

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de vacina baseada em sistema de liberação
sustentada contendo proteína recombinante**

Carolina Nunes Costa Corgozinho

Ribeirão Preto
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de vacina baseada em sistema de liberação
sustentada contendo proteína recombinante**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de mestre em Farmácia.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Orientado: Carolina Nunes Costa Corgozinho

Ribeirão Preto
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Corgozinho, Carolina Nunes Costa.

Desenvolvimento de vacina baseada em sistema de liberação sustentada contendo proteína recombinante. – Ribeirão Preto, 2008.
82f.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.– Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra.

1. Sistema de liberação sustentada – Microesfera. 2. Vacinação. 3. Proteína recombinante – Bm86. 4. *Boophilus microplus*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina Nunes Costa Corgozinho

Desenvolvimento de vacina baseada em sistema de liberação sustentada contendo proteína recombinante.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de mestre em Farmácia.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador(a): Prof^a Dr^a Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS, COM AMOR, ADMIRAÇÃO E GRATIDÃO.

AGRADECIMENTOS

À Professora D^{ra} Maria Vitória Lopes Badra Bentley por sua atenção, compreensão e apoio durante o processo de orientação.

À Nanocore Biotecnologia S/A, na pessoa do José Maciel Rodrigues Júnior, pela oportunidade de realização do mestrado e por colocar à disposição seu laboratório.

À Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Karla de Melo Lima pela ajuda, compreensão e contribuição para meu crescimento científico.

Aos grandes amigos que fiz em toda essa minha trajetória, pelo carinho, compreensão, presença e apoio.

À minha família pelo incentivo, amor e apoio incondicional.

RESUMO

CORGOZINHO, C. N. C. **Desenvolvimento de vacina baseada em sistema de liberação sustentada contendo proteína recombinante**. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

No Brasil, e em outros países de clima tropical, os carrapatos se tornaram um enorme problema econômico desde que a indústria do gado se desenvolveu. O carrapato *Boophilus microplus*, um dos artrópodes mais importantes na veterinária, causa efeitos direto, como sucção de sangue, e indireto, como a transmissão de uma grande variedade de patógenos que normalmente resulta em infecções letais. As vacinas gênicas contendo o antígeno Bm86, uma proteína ligada à membrana do intestino do carrapato *B. microplus*, representam uma alternativa atrativa aos acaricidas para controlar as infestações por carrapatos em contrapartida aos inconvenientes produtos químicos. Devido sua administração ser feita em 4 doses no primeiro ano, seguida de reforços a cada seis meses, estas formulações vacinais não são adequadas para países com criação extensiva de gado, como no Brasil. Visando uma liberação sustentada do antígeno Bm86, neste trabalho desenvolveu-se uma vacina de dose única baseada em microesferas poliméricas. Para obter o padrão de liberação desejável, diferentes formulações e parâmetros de processo foram variados, como a composição do polímero, a taxa entre os monômeros “ácido láctico:ácido glicólico” e o tamanho das micropartículas. As formulações foram preparadas pelo método de emulsão múltipla e evaporação do solvente. A formulação que melhor se enquadrou nos objetivos da vacina de dose única foi preparada com PLGA 75:25, solução 3% de PVA como estabilizante, agitação de 11000 rpm para formação da emulsão primária e de 800 rpm para formação da emulsão múltipla e evaporação do solvente. As partículas assim obtidas apresentaram um tamanho médio de 25 µm, uma taxa de encapsulação maior que 90% e aproximadamente 50% da proteína foi liberada *in vitro* em 60 dias. Análises por SDS-PAGE e *Western Blotting* revelaram que a proteína se manteve íntegra após encapsulação. Os resultados da avaliação da imunogenicidade em bovinos mostraram que a formulação baseada em microesferas poliméricas biodegradáveis é hábil a conseguir, com uma única dose, uma resposta imune similar àquela conseguida com três doses das formulações convencionais da vacina de Bm86.

Palavras-chave: Microesfera; Proteína recombinante; Bm86; Vacina; *Boophilus microplus*.

ABSTRACT

CORGOZINHO, C. N. C. **Development of vaccine based system of sustained release containing recombinant protein.** 2008. 82f. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

In Brazil, and in others tropical countries, the ticks have become a huge economic problem since the industry of livestock has developed. Ticks and tick-borne diseases affect animal and human health and are the cause of significant economic losses. The cattle tick *Boophilus microplus* is one of the most important arthropods in veterinary. This tick species causes both direct effects, such as blood sucking, and indirect effects, such as transmission of a wide variety of pathogens, which usually result in lethal infections. The gene vaccines based on Bm86 antigen, a midgut membrane-bound protein of the cattle tick *B. microplus*, represent a good alternative to control tick infestations, compared to chemicals. However, due to these vaccine formulations need 4 doses over the first year with booster at each 6 months to be effective, they are not suitable for countries with extensive cattle raising, like Brazil. Aiming a sustained release of Bm86 antigen, in this work we developed a single shot vaccine based on Bm86 loaded polymeric microspheres. In order to obtain desired release patterns, different formulations and processing parameters were varied, for example, the composition of the polymer, the monomer ratio “lactic acid:glycolic acid” and the size of the microparticles. The formulations were prepared by solvent evaporation method based on double emulsion. The formulation that presented better result as single shot vaccine was prepared with PLGA 75:25, solution 3% of PVA as stabilizer, agitation of 11000 rpm to form the primary emulsion and 800 rpm to obtain the double emulsion and solvent evaporation. The particles thus obtained presented an average size of 25 μm , encapsulation ratio greater than 90% and approximately 50% of the protein was released in vitro in 60 days. Analysis by SDS-PAGE and Western Blot showed that the integrity of the protein remained after encapsulation. The immunogenic studies showed that the formulation based on biodegradable polymeric microspheres is able to elicit, with a single dose, an immune response and protection similar to that attained with 3 doses of conventional Bm86 vaccine formulations.

Key words: Microspheres; Recombinant protein; Bm86; Vaccine; *Boophilus microplus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visão dorsal e ventral de fêmea adulta <i>Boophilus microplus</i> e seus ovos.	4
Figura 2: Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato <i>Boophilus microplus</i>	6
Figura 3: Estrutura química dos poliésteres PLG, PLA e seu copolímero PLGA.	24
Figura 4: Estrutura química do polímero PLC.	25
Figura 5: Desenho esquemático da eletroforese em gel de acrilamida.....	33
Figura 6: Desenho esquemático do Western Blotting.....	34
Figura 7: Desenho esquemático dos reatores utilizados no preparo de microesferas.	38
Figura 8: Curva de calibração utilizada na determinação da taxa de encapsulação de Bm86 em microesferas preparadas sob diversas condições.	50
Figura 9: Perfil de distribuição de diâmetro das microesferas que constituem as 3 formulações avaliadas: Formulação 1 – PLGA 50:50, Formulação 2 – PCL e Formulação 3 – PLGA 75:25.	53
Figura 10: Perfil de liberação in vitro da proteína rBm86 a partir de microesferas obtidas a partir de diferentes polímeros.	54
Figura 11: Curva de Calibração utilizada no estudo de liberação in vitro de Bm86 a partir de microesferas.	54
Figura 12: Avaliação dos níveis séricos de IgG anti-Bm86 em camundongos BALB/c vacinados com dose única de microesferas contendo BM86, Formulações 2 e 3. Como controle utilizou-se um soro não imune.	56
Figura 13: SDS-PAGE da proteína rBm86 encapsulada em microesferas (formulação 3).Canaletas: 1) Padrão de peso molecular; 2) rBm86 antes do encapsulação; 3) rBm86 extraída das microesferas (seta).	57
Figura 14: Avaliação de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-Bm86 no soro de bovinos vacinados com 3 doses das vacinas comerciais (GAVAC e TickGard) ou dose única da formulação de microesfera.	59
Figura 15: SDS-PAGE mostrando rBm86 (seta) extraída de microesferas armazenadas sob diferentes condições por um período de 30 e 60 dias. 1) rBm86 não encapsulada utilizada como padrão; 2) rBm86 encapsulada em microesferas armazenadas a 4° C; 3) rBm86 encapsulada em microesferas armazenadas a 30°C e 65% de umidade relativa.	61
Figura 16: Perfil de distribuição de diâmetro das microesferas contendo rBM86 (Formulação 3) armazenadas a 4°C (○) ou a 30°C (●) por 30 e 60 dias.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo do aparecimento de resistência acaricida em <i>B. microplus</i>	16
Tabela 2: Variação dos parâmetros utilizados no preparo das microesferas.	40
Tabela 3: Valores encontrados na determinação da taxa de encapsulação de Bm86 nas diversas formulações.	51
Tabela 4: Distribuição do diâmetro das partículas preparadas nas diversas condições.....	51
Tabela 5: Relação entre diâmetro médio das partículas e porcentagem de rBm86 liberada ao final de 60 dias de estudo de liberação in vitro.	55
Tabela 6: Determinação da concentração da proteína rBm86 em microesferas armazenadas sob diferentes condições de temperatura e umidade.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA – soroalbumina bovina

ICH – International Conference on Harmonisation

Kg – quilograma

mg – miligrama

mM – milimolar

PCL – Policaprolactona

PLA – Ácido polilático

PLGA – Ácido polilático co-glicólico

PGA – Ácido glicólico

PVA – Álcool polivinílico

SDS-PAGE – polyacrylamide gel eletrophores in sodium dodecyl sulfate

VICH – Veterinarian International Conference on Harmonisation

LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca Registrada

™ Trademark

λ Lambda

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	V
LISTA DE SÍMBOLOS	VI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O CARRAPATO – BOOPHILUS MICROPLUS.....	3
1.1.1 HISTÓRICO	3
1.1.2 CLASSIFICAÇÃO	3
1.1.3 CICLO DE VIDA.....	4
1.1.4 TRANSMISSÃO DE DOENÇAS	6
1.1.4.1 ANAPLASE	8
1.1.4.2 BABESIOSE.....	10
1.1.5 MEDIDAS DE CONTROLE DO CARRAPATO.....	12
1.1.5.1 ESTABILIDADE ENDÊMICA NATURAL.....	12
1.1.5.2 RESISTÊNCIA NATURAL DOS BOVINOS AOS CARRAPATOS	13
1.1.5.3 CONTROLE QUÍMICO	14
1.1.5.4 VACINAS.....	18
1.2 A PROTEÍNA Bm86	20
1.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA/CONTROLADA	22
1.3.1 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS	23
1.3.2 PREPARO DE MICROESFERAS	25
1.3.3 MICROESFERAS COMO SISTEMAS VACINAIS.....	28
1.3.4 ESTABILIDADE DO SISTEMA VACINAL.....	30
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 MATERIAL	36
3.1.1 REAGENTES E MATÉRIAS-PRIMAS	36
3.1.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	37

3.2	MÉTODOS.....	38
3.2.1	PREPARO DAS MICROESFERAS	38
3.2.1.1	Avaliação da influência de importantes parâmetros na formação da microesfera.	39
3.2.2	CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA VACINAL	40
3.2.2.1	Avaliação da eficiência de encapsulação das microesferas.....	40
3.2.2.2	Eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE).....	42
3.2.2.3	<i>Western Blotting</i>	43
3.2.2.4	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	44
3.2.2.5	Determinação da distribuição de diâmetro das microesferas	44
3.2.2.6	Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	45
3.2.2.7	Avaliação da Imunogenicidade	46
3.2.2.8	Ensaio de Esterilidade	46
3.2.2.9	Ensaio de Endotoxina	47
3.2.2.10	Ensaio de soro conversão em bovinos.....	47
3.2.3	ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5	CONCLUSÕES.....	63
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

Desde a metade do século dezenove, quando a indústria de gado foi desenvolvida em muitos países tropicais e subtropicais, os carrapatos se tornaram um enorme problema econômico e, conseqüentemente, as medidas para o seu controle começaram a se desenvolver. Em algumas regiões como a África e o sul da América, as populações de carrapatos estiveram sempre presentes e em outras, como a Austrália, os carrapatos foram introduzidos acidentalmente através da importação de gados (Willadsen, 2006).

