccine-Induced Immunity. *Clinical Infectious Diseases*, v. 47, n. 3, p. 401–409, 2008.
- 142 BURTON, D. R. et al. Broadly neutralizing antibodies present new prospects to counter highly antigenically diverse viruses. *Science*, v. 337, n. 6091, p. 183–186, 2012.
- 143 CARVALHO, W. A. et al. Modulation of cutaneous inflammation induced by ticks in contrasting phenotypes of infestation in bovines. *Veterinary parasitology*, v. 167, n. 2–4, p. 260–73, 2010.
- 144 FRANZIN, A. M. et al. Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Parasites and Vectors*, v. 10, n. 1, p. 1–24, 2017.
- 145 RODRIGUEZ-VALLE, M. et al. *Rhipicephalus microplus* lipocalins (LRMs): Genomic identification and analysis of the bovine immune response using *in silico* predicted B and T cell epitopes. *International Journal for Parasitology*, v. 43, n. 9, p. 739–752, 2013.
- 146 KUBO, M. Mast cells and basophils in allergic inflammation. *Current Opinion in Immunology*, v. 54, p. 74–79, 2018.
- 147 KANEKO, M. et al. Allergen-specific IgG1 and IgG3 through FcγRII induce eosinophil degranulation. *Journal of Clinical Investigation*, v. 95, n. 6, p. 2813–2821, 1995.
- 148 DELAFUENTE, J. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine*, v. 16, n. 4, p. 366–373, 1998.
- 149 DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & vectors*, v. 1, n. 1, p. 25, 2008.
- 150 DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A. Canine babesiosis: a Brazilian perspective. *Veterinary Parasitology*, v. 141, n. 3–4, p. 197–203, 2006.
- 151 RECK, J. et al. Records of ticks on humans in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2018.
- 152 JITTAPALAPONG, S. et al. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus*

(Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. *Journal of Medical Entomology*, v. 37, n. 4, p. 601–11, 2000.

153 SZABÓ, M. P. J. et al. Antibody and blood leukocyte response in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) tick-infested dogs and guinea pigs. *Veterinary Parasitology*, v. 115, n. 1, p. 49–59, 2003.

154 FERREIRA, B. R.; MACHADO, R. Z.; BECHARA, G. H. Western blot analysis of tick antigens from a *Rhipicephalus sanguineus* unfed larval extract and identification of antigenic sites in tick sections using immunohistochemistry. A comparative study between resistant and susceptible host species. *Veterinary Parasitology*, v. 62, n. 1–2, p. 161–174, 1996.

155 BATISTA, I. F. C. et al. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, v. 51, n. 5, p. 823–34, 2008.

156 DE CASTRO, M. H. et al. De novo assembly and annotation of the salivary gland transcriptome of *Rhipicephalus appendiculatus* male and female ticks during blood feeding. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7, n. 4, p. 536–548, 2016.

157 RODRÍGUEZ-MALLON, A. et al. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine*, v. 30, n. 10, p. 1782–1789, 2012.

158 PEREZ-PEREZ, D. et al. Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, v. 167, n. 2–4, p. 321–326, 2010.

159 DE MARCO, L. et al. Transcriptome of larvae representing the *Rhipicephalus sanguineus* complex. *Molecular and Cellular Probes*, v. 31, p. 85–90, 2017.

160 SZABÓ, M. P. J.; MORELLI, J.; BECHARA, G. H. Cutaneous hypersensitivity induced in dogs and guinea-pigs by extracts of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Experimental & applied acarology*, v. 19, n. 12, p. 723–30, 1995.

161 SZABÓ, M. P.; BECHARA, G. H. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. *Experimental & applied acarology*, v. 23, n. 11, p. 915–28, 1999.

Apêndice I - Calendários de experimentação animal

Tabela 8. Calendário de atividades do experimento de imunização de bovinos I

Dia	Atividade
D-57	Exame físico, coleta de sangue, pesagem
D-50	Infestações para randomização, coleta de sangue
D-49, D-48	Infestações para randomização
D-35	Coleta de sangue
D-30	Início da contagem de teleóginas para randomização
D-20	Fim da coleta de teleóginas para randomização, coleta de sangue
D-7	Exame físico, coleta de sangue, pesagem
D-5	Coleta de sangue (soro e isolamento de células PBMC)
D0	Coleta de sangue, exame físico, pesagem 1ª vacinação
D+5, D+10, D+15 e D+20	Coleta de sangue
D+21	Exame Físico, coleta de sangue, pesagem
D+25	Coleta de sangue
D+28	Coleta de sangue 2ª vacinação
D+33, D+36, D+39	Coleta de sangue
D+42	Coleta de sangue, exame físico, pesagem
D+45, D+48	Coleta de sangue
D+59	Coleta de sangue 3ª vacinação
D+62	Coleta de sangue, exame físico, pesagem
D+65, D+68, D+71	Coleta de sangue
D+72, D+73	Coleta de sangue para isolamento de células – PBMC
D+74	Infestação – 1ª aplicação de larvas
D+75	Infestação – 2ª aplicação de larvas
D+76	Infestação – 3ª aplicação de larvas
D+84	Coleta de sangue, exame físico, pesagem
D+97	Início da coleta de teleóginas
D+104	Coleta de sangue, exame físico, pesagem
D+109	Fim da coleta de teleóginas
D+117	Início da pesagem de ovos
D+129	Fim da pesagem de ovos
D_ 142	Início da pesagem de larvas
D+150	Fim da pesagem de larvas