Os artrópodes ectoparasitas podem ser divididos em dois grupos de importância econômica e de saúde animal. Um grupo inclui parasitas que reduzem a função fisiológica do animal por destruição direta do tecido do hospedeiro e um segundo grupo, inclui parasitas considerados importantes por afetarem o desempenho econômico do gado e por apresentarem alta habilidade em transmitir importantes patógenos para hospedeiros humanos e animais. Este segundo grupo é representado principalmente por artrópodes sugadores de sangue, incluindo mosquitos, moscas hematófagas e carrapatos (Pruett, 1999).

O *Boophilus microplus* é o carrapato bovino de maior importância na medicina veterinária devido às perdas econômicas causadas em países tropicais e subtropicais (Patarroyo *et al.*, 2002). A perda econômica global tem sido estimada em US\$7 por animal, por ano (Sales-Junior *et al.*, 2005). O Brasil tem uma perda estimada em US\$2 bilhões anuais devido a efeitos diretos e indiretos de infestações por este artrópode (Grissi *et al.*, 2002) tais como perda na produção de leite, carne e couro, anemia, transmissão de parasitas, mortalidade, redução da natalidade, consumo de carrapaticidas, campanhas de educação do produtor, investimentos em infra-estrutura e mão-de-obra para tratamento.

Os carrapatos são artrópodes hematófagos e importantes vetores de arboviroses, rickettsioses, espiroquetoses e protozoários e, além disso, podem causar severas condições tóxicas, assim como paralisia e toxicoses, irritação e alergia (Jongejan; Uilenberg, 2004). No Brasil, destacam-se dois gêneros de patógenos que são responsáveis pelo complexo conhecido como "Tristeza parasitária bovina", a rickettsia *Anaplasma sp* e o protozoário *Babesia spp* (Andreotti,

2002), transmitidos principalmente por *Boophilus microplus* e responsáveis por grandes prejuízos.

O controle dos carrapatos é um fator crítico para o controle das doenças por eles transmitidas. Atualmente o controle dos carrapatos é realizado por meio de produtos químicos e/ou vacina. Os produtos químicos apresentam vários inconvenientes e por isso a busca por outros métodos de controle é incessante. Estas observações levaram ao desenvolvimento de uma vacina de dose única baseada na encapsulação da proteína Bm86 em microesferas poliméricas biodegradáveis. A formulação foi desenhada de forma a sustentar a liberação do antígeno por um longo período, de forma a estimular uma proteção duradoura com a administração de uma única dose anual.

1.1 O CARRAPATO – *Boophilus microplus*

1.1.1 HISTÓRICO

Postula-se que os carrapatos desenvolveram-se como parasitas obrigatórios de répteis no final do período paleolítico ou início do mesolítico, em climas quentes e úmidos. Supõe-se que quando esses répteis se ramificaram em numerosas formas de vida, preenchendo nichos aquáticos e terrestres, seus carrapatos mais primitivos evoluíram em duas principais famílias, Argasidae e Ixodidae (Rocha, 2007).

O *B. microplus* originou-se na Ásia, notadamente na Índia e na ilha de Java, quando mamíferos e pássaros substituíram os répteis como vertebrados dominantes, já no período terciário (Rocha, 2007). A movimentação de animais e de mercadorias ocorrida em função das expedições exploradoras registradas na história levou à expansão e introdução do carrapato na maioria das regiões tropicais e subtropicais: Austrália, México, América Central, América do Sul e África, tendo se estabelecido dentro dos climas demarcados pelos paralelos 32° Norte e 32° Sul (Andreotti, 2002) onde o calor e a umidade propiciaram condições favoráveis à sobrevivência e manutenção da espécie (Rocha, 2007).

A introdução no Brasil parece ter ocorrido no início do século XVIII, via o estado do Rio Grande do Sul por animais comprados do Chile. Atualmente, os carrapatos encontram-se distribuídos em todo o país, variando de intensidade de acordo com os tipos raciais de bovinos e com as condições climáticas (Andreotti, 2002).

1.1.2 CLASSIFICAÇÃO

Segundo Flechtmann (1990) o *B. microplus* (**Figura 1**) apresenta a seguinte posição sistemática:

- Filo – Arthropoda , Von Siebold & Slannius (1845);
- Subfilo – Chelicerata, Heymons (1901);

- Classe – Aracnida, Lamarck (1802);
- Subclasse – Acari, Leach (1817);
- Ordem – Parasitiformes, Renter (1909);
- Subordem – Metastigmata, Canestrini (1891);
- Família – Ixodidae, Murray (1887);
- Gênero – *Boophilus*, Canestrini (1887).

Em 2002 as cinco espécies do gênero *Boophilus* foram incluídas dentro do gênero *Rhipicephalus* por Horak Camicas; Keirans (2002), baseando-se nas proximidades genéticas e evolutivas de ambos. Como o gênero *Boophilus* é um dos mais estudados e conhecidos no mundo, o nome *Boophilus* permaneceu como subgênero. Assim, o *Boophilus microplus* passou a ser denominado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Horak; Camicas; Keirans, 2002; Jongejan; Uilenberg, 2004; Barker; Murrell, 2002).



Figura 1: Visão dorsal e ventral de fêmea adulta *Boophilus microplus* e seus ovos.

1.1.3 CICLO DE VIDA

De acordo com Furlong e Evans (1991), no Brasil o *B. microplus* encontra condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento, do extremo Sul em direção ao Norte ou Nordeste, possibilitando-lhe completar até 5 gerações por ano, em locais com temperaturas médias anuais acima de 17°C. Estações secas severas podem limitar a sobrevivência do carrapato, podendo ir até a completa paralisação na incubação, postura, e até mesmo o fracasso desses estágios, quando a

sobrevivência de um ano para outro se torna dependente da larva dormente do inverno (Vidotto, 2007).

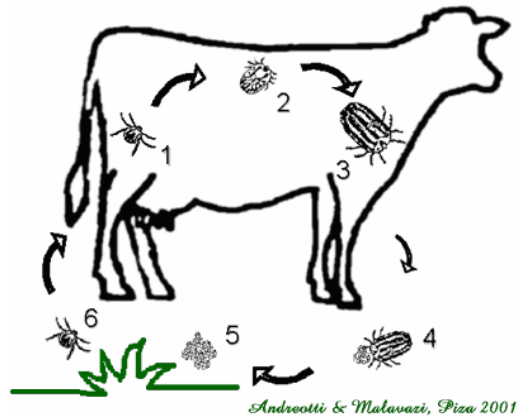
O *Boophilus microplus* conhecido no Brasil como carrapato dos bovinos, é um parasito que necessita obrigatoriamente passar uma fase de sua vida sobre o bovino, ingerindo linfa, substratos teciduais e sangue (Rocha, 2007). Outras espécies podem, alternativamente, comportarem-se como hospedeiros, tais como búfalos, ovinos, jumentos, caprinos, cães, gatos, porcos, veados, onças, preguiças, cangurus e coelhos (Andreotti, 2002).

O ciclo de vida do carrapato *B. microplus* (**Figura 2**) divide-se em fase de vida livre e fase de vida parasitária. Em condições favoráveis, a fase de vida livre dura em torno de 32 dias durante os quais o carrapato não se alimenta e sobrevive exclusivamente das suas reservas. A fase de vida livre inicia-se após a queda da teleógina ingurgitada com o período de pré-postura. A postura se inicia três dias após a queda ao solo, com período de postura em torno de 15 dias, quando a fêmea morre. O peso total dos ovos (2000 a 3000 ovos), após o término da postura, equivale a 52% do peso vivo da teleógina. A eclosão das larvas pode demorar em torno de vinte e dois a trinta dias (Rocha, 2007). As larvas são bastante vulneráveis em baixas temperaturas, mas em presença de alta umidade relativa podem sobreviver no solo até 8 meses (Andreotti, 2002).

Seis dias após a eclosão, com as cutículas fortalecidas, as larvas estão prontas para subir nas pastagens por geotropismo negativo, localizar o hospedeiro pelo odor, vibrações, sombreamento, estímulo visual e gradiente de concentração de CO₂ e alcançar o hospedeiro. Ao entrar em contato com o bovino, as larvas se fixam em regiões que favorecerão o seu crescimento. Essas regiões incluem úbere, mamas, regiões perineal, perianal, vulvar e entrepernas e são determinadas em função da espessura, vascularização e temperatura da pele, bem como pela dificuldade de acesso às lambidas do hospedeiro (Andreotti, 2007).

Uma vez que as larvas infectantes se encontram fixadas ao hospedeiro se inicia a fase parasitária. Após sete dias de sua fixação ocorre a mudança para ninfas e estas mudam para adultos com marcado dimorfismo sexual em aproximadamente oito dias. A fase parasitária desenvolve-se até a fecundação e ingurgitamento total das teleóginas. Nesta fase, o carrapato é pouco afetado pelas condições climáticas

ambientais, mas mesmo assim, ele procura regiões da pele onde a temperatura varie de 31° a 38°C (Jonsson, 2006).



- Fase parasitária:**
- 1- larva infectante realizando a fixação no bovino;
 - 2- ninfa;
 - 3- teleógina em estágio final de ingurgitamento.
- Fase de vida livre:**
- 4- teleógina em período de postura no solo;
 - 5- ovos, no solo, em período de incubação;
 - 6- larva, no solo, em período de incubação.

Figura 2: Esquema simplificado do ciclo de vida do carrapato *Boophilus microplus*.

As larvas de *B. microplus* alimentam-se preferencialmente de plasma. O sangue se torna o principal constituinte alimentar apenas nos momentos que precedem o rápido ingurgitamento das ninfas e das fêmeas. A partir do 17º dia que se segue à infestação ocorre o acasalamento, com rápido ingurgitamento após a cópula (cada teleógina ingere de 300 a 500 mL nas últimas 24 horas, aumentando seu peso em até 200 vezes (Jonsson, 2006)) e subsequente queda da fêmea do *B. microplus*.

1.1.4 TRANSMISSÃO DE DOENÇAS

Os prejuízos econômicos causados pela infestação por carrapatos ao gado são devidos à mortalidade, redução da produção de leite, baixa conversão alimentar

e ganho de peso, além de custos diretos e indiretos com o tratamento e profilaxia de doenças infecto-parasitárias (Vidotto, 2007).

O *B. microplus* é o principal vetor da rickettsia *Anaplasma marginale* e dos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* responsáveis por mortes de bezerros ou de animais adultos que não tenham sido anteriormente expostos ao carrapato (Veríssimo, 1993). Essas doenças formam um complexo com o carrapato, conhecido como tristeza parasitária dos bovinos (TPB) (Vidotto, 2007).

Os vetores artrópodes se alimentam muito lentamente, necessitando permanecer muito tempo em contato com o sistema imune do hospedeiro. Para isso, os carrapatos liberam substâncias imunossupressoras na saliva e criam um ambiente favorável à sua permanência e à transmissão de patógenos (Willadsen, 2001). A transmissão de patógenos é favorecida por moléculas não específicas com atividade farmacológica e imunomoduladora, presentes em altas concentrações na saliva de carrapatos, como a PGE₂ (Willadsen; Jongejam, 1999) (aproximadamente 33-2200 ng/mL em saliva de *B. microplus* (Gillespie; Mbow; Titus, 2000)) e I2 (Brossard; Wikel, 2004). Estas substâncias estão relacionadas a fatores imunomodulatórios tais como: prevenção da rejeição do artrópode pelo hospedeiro, prevenção da sensibilização às proteínas vaso modulatórias e a fatores que facilitam a alimentação (Gillespie; Mbow; Titus, 2000). As prostaglandinas apresentam funções divergentes na regulação da resposta imune. Prostaglandinas E2 aumentam a produção de citocinas Th2 (IL-4, IL-10), inibem o estímulo de citocinas Th1 (IFN- δ) e inibem a proliferação de linfócitos T, criando assim um ambiente propício para transmissão de patógenos (Brossard; Wikel, 2004).

Existem vacinas eficazes contra alguns destes patógenos e seus benefícios são consideráveis, mas quando estas não existem, um modo de controlar a transmissão de doenças é controlar a infestação por seus transmissores. Quando o controle do carrapato é usado para obter controle das doenças, um fator complicante é o desejo de se obter estabilidade endêmica, um conceito desenvolvido na Austrália. Para *B. microplus* o nível desejável de controle pode ser menor que 100% desde que em muitas propriedades extensivas o fazendeiro permite que um número significativo de carrapatos ingurgite diariamente acreditando que isto leva a uma estabilidade endêmica contra doenças transmitidas pelos carrapatos (Willadsen, 2006).

1.1.4.1 ANAPLASMOSE

Anaplasma marginale é um patógeno bacteriano transmitido pelo carrapato e causa a doença anaplasmoze em gado. Este patógeno é classificado dentro da Ordem Rickettsiales que foi recentemente reorganizada em duas famílias, Anaplasmataceae e Rickettsiaceae. Os organismos da família Anaplasmataceae são organismos intracelulares obrigatórios que são encontrados exclusivamente dentro de vacúolos derivados de membrana no citoplasma de células eucarióticas (Kocan *et al.*, 2004).

Esta rickettsia está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais da Europa, África, Ásia e Austrália. Vários isolados geográficos de *A. marginale* foram identificados nas Américas do Norte e do Sul, os quais diferem em morfologia, seqüência de proteínas, características antigênicas e habilidade de ser transmitido por carrapatos (Kocan *et al.*, 2004).

A transmissão de *A. marginale* pode ocorrer de forma biológica ou mecânica. A transmissão mecânica ocorre quando sangue infectado é transferido a gado susceptível via sangue contaminado ou picadas de mosquitos. A transmissão biológica é efetuada por carrapatos e aproximadamente 20 espécies têm sido incriminadas como vetores ao redor do mundo (Kocan *et al.*, 2004), sendo o *Boophilus microplus* o principal transmissor de *A. marginale* no Brasil pelas vias biológica e mecânica. A forma congênita de transmissão em bovinos pode ocorrer ocasionando a anaplasmoze neonatal (Vidotto; Marana, 2001).

A. marginale desenvolve infecção persistente em hospedeiros mamíferos e carrapatos, ambos dos quais servem como reservatório para infecção. O único sítio de replicação conhecido de *A. marginale* no gado são eritrócitos bovinos. Dentro destas células os corpos de inclusão contêm de 4-8 rickettsias durante uma infecção aguda e doença. A remoção de células infectadas pelo sistema retículo endotelial do bovino resulta em anemia leve ou severa e icterícia (Kocan *et al.*, 2004).

As formas clínicas aguda, superaguda, leve e/ou crônica são definidas pela rickettsia, com um período pré-patente de 20 a 40 dias, seguido por parasitemia. No pico da doença, o hematócrito apresenta uma queda acentuada e mais de 75% dos eritrócitos podem estar infectados. Este quadro pode persistir de uma a duas semanas. Os sinais observados consistem de anemia hemolítica, icterícia, dispnéia,

taquicardia, febre, fadiga, lacrimejamento, sialorréia, diarreia, micção freqüente, anorexia, perda de peso, aborto e às vezes agressividade, podendo levar o animal à morte em menos de 24 horas (Vidotto; Marana, 2001).

O ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* foi descrito em carrapatos machos persistentemente infectados. Este ciclo é coordenado com o ciclo de alimentação do carrapato e é considerado bem complexo. A fonte de infecção das células do intestino do carrapato por *A. marginale* é representada pelos eritrócitos infectados presentes no sangue ingerido pelo carrapato. O *A. marginale* se desenvolve nas células do intestino e depois infecta outros tecidos do carrapato, incluindo a glândula salivar de onde as rickettsias são transmitidas para vertebrados durante a alimentação (Kocan *et al.*, 2004).

Em cada sítio de infecção no carrapato, *A. marginale* desenvolve dentro de vacúolos ou colônias. A primeira forma de *A. marginale* encontrada é a reticulada (vegetativa) que se divide por fissão binária formando enormes colônias. A forma reticulada então muda para forma densa que é a forma infectiva e pode sobreviver fora de células. O gado se torna infectado com *A. marginale* quando a forma densa é transmitida durante a alimentação do carrapato via glândula salivar (Kocan *et al.*, 2004).

O diagnóstico laboratorial da doença pode ser realizado de forma direta ou indireta. A forma direta pode ser utilizada na fase aguda, quando a parasitemia é muito grande, e então se consegue visualizar a rickettsia nos eritrócitos bovinos (esfregaços corados com Giemsa). Sondas de DNA, ELISA e PCR são técnicas diretas que apresentam altas sensibilidade e especificidade e que são utilizadas para detecção da rickettsia quando a parasitemia é baixa (Vidotto; Marana, 2001).

As formas de controle empregadas incluem medidas higiênico-sanitárias (fômites, controle de moscas e carrapatos), administração de medicamentos (oxitetraciclina ou clortetraciclina), avaliação da resistência dos carrapatos aos carrapaticidas, vacinação e avaliação de níveis de anticorpos (Vidotto; Marana, 2001).

As vacinas estudadas até então apresentam proteção apenas parcial contra infecções com *A. marginale*, diminuindo a severidade e duração dos sinais clínicos. Estes resultados demonstram a necessidade por vacinas mais eficazes. O uso de

antígenos recombinantes no desenvolvimento de vacinas contra anaplasmosose tem mostrado resultados promissores. Entretanto, deve-se conhecer melhor os mecanismos da infecção bacteriana e da sua transmissão, bem como a natureza da resposta de proteção desenvolvida pelo gado após uma infecção persistente para que se possa explorar melhor a incorporação desses antígenos em vacinas. Os resultados encontrados até o momento sugerem que existem diferenças entre *A. marginale* em células de carrapatos e eritrócitos bovinos (Kocan *et al.*, 2004).

1.1.4.2 BABESIOSE

A babesiose é uma doença causada por um protozoário intracelular transmitido para animais domésticos e ocasionalmente para o homem através da picada de carrapatos contaminados. As maiores perdas econômicas causadas pela babesiose são encontradas na indústria de gado e os principais causadores são *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (Bock *et al.*, 2004).

O gênero *Babesia* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, ordem Eucoccidiorida, subordem Piroplasmorina e família Babesiida. Os principais vetores de *Babesia* são os carrapatos *Boophilus*. A espécie *Babesia bovis* é inoculada apenas pelas larvas de carrapato por meio de multiplicação e rompimento das células salivares da larva, atingindo o canal salivar. Já a *Babesia bigemina* é inoculada somente pelas ninfas e adultos dos carrapatos (Andreotti, 2002).

Babesia spp não parasita nenhuma célula de hospedeiro vertebrado além dos eritrócitos. O carrapato inocula nos bovinos, juntamente com a saliva, as formas infectivas chamadas de esporozoítos (ou pequenos merozoítos). Cada esporozoíto penetra a membrana celular de um eritrócito com ajuda de um complexo apical especializado e se transforma em um trofozoíto dos quais dois merozoítos desenvolvem por um processo de merogonia (fissão binária). Os merozoítos se alimentam de substâncias do citoplasma, digerem totalmente a hemoglobina e provocam uma ruptura do eritrócito para saírem do mesmo. Os merozoítos agora presentes no sangue podem ser ingeridos pelos carrapatos. A *Babesia* na luz intestinal do carrapato se multiplica na célula intestinal alcançando a hemolinfa, sofrendo novas divisões nas células circulatórias e em diversos órgãos, inclusive nos ovários, ocorrendo transmissão transovariana (Bock *et al.*, 2004).

A grande multiplicação da *Babesia* nas células das larvas provenientes de ovos infectados causa uma grande destruição tecidual, o que pode levar à redução na capacidade de ovopostura e até mesmo à morte de teleóginas ingurgitadas em bovinos com alta parasitemia (Andreotti, 2002).

A doença aguda, causada por *Babesia bovis*, geralmente segue um curso de três a sete dias. Durante a infecção o hospedeiro pode apresentar febre alta, severa anemia, hemoglobinúria causada por hemólise intravascular, letargia e algumas vezes hidrofobia (Allred, 2003). Cansaço muscular e tremores se desenvolvem em casos avançados da doença e normalmente são seguidos por coma. A doença pode alcançar o cérebro e se manifestar por uma variedade de sinais do SNC; o resultado é quase sempre fatal. Casos não fatais podem levar várias semanas, mas a recuperação é geralmente completa. Em infecções subagudas, os sinais são menos pronunciados e algumas vezes difíceis de detectar. Gados de regiões endêmicas apresentam um grau de resistência natural e frequentemente desenvolvem apenas infecção subclínica (Bock *et al.*, 2004).

Os sinais clínicos causados por *Babesia bigemina* estão mais relacionados à destruição eritrocitária. Hemoglobinúria aparece rapidamente, febre não é tão marcante e não ocorre envolvimento cerebral. Em alguns casos a doença pode se desenvolver rapidamente, apresentando severa anemia seguida de morte (Bock *et al.*, 2004).

O diagnóstico da doença é feito normalmente por visualização da *Babesia* em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. Utiliza-se normalmente sangue capilar, pois este contém 20 vezes mais parasitas que o sangue da circulação geral (Bock *et al.*, 2004).

Os babesiocidas mais utilizados são aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb. Diminazeno é bem tolerado e numa dose de 3,5 mg/kg, via intramuscular, protegerá o gado por duas semanas contra *B. bovis* e quatro semanas contra *B. bigemina*. Imidocarb é utilizado subcutaneamente numa dose de 1,2 mg/kg para tratamento da doença e 3mg/kg para proteção contra *B. bovis* por quatro semanas e *B. bigemina* por até dois meses. O tratamento com oxitetraciclina longa-ação reduz significativamente a parasitemia e a destruição das células vermelhas do sangue sem inibir o desenvolvimento de imunidade (Bock *et al.*, 2004).

Após uma única infecção com *B. divergens*, *B. bovis* ou *B. bigemina* o gado já desenvolve uma durável imunidade contra o patógeno. Esta característica é explorada para imunizar o gado contra babesiose. Vacinas vivas apresentam desvantagens inerentes tais como risco de reações ou contaminação com outros organismos patogênicos, sensibilização contra grupos sanguíneos, possível transmissão a carrapatos não contaminados e a necessidade de transporte refrigerado. Apesar destas desvantagens, a vacina provê proteção maior que 95% em única dose. Vacinas baseadas em antígenos recombinantes podem contornar os problemas da vacina viva, entretanto, a *Babesia* tem desenvolvido uma variedade de mecanismos para escapar da resposta imune do hospedeiro assim como variação antigênica e epítomos críticos pouco imunogênicos. A direção para encontrar vacinas eficazes é associar vários antígenos para prover proteção contra cepas heterólogas, além da utilização de um sistema de liberação que minimize a necessidade de repetidas vacinações (Bock *et al.*, 2004).

Outras técnicas de controle envolvem controle do vetor, exploração da estabilidade endêmica natural e genética dos animais.

1.1.5 MEDIDAS DE CONTROLE DO CARRAPATO

1.1.5.1 ESTABILIDADE ENDÊMICA NATURAL

Estabilidade endêmica é definida como o estado na qual o relacionamento entre hospedeiro, agente, vetor e ambiente está em equilíbrio e raramente ocorre a doença clínica, ou mesmo não ocorre. Por isso é utilizada por alguns fazendeiros como estratégia de controle de doenças.

Em áreas endêmicas, efeitos climáticos, genética dos hospedeiros e estratégias de manejo, inevitavelmente terão um maior efeito na taxa de transmissão e basicamente na probabilidade do desenvolvimento de estabilidade endêmica. O clima, o animal e os parâmetros de manejo que permitem estabilidade endêmica podem mudar durante o ano. Por exemplo, uma época seca pode afetar drasticamente o número de carrapatos e a taxa de transmissão de parasitas para produzir a geração de gado susceptível. O modelo para estabilidade endêmica foi

desenvolvido na Austrália e Américas, onde a interação doença/vetor são relativamente simples. A situação da África é mais complexa, com a presença de quatro principais doenças, vários vetores e uma grande faixa de susceptibilidade de raças de bovinos (Bock *et al.*, 2004).

1.1.5.2 RESISTÊNCIA NATURAL DOS BOVINOS AOS CARRAPATOS

1.1.5.2.1. Influência da raça bovina

Vários fatores que afetam a resistência dos bovinos aos carrapatos são discutidos na literatura, sendo a raça considerada como o fator de maior importância. Além da raça, fatores como sexo, idade, clima e pastagem também interferem na resistência ao parasito (Rocha, 2007).