Tabela 9. Calendário de atividades do experimento de imunização de bovinos II

Dia	Atividade
D-31	Exame físico, coleta de sangue, pesagem
D-31 a D-29	Contagem de teleóginas para randomização
D-21, D-14	Coleta de sangue
D-5	Coleta de sangue (soro e isolamento de células PBMC)
D0	Coleta de sangue, exame físico, pesagem 1ª vacinação
D+7	Coleta de sangue, exame físico, pesagem
D+14, D+21	Coleta de sangue
D+28	Coleta de sangue, exame físico, pesagem 2ª vacinação
D+35	Coleta de sangue, exame físico, pesagem
D+42, D+49	Coleta de sangue
D+56	Coleta de sangue, exame físico, pesagem 3ª vacinação
D+63	Coleta de sangue, exame físico, pesagem
D+70, D+77	Coleta de sangue
D+79 a D+83	Coleta de sangue para isolamento de células – PBMC
D+84	Infestação – 1ª aplicação de larvas
D+86	Infestação – 2ª aplicação de larvas
D+88	Infestação – 3ª aplicação de larvas
D+91	Infestação – 4ª aplicação de larvas
D+93	Infestação – 5ª aplicação de larvas
D+95	Infestação – 6ª aplicação de larvas
D+102	Coleta de sangue, exame físico, pesagem
D+109	Início da contagem de teleóginas
D+123	Início da pesagem de ovos
D+133	Fim da contagem de teleóginas
D+147	Fim da pesagem de ovos
D+149	Início da pesagem de larvas
D+173	Fim da pesagem de larvas
D+160	Coleta de sangue, 2ª infestação – 1ª aplicação de larvas
D+162	Infestação – 2ª infestação – 2ª aplicação de larvas
D+167D	Coleta de sangue
D+174	Coleta de sangue
D+181	Coleta de sangue
D+187	Início da contagem de teleóginas
D+188	Coleta de sangue
D+195	Coleta de sangue
D+201	Início da pesagem dos ovos
D+202	Coleta de sangue
D+209	Coleta de sangue
D+210	Fim da contagem de teleóginas
D+224	Fim da pesagem dos ovos
D+226	Início da pesagem das larvas
D+249	Fim da pesagem das larvas

Tabela 10. Calendário de atividades do experimento de imunização de cães

Dia	Atividade
-2	Coleta e isolamento de PBMC, ensaio <i>in vitro</i> de estímulo celular de sangue total
0	Coleta de sangue 1ª imunização
7	Coleta de sangue
14	Coleta de sangue
21	Coleta de sangue
28	Coleta de sangue 2ª imunização
35	Coleta de sangue
49	Coleta de sangue
56	Coleta de sangue 3ª imunização
63	Coleta de sangue
70	Coleta de sangue
77	Coleta de sangue
84	Coleta de sangue 4ª imunização
91	Coleta de sangue
98	Coleta de sangue
105	Coleta e isolamento de PBMC, ensaio <i>in vitro</i> de estímulo celular de sangue total
113	Teste de hipersensibilidade cutânea – inoculação
114	Teste de hipersensibilidade cutânea – acompanhamento 24 h
115	Teste de hipersensibilidade cutânea – acompanhamento 48 h
116	Teste de hipersensibilidade cutânea – acompanhamento 72 h
117	Coleta de sangue
187	Coleta de sangue, início da infestação
200	Coleta de sangue, fim da infestação

Anexo I – Aprovações da Comissão de Ética para o Uso de Animais



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 95/2017
Título do projeto: Elaboração de uma vacina multicomponente anti-carrapatos para cães
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Ricardo Toshio Fujiwara
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Parasitologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 22/05/2017. Validade: 22/05/2017 à 21/05/2022

Belo Horizonte, 23/05/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

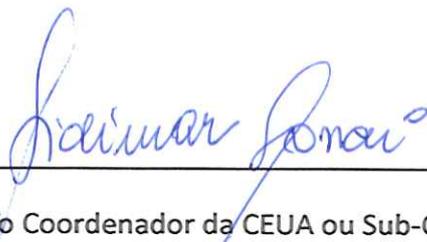
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA NOWAVET

Código CEUA: 56/2016

Certificamos que a proposta intitulada “Determinação da Eficácia vacinal de seis imunógenos recombinantes contra o carrapato *Rhipicephalus microplus*,” registrada com o nº 34/2016, sob a responsabilidade do Médico (a) Veterinário (a) Dr^a ELISANGELA DE SOUZA NEVES CRMV – MG 8797 que envolve a utilização de animais do Filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da NOWAVET no dia 03/08/2016.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência de Autorização	6 meses
Espécie/linhagem/raça	<i>Bos taurus taurus</i> - Holandesa
Nº de Animais	12 animais
Peso/Idade	Entre 150 e 200 Kg/Em 12 e 24 meses
Sexo	Machos
Origem	Todos os animais são procedentes de propriedade do Cena

Viçosa 03 de Agosto de 2016.



Assinatura do Coordenador da CEUA ou Sub-Coordenador da CEUA



COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA NOWAVET

Código CEUA: 36/2017

Certificamos que a proposta intitulada “**Determinação da eficácia vacinal de antígenos recombinantes contra o carrapato *Rhipicephalus microplus***” registrada com o nº 043/2017, sob a responsabilidade do Médico (a) Veterinário (a) Dr^a ELISANGELA DE SOUZA NEVES CRMV – MG 8797 que envolve a utilização de animais do Filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da NOWAVET no dia 09/06/2017.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência de Autorização	6 meses
Espécie/linhagem/raça	<i>Bos taurus taurus.</i>
Nº de Animais	18 animais
Peso/Idade	140-250 Kg/ 12 a 24 meses
Sexo	18 Machos
Origem	Centro Experimental Nowavet

Viçosa 09 de Junho de 2017.

Assinatura do Coordenador da CEUA ou Sub-Coordenador da CEUA