Vários autores demonstraram a maior resistência dos *Bos indicus* (gado zebu) ao carrapato quando comparados aos *Bos taurus* (gado europeu). Esta diferença foi demonstrada inclusive nos cruzamentos, sendo que, quanto maior o grau de sangue zebuino, maior a resistência ao carrapato. Diferentes explicações são encontradas para a diferença da resistência entre taurinos e zebuínos ao carrapato, uma delas é o fato dos zebuínos possuírem mais glândulas sebáceas na pele, produzindo odores que afastariam o carrapato, assim como maior mobilidade geral do animal e de sua pele, o que possivelmente faz com que se defenda melhor da infestação. Outra explicação é embasada no sistema de alimentação da larva de *B. microplus* dependente de uma reação inflamatória que se inicia no momento da fixação da larva. Os zebuínos apresentam uma reação inflamatória mais intensa que o gado europeu o que contribuiria para um equilíbrio carrapato/hospedeiro, sendo, nestes animais, a infestação mínima. Estudos demonstram que dentre as raças bovinas européias, nacionais e zebuínas, o primeiro grupo é o mais susceptível, havendo diferença entre raças do mesmo grupo e diferenças individuais dentro da mesma raça (Rocha, 2007). Dentre as raças européias, a raça Jersey é a que apresenta maior resistência (Andreotti, 2002).

1.1.5.2.2. Influência de fatores sazonais

A região Sudeste do Brasil apresenta clima favorável para o desenvolvimento e sobrevivência do carrapato durante todo o ano. Durante os períodos de temperatura e umidade mais baixas, principalmente entre os meses de abril e setembro, o desenvolvimento da fase de vida livre do carrapato é prejudicado e seu ciclo de vida se prolonga. Nos meses de setembro a março, no chamado “período das águas”, o desenvolvimento dos carrapatos é favorecido, apresentando ciclo de vida mais curto e conseqüentemente a infestação do gado é maior. Esta época de maior infestação é a mais recomendada para realização do controle químico de forma estratégica (Rocha, 2007).

Na região Sul do país os meses que apresentam maiores infestações são de janeiro a junho, o que demonstra a influência do clima da região no ciclo de vida do carrapato. Essa avaliação deve ser sempre levada em consideração no momento de se programar um controle estratégico (Rocha, 2007).

1.1.5.3 CONTROLE QUÍMICO

O controle químico, realizado pela aplicação de acaricidas, quando utilizado corretamente é eficiente e apresenta baixo custo. Porém, este controle é frequentemente utilizado de forma incorreta, o que leva ao desenvolvimento de resistência química, que já se tornou um sério problema global. Além do desenvolvimento de resistência, a presença de resíduos químicos em alimentos também é preocupante (Willadsen, 2006).

Até metade do século vinte as medidas disponíveis para o controle dos carrapatos eram limitadas. Os produtos mais utilizados eram os derivados arsênicos, caracterizados por sua baixa eficácia, alta toxicidade ao gado e efeito residual. Com a descoberta das propriedades do inseticida DDT em 1939 e o subseqüente desenvolvimento de pesticidas orgânicos, a situação melhorou drasticamente em todo o mundo (Graf *et al*, 2004).

O controle de carrapatos é um mercado atrativo, gerando significantes pesquisas e desenvolvimentos pelas grandes companhias de saúde animal. O principal fator que desencadeou a inovação de produtos químicos foi a resistência aos acaricidas por parte dos carrapatos (Willandsen, 2006). Outra força direcionando

essa inovação é o aspecto da segurança e da eficácia, e quando os produtos atuais são comparados aos antigos arsênicos, fica evidente que houve um progresso considerável (George; Pound; Davey, 2004). As indústrias se esforçaram a encontrar produtos com novos modos de ação. O DDT e outros organoclorados (lindane, dieldrin, aldrin, BHC e toxafen) apareceram entre 1940 e 1950, quando surgiu a resistência aos compostos arsênicos (Graf *et al.*, 2004). Pelo lado da segurança, os organoclorados foram muito mais favoráveis do ponto de vista de toxicidade aguda, mas sua lipofilicidade e eventual estabilidade são suas maiores desvantagens. Devido ao grande acúmulo no ambiente e nos alimentos e à resistência criada, os organoclorados desapareceram do mercado (George; Pound; Davey, 2004).

No início de 1960, os organofosfatos (diazinon, clorpirifós, diclorvos, coumafós, etion, fention e triclorfon) suprimiram o problema de resistência aos organoclorados (Graf *et al.*, 2004). Os organofosfatos, embora mais tóxicos que seus precursores, oferecem a vantagem de rápida metabolização, biodegradação e de permitir curtos períodos para abate (George; Pound; Davey, 2004). Uma década depois, quando os organofosfatos começaram a perder sua eficácia, apareceram as associações com amidinas (principal representante sendo o amitraz). A resistência às amidinas apareceu no final de 1970 e os piretróides (flumetrina, cipermetrina, deltametrina e cialotrina), baseados na sua excelente eficácia e seu largo espectro, tomaram grande parte do mercado em 1980. No início, devido aos similares modos de ação, os piretróides sofreram de resistência cruzada ao DDT. Resistência mais evidenciada apareceu em meados de 1980, espalhando-se rapidamente na década de 90 e permitindo um importante retorno das amidinas, que não foram completamente exploradas na sua introdução inicial (Graf *et al.*, 2004). Os piretróides apresentam maior segurança, mas sua maior desvantagem está no seu potencial de irritação e sensibilização da pele com aplicação tópica (George; Pound; Davey, 2004). O uso aumentado das amidinas levou ao reaparecimento da resistência a esta classe de substâncias. Novos produtos e soluções apareceram durante a última década focando principalmente o *Boophilus spp.* Os novos acaricidas são as lactonas macrocíclicas (ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e as milbemicinas), os fenilpirazóis (fipronil), os reguladores de crescimento (fluazuron) e as spinosinas (spinosad) (Graf *et al.*, 2004; Vercruyse, 2004). Os reguladores de crescimento atuam na síntese de quitina pelo artrópode, persistem por aproximadamente doze semanas e por causa das suas características de

ligação à gordura, é excretado no leite e não é necessário tratar bezerros em amamentação (George; Pound; Davey, 2004). O Spinosad representa uma nova classe de pesticidas, as spinosinas. O Spinosad é um metabólito da fermentação do actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* e tem um único modo de ação que envolve rompimento da ligação de acetilcolina em receptores acetilcolina/nicotina nas células pós-sinápticas. Este modo único de ação qualifica-o como acaricida alternativo para o controle de *B. microplus* resistentes a outros químicos (George; Pound; Davey, 2004). A **Tabela 1** sumariza a incidência de resistência do *B. microplus* a diferentes acaricidas.

Tabela 1: Resumo do aparecimento de resistência acaricida em *B. microplus* (George; Pound; Davey, 2004).

Componente ativo (data aproximada de introdução)	Localização e data do surgimento de resistência
Compostos Arsênicos (1893)	Austrália, 1936; Argentina, 1936; Brasil, 1948; Colômbia, 1948; Uruguai, 1953; Venezuela, 1966.
DDT (1946)	Argentina, 1953; Brasil, 1953; Austrália, 1953; Venezuela, 1966; Sul da África, 1979.
Ciclodienos e Toxafeno (1947)	Austrália, 1953; Argentina, 1953; Brasil, 1953; Venezuela, 1966; Colômbia, 1966; Sul da África, 1979.
Organofosfatos – Carbamatos (1955)	Austrália, 1963; Argentina, 1964; Brasil, 1963; Colômbia, 1967; Venezuela, 1967; Sul da África, 1979; Uruguai, 1983; México, 1986.
Formamidinas (1975)	Austrália, 1981; Brasil, 1995; Colômbia, 2000; México, 2002.
Piretróides (1977)	Austrália, 1978; Brasil, 1989; México, 1994; Venezuela, 1995; Colômbia, 1997; Argentina, 2000.
Lactonas macrocíclicas (1981)	Brasil, 2001

No Brasil, há relatos de resistência a lactonas macrocíclicas por *Boophilus microplus*, (Vercruyse, 2004) especificamente doramectina com resistência cruzada a ivermectina e moxidectina. As limitadas alternativas de acaricidas e o uso difundido de lactonas macrocíclicas podem levar a sérios problemas de resistência (George; Pound; Davey, 2004).

Deve-se ter em mente que a escolha da tecnologia de controle que será utilizada depende de vários fatores, tais como: espécie do carrapato a ser controlada, genótipo do gado, tempo entre tratamento e produto animal que alcançará o mercado (tempo diferente para leite ou carne), natureza da criação

(intensiva ou extensiva), presença ou ausência de resistência acaricida, dentre outros. Uma maior consideração será a importância atribuída a doenças transmitidas e se o gado foi vacinado contra elas (Peter Willadsen, 2006).

1.1.5.3.1. Aplicação dos acaricidas ao gado

O método mais antigo de aplicação de acaricidas é por meio de imersão dos animais em uma emulsão ou suspensão do ativo, ambos preparados no momento do uso pela diluição em água de um concentrado emulsionável ou de um pó molhável. A suspensão e a emulsão podem também ser aplicadas no gado por meio de aspersão ou spray. Mais recentemente surgiram os produtos pour-on, injetáveis, bolus intraruminal, ear tags impregnados com acaricidas e feromônios. A efetividade de um acaricida aplicado ao gado para o controle de carrapatos depende não somente do grau de toxicidade química, mas da qualidade, quantidade e grau de dispersão do ingrediente ativo depositado no gado ou internamente liberado (George; Pound; Davey, 2004). Produtos designados como pour-ons, injetáveis ou tratamento oral devem ser administrados de acordo com as instruções do rótulo, incluindo a dose própria e intervalo entre tratamentos, para maximizar a efetividade do tratamento.

1.1.5.3.2. Aparecimento de resistência no Brasil

O desenvolvimento de resistência dos parasitas é um problema crescente em todo o mundo e particularmente grave na América Latina. Os países latinos estão enfrentando resistência por parte de vários grupos de parasitas, dos quais helmintos, mosca do chifre e carrapatos são os mais importantes.

Vários fatores podem contribuir para o aparecimento de resistência, sendo alguns deles o uso inadequado de acaricidas químicos (uso irrestrito, administração incorreta, subdosagem) e a própria genética do hospedeiro. Alguns fazendeiros fazem constante rotação de produtos ou rotação de nomes comerciais do mesmo produto, causando rápida seleção de linhagens resistentes.

De todos os parasitas internos e externos que afetam o gado no Brasil, o carrapato é considerado o mais importante. No Brasil, carrapatos resistentes estão

presentes em vários estados: Rio Grande do Sul, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro. O primeiro relato de resistência em carrapatos foi feito por Freire em 1953 no Rio Grande do Sul e envolveu o grupo dos arsênicos. Em seguida surgiram vários relatos de linhagens de *Boophilus microplus* resistentes a organofosfatos, piretróides e suas associações. Existem também relatos de carrapatos resistentes a organofosfatos e lactonas macrocíclicas. A situação é alarmante, pois a resistência em carrapatos está presente nos principais estados produtores de carne e leite.

A situação no Brasil está fora de controle por causa das linhagens resistentes a multidrogas. Em muitos casos, os fazendeiros usam produtos em altas concentrações e até inseticidas altamente tóxicos utilizados na agricultura para tentar contornar a resistência dos carrapatos, mas isto só traz alto risco aos humanos e ao meio ambiente.

Os compostos que ainda apresentam eficácia satisfatória contra carrapatos devem ser manuseados com cuidado para proteger a eficácia de outros químicos no futuro (Graf *et al.*, 2004).

1.1.5.4 VACINAS

A utilização de vacinas no controle de carrapatos é uma alternativa atrativa aos acaricidas químicos, desde que estes vêm apresentando várias desvantagens, incluindo desenvolvimento de resistência acaricida em carrapatos, toxicidade, contaminações de produtos alimentícios (carne, leite), riscos para o homem, além de poluição ambiental. As vacinas baseadas em antígenos recombinantes não apresentam risco à saúde, são seguras para o ambiente e o desenvolvimento de resistência pelos carrapatos por meio de adaptação seletiva é pouco provável (Nuttall *et al.*, 2006).

A primeira vacinação experimental contra carrapatos ocorreu a 60 anos atrás (Willadsen; Jongejan, 1999) e apesar da enorme importância dos ectoparasitas na transmissão de doenças e em perdas econômicas, somente duas vacinas são comercialmente disponíveis, refletindo a dificuldade em identificar adequados alvos antigênicos. Ambas as vacinas (TickGARDTM na Austrália e GAVACTM na América

do Sul) são derivadas de um antígeno oculto, a Bm86, uma proteína presente no intestino de carrapatos bovinos (Trimnell; Hails; Nuttall, 2002).

1.1.5.4.1. Antígeno Oculto x Antígeno Exposto

Tradicionalmente, os antígenos testados no desenvolvimento de vacinas contra carrapatos são descritos como expostos ou ocultos. Os antígenos expostos são os convencionais, que entram em contato direto com o sistema imune assim que se instala a parasitemia. As proteínas secretadas na saliva do carrapato durante sua fixação e alimentação são consideradas antígenos expostos. Os antígenos ocultos são normalmente escondidos do mecanismo imune do hospedeiro (Nuttall *et al.*, 2006). Estes apresentam duas características principais: não estimulam resposta imune durante infestação natural do parasita, tipicamente por causa da sua localização física, e se o hospedeiro for vacinado com o antígeno o parasita pode sofrer danos através da resposta imune que será produzida. O antígeno oculto é reconhecido por anticorpos e outros componentes do sistema imune do hospedeiro quando o parasita se alimenta de sangue (Willadsen; Eisemann; Tellam, 1993). No caso do carrapato, para ser considerado antígeno oculto com potencial para vacina, este deve entrar em contato com as imunoglobulinas na hemolinfa ou no intestino e deve estar associado com alguma função vital (Nuttall *et al.*, 2006). Três antígenos ocultos foram identificados em *B. microplus*: Bm86, Bm91 e BMA7. A resposta anticarrapato conferida por Bm91 e BMA7 isolados foi pequena quando comparada à induzida por Bm86 recombinante (Mulenga *et al.*, 2000).

Em 1939, Trager utilizou dois tipos de antígenos para demonstrar o efeito contra carrapatos em animais experimentais. Este trabalho incluiu duas estratégias: (1) mimetizar resistência adquirida (através de antígenos expostos, utilizando extrato da glândula salivar) e (2) entrega de organismos internos do carrapato (antígenos ocultos, utilizando extrato do trato digestivo de fêmeas adultas parcialmente ingurgitadas e extrato total de larvas) (Wang; Nuttall, 1999).

Apesar de o antígeno exposto apresentar vantagens quando comparado ao antígeno oculto, tais como ser ativo contra todas as fases de vida do parasita e induzir memória imunológica, os resultados encontrados com estes antígenos recombinantes não têm sido promissores (Nuttall *et al.*, 2006).

1.2 A PROTEÍNA Bm86

Bm86 é uma proteína que se encontra ligada à membrana de células das microvilosidades intestinais de carrapatos fêmeas semi-ingurgitadas de *Boophilus microplus*. É uma glicoproteína de 86KDa com 66 resíduos de cisteína e aproximadamente 20 kDa de glicosilação (Willadsen; Jongeman, 1999).

A purificação da proteína Bm86 em grandes quantidades e pureza satisfatória, realizada pela primeira vez por cientistas australianos, se baseou em algumas propriedades físicas anteriormente conhecidas, tais como peso molecular, mobilidade no SDS PAGE, ponto isoelétrico de 5,1 a 5,6 e afinidade para lectina de gérmen de trigo e ConA (Willadsen *et al.*, 1989).

A identificação do antígeno Bm86, a partir de vacinação do gado com extratos crus de carrapatos fêmeas adultas semi-ingurgitadas, material da membrana desses extratos e suas sucessivas frações (Willadsen; Eisemann; Tellam, 1993), foi um notável avanço na pesquisa para o desenvolvimento de uma vacina anticarrapato. A subsequente clonagem e expressão do antígeno Bm86 em *Escherichia coli* (vacina TickGARD™) pela Biotech Australia, junto à *Commonwealth Scientific e Industrial Research Organisation* (CSIRO) foi a primeira tecnologia para o uso de um manejo integrado para controle de *B. microplus*. A vacina cubana Gavac™, comercializada por Heber Biotec S.A. (Dalton; Mulcahy, 2001), é baseada na seqüência publicada de Bm86 e no produto recombinante expresso por levedura *Pichia pastoris* (George, 2000). A vacina Gavac™ foi liberada em 1993 em Cuba e subsequentemente em vários países da América Latina e TickGard™ foi liberada no mercado Australiano em 1994 (Rodriguez *et al.*, 2004; Valle *et al.*, 2004).

A imunidade induzida por vacinas baseadas em Bm86 é dependente de anticorpos e existe ótima correlação entre título de anticorpos e eficácia. A manutenção de altos e persistentes níveis de anticorpos aumentará a eficácia da vacina (Willadsen, 2001). Anticorpos, células do complemento e outras células do sistema imune produzidos pelo hospedeiro em resposta à vacinação se ligam a epitopos nas células do intestino do carrapato, causando danos e perda de sangue para a cavidade corporal (Willadsen; Eisemann; Tellam, 1993; Trimnell; Hails; Nuttall, 2002). A consequência disso é a redução no número e peso das carrapatos

ingurgitadas, redução na capacidade de pôr ovos e redução na viabilidade dos ovos, levando a uma redução da população de *B. microplus* (de Vos *et al.*, 2001; Willadsen, 2006).

Bm86 recombinante reduz a capacidade de reprodução em 90%, embora seu efeito direto na mortalidade do carrapato seja menor. Nenhum outro antígeno conseguiu alcançar o desempenho da Bm86 (Willadsen, 2006). Valle *et al* demonstrou que a introdução da vacina GavacTM em Cuba levou à redução de 87% na utilização de tratamentos acaricidas e 82% no consumo nacional de acaricidas, além da redução na incidência da babesiose (Willadsen, 2006; Valle *et al.*, 2004).

A vacina GavacTM é comercializada na forma de emulsão água-óleo da proteína Bm86 misturada a um adjuvante, Montanide 888, e óleo mineral. Cada dose de 2mL contém 100µg Bm86 (Boué *et al.*, 1998). O esquema recomendado de vacinação inclui duas vacinações em quatro semanas e uma terceira vacinação após mais três semanas (Canales *et al.*, 1997). Esse esquema de vacinação é justificado pelo fato da vacina ser baseada em antígeno oculto e a infestação em si não estimular a resposta imunológica, necessitando de doses de reforço (Willadsen; Jongeman, 1999).

Em vista da eficácia do antígeno Bm86 e da dificuldade em se identificar antígenos realmente eficazes em outras espécies, pesquisadores estão investigando o benefício deste antígeno no controle de outras espécies de carrapatos (de Vos *et al.*, 2001). A vacinação com Bm86 tem mostrado ser efetiva contra outras espécies de *Boophilus* incluindo *B. annulatus* e *B. decoloratus*. Mesmo apresentando uma proteína, HA98, com homologia de 80% à Bm86 (Odongo *et al.*, 2007), nenhuma proteção significativa foi encontrada contra *R. appendiculatus* (Odongo *et al.*, 2007; Pipano *et al.*, 2003).

A vacina é efetiva contra carrapatos adultas, mas não contra estágios imaturos da espécie *Boophilus*; controla algumas outras espécies, mas tem variáveis efeitos contra *B. microplus* de diferentes localizações geográficas (Trimnell; Hails; Nuttall, 2002). O controle integrado de acaricidas químicos e vacina contribui para garantir a saúde animal, reduzir custos e diminuir o impacto negativo de acaricidas ao ambiente (Valle *et al.*, 2004).

1.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA/CONTROLADA

A tecnologia de liberação sustentada/controlada representa um grande avanço na área de saúde humana e animal. Ela tem uma importante função no desenvolvimento de formas de dosagem farmacêuticas que prolonguem a duração de liberação do fármaco por vários dias ou meses. Isso pode ser conseguido pela incorporação de fármacos em materiais poliméricos para controlar ou somente sustentar a liberação de fármacos por um período de tempo prolongado (Schliecke *et al.*, 2004).

Os sistemas de liberação, frequentemente descritos como *drug delivery systems*, oferecem inúmeras vantagens frente a outros de dosagem convencional. Essas vantagens incluem:

- Liberação progressiva e controlada do ativo a partir da degradação da matriz, levando a maior eficácia terapêutica e redução no número de doses.
- Redução da toxicidade e concentração constante do ativo na circulação.
- Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas.

A maioria dos sistemas de liberação controlada/sustentada para uso veterinário é fabricada com polímeros não degradáveis, assim como o silicone, poliuretanos e derivados do etileno vinilacetato, que são baratos, biocompatíveis, biologicamente inertes e recebem aprovação regulatória. Mas, nos últimos anos, o interesse pela utilização de polímeros biodegradáveis vem aumentando, pois os sistemas de liberação preparados a partir destes não necessitam serem removidos após o final do tratamento reduzindo custos e stress do animal (Schliecke *et al.*, 2004).

A encapsulação de proteínas em sistemas de liberação sustentada tem sido amplamente investigada desde o final da década de 80 quando o primeiro produto de liberação sustentada de um peptídeo foi aprovado para uso clínico pelo FDA (Fu; Klibanov; Langer, 2000). No campo da imunologia, o uso destes sistemas permitiu a introdução do conceito de vacina de dose única que poderia aumentar significativamente a cobertura das vacinas e reduzir os custos com campanhas de

vacinação. Um bom sistema de liberação para vacina é caracterizado por uma liberação do antígeno por um longo período de tempo, reduzindo ou eliminando a necessidade de inoculação subsequente (dose de reforço) e obtendo uma proteção efetiva. Extrapolando para a área veterinária, estes sistemas podem representar uma ferramenta poderosa para garantir a saúde animal e reduzir custos com manejo, considerando que a administração de vacinas a um grande número de animais é logisticamente desafiante, trabalhosa e estressante, tanto para os aplicadores quanto para os animais (Sales-Júnior *et al.*, 2005).

As microesferas biodegradáveis vêm sendo muito estudadas como sistemas de liberação para compostos bioativos, assim como fármacos de baixo e alto peso molecular, DNA e antígenos. As microesferas são capazes de prover liberação sustentada e controlada do composto encapsulado, enquanto o composto não liberado pode ser protegido de degradação e clearance fisiológico (Freitas; Merkle; Ganden, 2005). Quando o composto encapsulado é um antígeno, essa liberação sustentada melhora o nível da resposta imune ou foca a resposta em um padrão desejável (por exemplo, Th1) (Singh; O'Hagan, 2003), funcionando como adjuvante vacinal. Já foi observado que antígenos encapsulados induzem maior resposta imune que antígenos não encapsulados, especialmente para antígenos de subunidades. A resposta imune a antígenos encapsulados em micropartículas é igual, ou melhor, que aquela utilizando adjuvantes padrões, como compostos de alumínio ou adjuvante de Freund (Rathbone; Gurny, 2000).

1.3.1 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Os polímeros biodegradáveis mais utilizados são os poliésteres, tais como: o ácido polilático (PLA), o ácido glicólico (PGA), o ácido polilático-co-glicólico (PLGA) e a policaprolactona (PCL). Estes materiais são disponíveis comercialmente em diferentes composições e pesos moleculares que permitem controlar a degradação do polímero. Estes polímeros apresentam segurança, biocompatibilidade e biodegradação (Rathbone; Gurny, 2000).

1.3.1.1 Ácido polilático (PLA), ácido glicólico (PGA) e ácido polilático-co-glicólico (PLGA) (Figura 3)

Estes polímeros sofrem degradação levando à formação de compostos não tóxicos que podem ser metabolizados e excretados pelos padrões fisiológicos normais. A hidrólise do PLGA produz ácidos lático e glicólico, que são metabolizados no Ciclo de Krebs a CO_2 e água. A degradação segue dois estágios, o primeiro (degradação) envolve cisão hidrolítica das pontes ésteres, gerando oligômeros e monômeros, e uma diminuição geral do peso molecular do polímero; o segundo estágio (erosão) envolve perda de massa e a taxa de cisão da cadeia polimérica pode aumentar devido à autocatálise na presença de produtos ácidos da degradação (Tamber *et al.*, 2005). O PLA e o PGA seguem esse mesmo padrão de degradação. Por gerarem ambiente ácido ao redor da partícula durante sua degradação (Fu *et al.*, 2000), artifícios de proteção devem ser utilizados para ativos sensíveis ao pH encapsulados em partículas de PLA, PGA e PLGA.

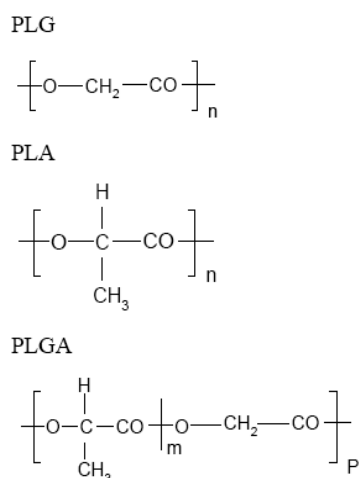


Figura 3: Estrutura química dos poliésteres PLG, PLA e seu copolímero PLGA.

1.3.1.2. Policaprolactona (PCL)

A PCL (**Figura 4**) é um polímero semicristalino com temperatura de transição vítrea de -60°C e ponto de fusão variando de 59 a 64°C , dependendo da natureza cristalina. (Sinha *et al.*, 2004).

A degradação da PLC envolve duas fases: na primeira ocorre perda de peso molecular devido à cisão de cadeias e na segunda ocorre perda de massa por

erosão. Em comparação ao PLGA e outros polímeros, a degradação da PCL é lenta, tornando este polímero adequado para liberação por períodos maiores que um ano (Sinha *et al.*, 2004). Para obter as características de liberação desejáveis, podem-se preparar ligas poliméricas com outros polímeros de degradação mais rápida.

A PCL apresenta algumas vantagens frente aos polímeros derivados dos ácidos glicólico e láctico, tais como lenta degradação e ausência de ambiente ácido durante a degradação (Dhanaraju *et al.*, 2003), alta permeabilidade a pequenas moléculas e excepcional habilidade para formar ligas com outros polímeros (Sinha *et al.*, 2004).

A PCL é um polímero biocompatível, o que foi demonstrado por um estudo realizado por Serrano *et al.* (2004) o qual avaliou a toxicidade de filmes de PCL em fibroblastos L929 de camundongos.

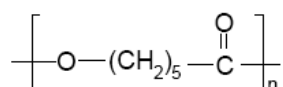


Figura 4: Estrutura química do polímero PLC.

Outros materiais também são estudados com menor freqüência, como ligas poliméricas, proteínas (ex.: colágeno, gelatina, albumina), polissacarídeos (ex.: quitosana, ácido hialurônico, celulose) e lipídeos (Sinha, V.R.; Trehan, Aman; 2003).

1.3.2 PREPARO DE MICROESFERAS

O preparo das microesferas deve ser feito de modo seguro, econômico, robusto e bem controlado. Atualmente o processo de encapsulação é realizado por uma das três técnicas básicas: extração/evaporação de solvente, separação de fase (coacervação) e *spray drying* ou por modificações das mesmas (Rathbone; Gurny, 2000; Freitas; Merkle; Ganden, 2005; O'Donnell; McGinity, 1997).

A técnica por spray drying é relativamente simples, mas como utiliza ar de secagem a temperaturas elevadas não deve ser utilizada para encapsular substâncias sensíveis à temperatura. Além disso, o controle do tamanho das partículas é difícil e o rendimento para pequenos lotes é moderado. O método de coacervação é freqüentemente prejudicado por resíduos de solventes e de agentes de coacervação e não é adequado para preparar partículas na faixa micrométrica. Já o método de extração/evaporação de solvente não requer elevadas temperaturas nem agente indutor de separação de fases. Utilizando condições bem definidas, tais como velocidade de agitação, temperatura de evaporação do solvente, proporção entre fases interna e externa e quantidade de tensoativo, é possível obter controle de tamanho das partículas, alta eficiência de encapsulação e baixo conteúdo de solvente residual (Freitas; Merkle; Ganden, 2005).

O método de evaporação de solvente consiste basicamente de quatro etapas (Freitas; Merkle; Ganden, 2005):

i. Incorporação do composto bioativo em solvente orgânico contendo o material formador da matriz.

Os compostos bioativos podem ser adicionados na solução do material da matriz por co-dissolução em um solvente comum, dispersão do material sólido finamente pulverizado ou emulsificação de uma solução do composto bioativo imiscível com a solução de material da matriz (Tamber *et al.*, 2005). Neste último caso haverá formação de uma emulsão água/óleo que em alguns casos necessita ser estabilizada pela adição de substâncias com ação tensoativa. Se o composto bioativo for dissolvido no mesmo solvente do material da matriz ou for disperso neste, na próxima etapa haverá formação de uma emulsão simples (O/A); no caso do composto bioativo ser adicionado na forma de uma solução imiscível com o solvente da matriz, haverá formação de uma emulsão múltipla (A/O/A).

ii. Emulsificação da fase orgânica em uma fase contínua imiscível com a primeira.

Esta etapa definirá o tamanho da micropartícula resultante e por isso deve ser bem controlada. O tamanho da partícula pode afetar além de outros, a taxa de liberação do ativo, a eficiência de encapsulação e a biodistribuição das partículas após

administração subcutânea ou intranasal. Os métodos mais utilizados para formação das gotas da dispersão ativo/matriz no preparo das microesferas são: agitação, mistura estática, extrusão e gotejamento. Dentre estes métodos, o mais utilizado e mais simples é a agitação. A dispersão ativo/matriz é adicionada a uma solução, frequentemente aquosa e imiscível com a dispersão, sob agitação a uma velocidade suficiente para se obter o tamanho de gota desejado. Neste caso, a velocidade é o principal parâmetro para controlar o tamanho da gota da dispersão ativo/matriz na fase contínua. Normalmente o aumento da velocidade de agitação resulta em uma diminuição do tamanho da partícula. Esta diminuição vai depender também da viscosidade das fases dispersa e contínua, da tensão interfacial entre as duas fases, da proporção de volume entre elas, da geometria e tamanho do impulsor.

Um aumento na viscosidade da dispersão ativo/matriz levará à formação de microesferas maiores, pois haverá necessidade de maior força de cisalhamento para romper as gotas. Esse aumento da viscosidade pode ser desejável para restringir a migração do ativo para a fase contínua e assim aumentar a encapsulação. Isso pode ser conseguido por aumentar a concentração ou o peso molecular do material formador de matriz.

A adição de substância com ação tensoativa na fase contínua reduz a tensão interfacial das gotas formadas, diminuindo a coalescência entre elas e resultando numa diminuição no tamanho das microesferas formadas. Uma substância muito utilizada para este fim é o álcool polivinílico.

O impacto da variação da proporção entre fase contínua e fase dispersa ainda não é bem definido. Alguns estudos reportam a redução no tamanho da microesfera com a diminuição da fase dispersa, mas outros estudos relatam não haver nenhuma interferência.

iii. Formação das micropartículas por extração do solvente da fase dispersa.

A formação das microesferas é resultante da eliminação do solvente orgânico, que pode ser realizada por dois métodos: evaporação ou extração. Nos dois casos a fase orgânica deve ser ligeiramente miscível com a fase contínua de modo que ocorra partição para a fase contínua levando à precipitação do material da matriz e formação das microesferas. Na evaporação do solvente, a fase contínua é

insuficiente para dissolver o volume de solvente da fase dispersa e o solvente evapora na interface água/ar após se difundir pela fase aquosa (O'Donnell; McGinity, 1997). Já na extração, o volume de fase contínua deve ser suficiente para dissolver o solvente da fase dispersa para que ocorra o endurecimento da matriz e formação das microesferas. A remoção de solvente volátil pode ser controlada pela temperatura da dispersão de microesferas. Maiores temperaturas facilitam a evaporação do solvente da fase contínua e desse modo mantêm um alto gradiente de concentração do solvente entre as microesferas e a fase contínua. Alguns estudos mostram que a temperatura pode interferir no tamanho e na porosidade das microesferas formadas.

iv. Separação e secagem das micropartículas.

A separação das microesferas da fase contínua é normalmente realizada por filtração ou centrifugação. Após separação as microesferas são lavadas para eliminar agentes estabilizantes ou ativos não encapsulados e finalmente são secas. A secagem pode ser realizada em condições ambientais, pressão reduzida, aquecimento ou por liofilização. O procedimento de secagem remove não somente a fase contínua ou o fluido de lavagem, mas também traços de solventes e fase contínua do interior das partículas. Assim, as condições de secagem influenciam na quantidade de solvente e umidade residual, na morfologia e porosidade da microesfera e também na recristalização do ativo dentro das microesferas, podendo afetar o perfil de liberação do produto final.

1.3.3 MICROESFERAS COMO SISTEMAS VACINAIS

Uma vacina ideal deve prover proteção completa e persistente seguida de única administração, ser estável a altas temperaturas (reduzindo ou eliminando a necessidade de refrigeração) e apresentar baixo custo de produção permitindo seu uso difundido (Cleland, 1999). Várias abordagens têm sido utilizadas para se conseguir a liberação sustentada do antígeno de um sistema vacinal, tais como lipossomas, emulsões, virossomas e micropartículas (Singh; O'Hagan, 2003). Dentre os sistemas vacinais citados, as microesferas são os mais estudados.

O perfil de liberação das microesferas é definido pelas características do polímero (principalmente composição e peso molecular) e do procedimento utilizado para o preparo das micropartículas. Uma liberação na forma pulsátil pode ser útil para mimetizar repetidas imunizações (Cleland, 1999). Esse tipo de liberação é conseguido por dificultar a difusão do antígeno através da partícula, o que pode ser feito aumentando-se a viscosidade da fase polimérica ou aumentando-se a proporção do polímero mais hidrofóbico (Cleland, 1999; Hanes; Cleland; Langer, 1997). Outra forma de se conseguir pulsos de antígeno é associar microesferas de diferentes tamanhos ou composições poliméricas.

Inicialmente foi proposto que microesferas utilizadas como sistemas de liberação sustentada melhoravam a resposta imune por sustentarem liberação do antígeno por um longo tempo, fenômeno conhecido como teoria de depósito de ação adjuvante. De fato esses sistemas podem prover uma liberação do antígeno por semanas ou meses, um tempo muito maior que a liberação provida por sais de alumínio ou emulsões água/óleo como o adjuvante de Freund (Hanes; Cleland; Langer, 1997). A liberação do antígeno encapsulado ocorre essencialmente através de difusão pela matriz e/ou erosão do polímero. Após incubação da microesfera em meio aquoso, o antígeno localizado na superfície da partícula ou próximo dela difunde para o meio ao seu redor. A liberação do antígeno, a partir da liberação inicial (burst), dependerá da porosidade e da hidrofiliabilidade das partículas, tão bem quanto das forças de interação entre polímero e antígeno. As microesferas porosas, hidrofílicas ou com pequena interação entre polímero/antígeno apresentarão liberação mais rápida do antígeno, pois a penetração da água na microesfera e a dissolução/difusão do antígeno serão facilitadas. Caso a microesfera não seja porosa, seja hidrofóbica ou a interação entre polímero/antígeno seja muito alta poderá ocorrer uma *lag phase* até que o polímero hidrolise e forme canais por onde a água possa penetrar nas partículas (Cleland, 1999; Tamber *et al.*, 2005).

O tamanho da microesfera é outro parâmetro muito importante no desenvolvimento da formulação. Partículas menores que 10 μm podem ser rapidamente fagocitadas por macrófagos, enquanto partículas maiores que 10 μm necessitam sofrer biodegradação para que a fagocitose ocorra. Neste caso, as microesferas são cobertas por uma ou várias camadas de macrófagos como conseqüência de uma resposta a partículas estranhas. Conseqüentemente, é

esperado que a degradação, liberação do antígeno, localização e apresentação do antígeno de microesferas maiores que 10 μm sejam diferentes das partículas menores. Na administração de microesferas, uma resposta a corpo estranho ocorre, resultando em uma inflamação inicial aguda. Esta inflamação inicial é seguida pela infiltração de neutrófilos e outras células. Estas células podem consumir a proteína liberada e produzir a resposta imune (Sinhá; Trehan; Aman, 2003).

1.3.4 ESTABILIDADE DO SISTEMA VACINAL

Para manter o padrão de qualidade exigido pelo mercado e pelos órgãos controladores, os fabricantes de vacinas devem garantir a estabilidade do sistema vacinal, o que inclui estabilidade do sistema de liberação e da proteína encapsulada. Os fabricantes devem garantir que o processo de fabricação da vacina não interfira na integridade da proteína e que esta se mantenha ativa durante o armazenamento e após administração. Além disso, não deve haver formação de nenhum composto tóxico durante o armazenamento da vacina.

Segundo o MAPA (Ministério da Agricultura), para um produto farmacêutico ser considerável estável, a degradação do ativo deve ser igual ou inferior a 5% e os outros parâmetros de qualidade do produto devem permanecer dentro das especificações. Quando se trabalha com proteínas, o termo estabilidade não se define apenas como teor, mas deve avaliar as estabilidades química e física do composto. A estabilidade química envolve tipicamente a integridade da seqüência de aminoácidos (estrutura primária) e a reatividade das cadeias laterais. Deve-se avaliar não somente a quantidade de proteína que se mantém terapeuticamente ativa, mas também a quantidade e segurança dos compostos formados pela degradação da proteína (muitos produtos de degradação podem causar efeitos adversos, como toxicidade e antigenicidade) (Bilati; Allémann; Doelker, 2005). Muitas vezes a atividade de uma proteína depende da estrutura primária e às vezes da secundária, terciária e/ou quaternária. A estabilidade física da proteína deve ser avaliada sempre que a atividade biológica não depender apenas da estrutura primária.

A degradação química inclui: desaminação, isomerização, hidrólise, racemização, oxidação, formação e/ou eliminação de pontes dissulfeto. A

degradação física envolve desnaturação reversível ou irreversível, com perda da estrutura terciária e reações de degradação, agregação e/ou precipitação. Na maioria das vezes a propriedade farmacêutica depende da atividade biológica e assim a eficácia farmacêutica pode ser monitorada pela atividade biológica no final do processo de formulação. Do mesmo modo, a antigenicidade é necessária para garantir a eficácia da proteína como vacina e para excluir possível degradação da mesma (Bilati; Allémann; Doelker, 2005). A antigenicidade de uma proteína depende dos determinantes antigênicos intactos. Deve-se lembrar que estes podem ou não estar relacionados à estrutura terciária da proteína.

O uso de metodologias analíticas físico-químicas, bioquímicas e imunológicas permitem a caracterização da proteína ou do produto final (por exemplo, o tamanho molecular, a carga e a hidrofobicidade) e a detecção de produtos de degradação resultantes de desaminação, oxidação, agregação ou fragmentação. Alguns métodos que podem ser utilizados incluem eletroforese (*polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate* - SDS-PAGE, imunoeletroforese, *Western blotting*), cromatografia de alta resolução (cromatografia de fase reversa, gel filtração, troca iônica, cromatografia de afinidade) e mapeamento de peptídeos (ICH Q5C, 1995).

Além da avaliação da estabilidade da proteína é necessário avaliar também a estabilidade da formulação. Características como aparência visual (cor ou opacidade, textura, tempo de dissolução de pós), presença de partículas visíveis em soluções ou após reconstituição de pós ou liofilizados, pH, nível de umidade, características após ressuspensão, etc. (ICH Q5C, 1995).

1.3.4.1. Condições de armazenamento para avaliação da estabilidade – ICH/MAPA

O documento Q5C – *Quality of Biotechnological Products: Stability testing of Biotechnological/Biological Products* desenvolvido pelo *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) trata dos requisitos necessários para a realização de testes de estabilidade para produtos de origem biológica/biotecnológica. Este documento é perfeitamente compatível com as normas descritas no *Veterinarian International Conference on Harmonisation*

(VICH). Nestes documentos a estabilidade de um produto biológico/biotecnológico deve ser avaliada em longo prazo nas condições preconizadas para seu armazenamento. Entretanto, a realização de um estudo de estabilidade acelerada onde o produto é submetido a uma condição de estresse é encorajada por produzir dados de grande utilidade durante o processo de desenvolvimento do produto e sobre o que aconteceria com o produto em casos de exposição a condições fora daquelas especificadas para seu armazenamento.

1.3.4.2 Caracterização da proteína encapsulada

A caracterização da proteína encapsulada é realizada após sua extração da matriz polimérica. Os métodos utilizados para extração são baseados na solubilização da matriz polimérica em solvente orgânico e conseqüente precipitação da proteína ou na hidrólise alcalina da matriz polimérica e liberação da proteína para o meio externo.

Algumas das técnicas mais utilizadas para caracterização de proteínas serão aqui descritas.

a) Eletroforese

A eletroforese é um método muito utilizado para separação de proteínas, baseado na migração de proteínas carregadas em um campo elétrico. Sua vantagem é que as proteínas podem ser separadas e visualizadas, permitindo estimar o grau de pureza de uma proteína em particular. A eletroforese permite ainda a determinação de propriedades da proteína assim como seu ponto isoelétrico e peso molecular aproximado.

Na eletroforese a força que move a macromolécula é um potencial elétrico (**Figura 5**)., E . A mobilidade eletroforética da molécula, μ , é a razão entre a velocidade da partícula, V , e o potencial elétrico

$$\mu = V / E$$

A eletroforese de proteínas é normalmente realizada em géis de poliacrilamida. Esse gel funciona como uma peneira molecular permitindo a migração de proteínas na proporção de seu peso molecular.

São vários os tipos de eletroforese. No caso do SDS-PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate*) a proteína é desnaturada utilizando β -mercaptoetanol, que é adicionado para romper pontes dissulfeto. O SDS liga-se às proteínas em quantidade proporcional ao peso molecular das mesmas: cerca de uma molécula de SDS para dois resíduos de aminoácidos. O SDS fornece cargas negativas à molécula, mas como a razão carga/peso molecular é praticamente idêntica para todas as proteínas, a separação ocorrerá como resultado do peneiramento molecular através da malha do gel e não pela carga (Scopes, 1994).

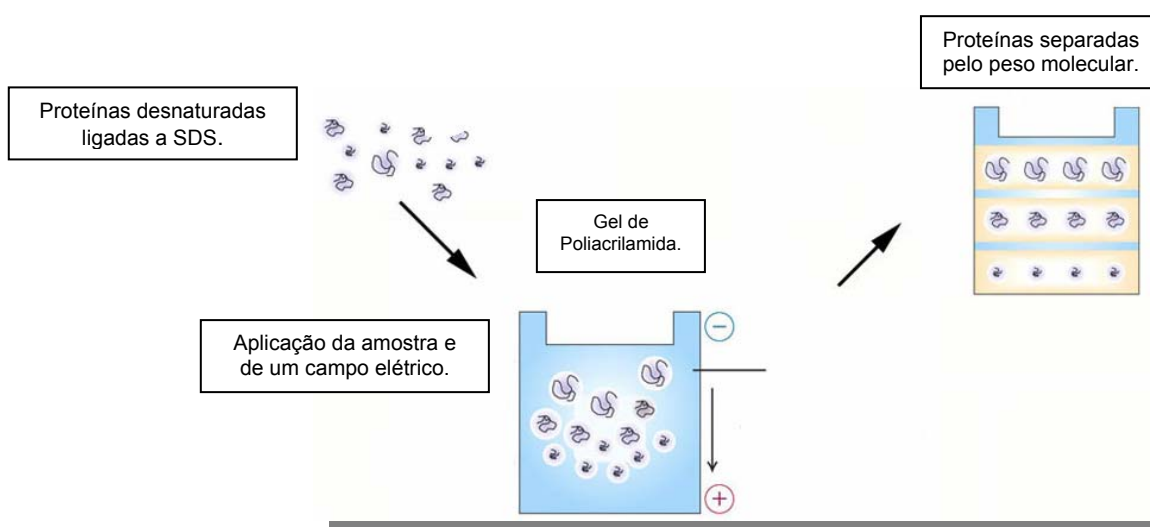


Figura 5: Desenho esquemático da eletroforese em gel de acrilamida

A amostra, após tratamento com agente redutor e SDS, é aplicada ao gel e a proteína se move através dos poros do gel após aplicação do campo elétrico. As proteínas podem ser visualizadas após eletroforese por tratar o gel com o corante “Coomassie blue” que se liga às proteínas, mas não ao gel.

b) Western Blotting

Um modo de identificar uma determinada proteína separada por eletroforese em gel de acrilamida é utilizar anticorpos específicos contra a proteína desejada. Por serem proteínas grandes, os anticorpos não difundem no gel com velocidade

significativa e assim não podem interagir com seu antígeno quando a sua solução é simplesmente colocada em contato com o gel (**Figura 6**). Assim, desenvolveu-se uma técnica de transferência, realizada por difusão ou migração eletroforética, onde a proteína é transferida do gel para uma membrana adsorvente (normalmente feita de nitrocelulose). Essa técnica, semelhante ao *Southern blotting* para transferência de DNA, foi chamada de *Western Blotting*.

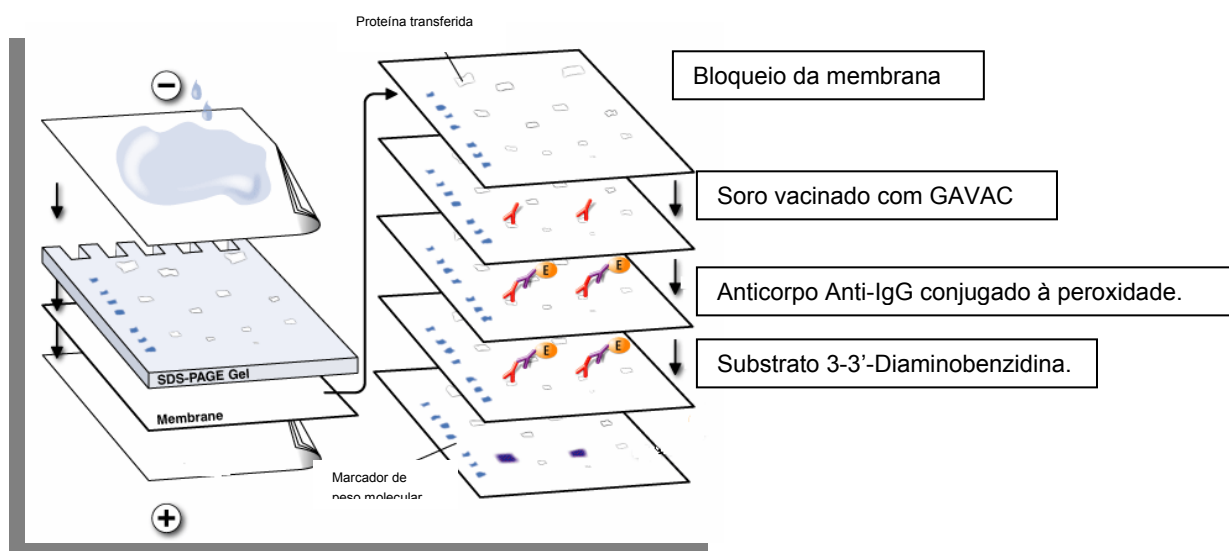


Figura 6: Desenho esquemático do *Western Blotting*.

Após transferência, a membrana deve ser colocada em contato com uma solução do anticorpo. Para detecção do anticorpo, seu excesso é lavado e a membrana é colocada em contato com um outro anticorpo contendo um método de detecção. Este método pode ser enzimático e então haverá uma enzima conjugada ao anticorpo. Para finalizar a detecção, adiciona-se uma solução contendo o substrato da enzima ligada à membrana e a reação será visualizada pelo aparecimento de cor ou quimioluminescência, dependendo do substrato e da enzima conjugada (Scopes, 1994).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar sistemas poliméricos de liberação sustentada para encapsulação de uma proteína recombinante e utilização como vacina contra carrapato bovino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Variar os parâmetros de preparo das micropartículas e definir as melhores condições, visando o escalonamento.
- Caracterizar as micropartículas e avaliar a influência dos parâmetros de preparo:
 - Determinação do tamanho da micropartícula.
 - Determinação da quantidade encapsulada de proteína.
 - Avaliação da liberação *in vitro* da proteína encapsulada.
 - Avaliação da estabilidade do sistema vacinal sob condições controladas de umidade e temperatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 REAGENTES E MATÉRIAS-PRIMAS

- Diclorometano - Merck
- PLGA 50:50 -
- Proteína recombinante Bm86
- Álcool Polivinílico - Sigma
- Coomassie Protein Assay Reagent – Pierce
- Padrão de BSA
- Gel de Acrilamida 12,5%
- Marcador de peso molecular – GIBCO BRL
- Membrana de Nitrocelulose
- Soroalbumina bovina
- Tween 20 - Synth
- Soro de camundongo vacinado com GAVAC™
- Anticorpo anti-IgG de camundongo B7022– Sigma
- Placas de poliestireno de 96 poços - Maxisorp Nunc
- Na₂CO₃ - Synth
- NaHCO₃ - Synth
- NaN₃ - Vetec
- Soro bovino fetal
- Anticorpo Anti-IgG1 conjugados a biotina (A85-1) – Pharmingen
- Anti-IgG2a conjugados a biotina (R19-15) – Pharmingen
- kit StreptAB – Dako
- OPD – Sigma
- Ácido Sulfúrico - Vetec
- Água purificada
- Peroxidase - Sigma
- 3-3'-Diaminobenzidina - Sigma

3.1.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Homogeneizador Ultra Turrax T18 basic – IKA
- Homogeneizador Ultra Turrax UTL50 basic – IKA
- Homogeneizador Eurostar – IKA
- Hastes naval e dentada para Eurostar – IKA
- Haste para Ultra Turrax T18 – IKA
- Banho-maria – Nova Ética
- Centrífuga – Eppendorf
- Liofilizador – Liobrás
- Espectrofotômetro – Shimadzu
- Analisador de partículas Sald-2101 – Shimadzu
- Leitor de ELISA BIOTRAK II – Amersham
- Mini V8.10 (BRL) – Amersham
- Vortex Lab Dancer – IKA
- Shaker – Nova Ética
- Câmara climática a 30°C e 65% de umidade relativa – Nova Ética
- Refrigerador a 4°C – GE
- Balança analítica
- Micropipetas ajustáveis de 100-200uL e de 200-1000uL – Gilson
- Tubos cônicos para centrífuga de 2mL e 15mL – Eppendorf

3.1.3 Animais

Quinze animais mestiços *Bos taurus* pesando entre 200 e 300 Kg foram divididos em 4 grupos de 3 animais.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 PREPARO DAS MICROESFERAS

As microesferas foram obtidas pelo método de emulsão múltipla e evaporação do solvente. A fase aquosa (solução da proteína Bm86) foi adicionada sob uma solução de polímero em diclorometano, sob forte agitação, para se obter uma emulsão primária água/óleo (A/O). Em seguida a emulsão primária foi vertida na fase aquosa externa (solução de álcool polivinílico) e homogeneizada a fim de formar a emulsão múltipla água/óleo/água (A/O/A). A agitação foi mantida até evaporação completa do solvente orgânico. As microesferas foram lavadas para remoção do excesso de tensoativo, centrifugadas e liofilizadas.

Parte das microesferas foi preparada em bancada, outra parte foi preparada num conjunto de reatores demonstrado na **Figura 7**.

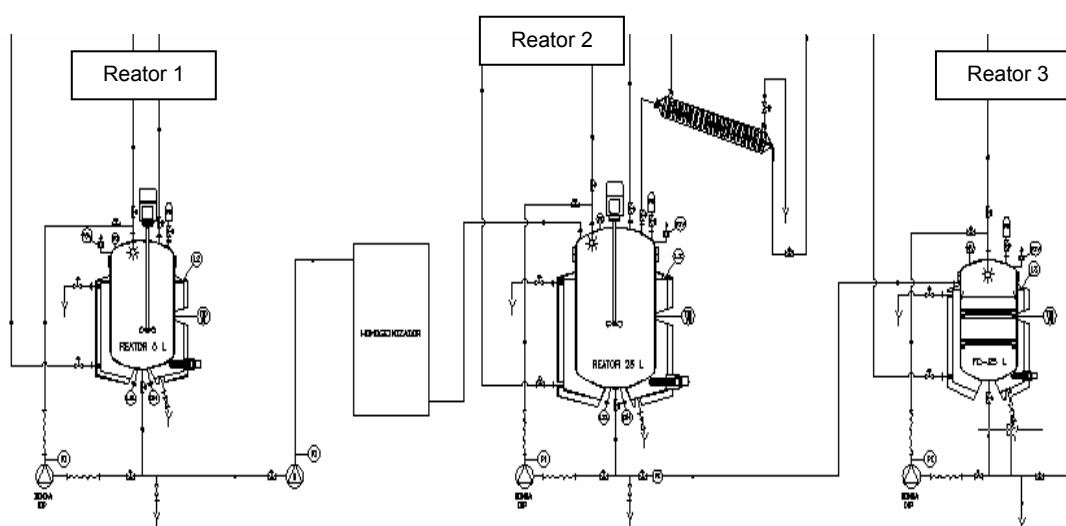


Figura 7: Desenho esquemático dos reatores utilizados no preparo de microesferas.

- No Reator 1 são adicionadas as soluções de polímero e de proteína que são rapidamente homogeneizadas. A mistura circula por um ultra-homogeneizador para formação da emulsão primária e esta é enviada para o Reator 2.

- No Reator 2, que já contém solução de álcool polivinílico sob agitação, haverá formação da emulsão múltipla. O Reator 2 é acoplado a um condensador e a uma bomba de vácuo que favorecem a evaporação do solvente orgânico e a formação das microesferas (o vácuo conseguido é de aproximadamente 600 mmHg).

- O Reator 3 contém um sistema de filtração para separação das microesferas. Este reator não foi utilizado, pois o volume de formulação preparada foi pequeno e a perda seria muito grande.

Esse conjunto de reatores permite a execução do processo em condições assépticas, assegurando a qualidade das microesferas em relação à esterilidade e contaminação por endotoxinas, uma vez que as micropartículas não podem ser submetidas aos métodos clássicos de esterilização por calor ou filtração.

3.2.1.1 Avaliação da influência de importantes parâmetros na formação da microesfera

Foram preparadas várias formulações variando-se alguns parâmetros de preparo tais como: tipo de polímero, concentração da solução de álcool polivinílico (PVA) e velocidade de agitação para formação da emulsão múltipla e evaporação do solvente. Essas variações são encontradas na **Tabela 2**.

Tabela 2: Variação dos parâmetros utilizados no preparo das microesferas.

Microesferas	1	2	3	4	5	6
Polímero	PLGA 50:50	PLGA 75:25	PLGA 75:25	PLGA 50:50	PLA	PLA
Massa de polímero (g)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Fase aquosa interna¹ (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Fase orgânica² (mL)	30	30	30	30	30	30
Fase aquosa externa³ (mL)	100 PVA 3%	100 PVA 3%	100 PVA 1%	100 PVA 1%	100 PVA 3%	100 PVA 1%
Agitação emulsão primária⁴ (rpm)	11000	11000	11000	11000	11000	11000
Agitação emulsão múltipla⁵ (rpm)	800	800	500	500	800	500
Fase aquosa externa³ (mL)	100 PVA 3%	100 PVA 3%	100 PVA 1%	100 PVA 1%	100 PVA 3%	100 PVA 1%
Agitação emulsão primária⁴ (rpm)	11000	11000	11000	11000	11000	11000

¹Solução de Bm86 (5,35 mg/mL) ²Diclorometano ³Solução de Álcool polivinílico (PVA)

⁴ Agitação durante 1 minuto ⁵ Agitação até evaporação total do solvente.

3.2.2 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA VACINAL

3.2.2.1 Avaliação da eficiência de encapsulação das microesferas

Para a determinação da taxa de encapsulação da proteína na microesfera foi utilizado o método de Bradford. Este método está baseado na interação entre o corante *Coomassie brilliant blue* BG-250 e as macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH da reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

A determinação de proteínas totais foi realizada após dissolver uma quantidade conhecida de microesferas (aproximadamente 10mg) em acetonitrila (1 mL). Para isso a suspensão de microesferas em acetonitrila foi vortexada por cerca de 3 minutos e incubada em banho de ultra-som por 15 minutos. A proteína precipitada na presença do solvente orgânico foi separada por centrifugação (3 minutos a 4°C e 15000 x g) e reconstituída em água. A quantidade de água utilizada para solubilizar a proteína foi calculada para que a concentração de proteína se encontrasse dentro da curva de calibração, para isso considerou-se uma taxa de encapsulação de aproximadamente 70%.

Numa placa de poliestireno de 96 poços foram adicionados:

- 50 µL de cada concentração de solução padrão de BSA (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 e 200 ug/mL);
- 50 µL de solução da amostra;
- 200 µL do reagente *Coomassie Plus*TM sobre cada poço de padrão e amostra.

A leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 600nm.

Uma curva de calibração foi construída a partir dos valores de absorbâncias encontrados para as diferentes concentrações de padrão. A concentração da proteína na solução aquosa foi encontrada utilizando sua leitura de absorbância e a equação da reta da curva de calibração.

Para calcular a eficiência de encapsulação das microesferas utilizou-se a concentração encontrada para a solução de proteína, o volume de solução de proteína, a massa de microesferas utilizada no teste, a massa de proteína utilizada na produção da microesfera e a massa total de microesferas produzida.

3.2.2.2 Eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE)

Após preparo e montagem, o gel de acrilamida (12,5 %) foi colocado na cuba eletrolítica contendo tampão de corrida. A amostra de proteína foi aquecida em banho-maria com tampão de amostra por aproximadamente 5 minutos (concentração da amostra – 0,5 a 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Foram aplicados, no topo das canaletas, 10 μL das amostras e 7 μL do padrão de proteína (*Protein Molecular Weight Standards High Range*). A corrida foi realizada em aparelho Mini V8.10 (BRL) a 140 V e 80 mA. Após o término da corrida o gel foi corado com corante *Coomassie Blue* para visualização das bandas de proteínas.

❖ Preparo das soluções

Solução de Bisacrilamida 30%

60,0 g de bisacrilamida foram adicionados a 200 mL de água, lentamente e sob agitação. Após completa dissolução, a solução foi filtrada em membrana de 0,45 μm . Todo procedimento foi realizado sob proteção da luz.

Solução de Tris-HCl 0,5M (pH8,8) – 4X

182 g de Tris Base foram dissolvidos em 600 mL de água. O pH foi ajustado para 8,8 com solução de HCl 1 M e o volume completado para 1,0 L com água. A solução foi filtrada em membrana de 0,45 μm e estocada a 4° C. Esta solução está 4 vezes concentrada; a diluição foi realizada no momento do uso.

Tampão de Corrida (qsp 1L) – 5X

72 g de glicina, 15 g de Tris base e 10 mL de SDS 10 % foram dissolvidos em aproximadamente 800 mL de água e o pH ajustado para 8,3 com HCl. O volume da solução foi completado com água. A solução foi diluída 5 vezes para uso.

Solução de SDS (Dodecilsulfato de Sódio) 10 %

20,0 g de SDS foram adicionados a 200 mL de água e homogeneizados até completa dissolução.

Tampão da amostra (qsp 10mL) – 5X

5,0 mL de TRIS base 0,5 M (pH=6,8), 1,25 g de SDS, 5,0 mL de glicerol, 714 µL de 2-mercaptoetanol (12,67 g/mol) e gotas de azul de bromofenol foram homogeneizados em béquer de vidro e este foi colocado em banho-maria para completa dissolução dos componentes. A solução foi diluída 5 vezes para uso.

❖ **Preparo dos Géis**

Gel de Separação (quantidade para 2 géis)

4,8 mL de água purificada (Milli-Q), 3,0 mL de Tris HCl 1,5 M (pH=8,8), 120 µL de SDS (Dodecilsulfato de sódio) 10 % e 3,9 mL de Bisacrilamida 30 % foram adicionados a um béquer e homogeneizados lentamente para evitar formação de bolhas de ar. 60 µL de persulfato de amônio 10 % e 24 µL de TEMED foram adicionados no momento da montagem do gel.

Gel de Empacotamento (quantidade para 2 géis)

6,1 mL de água purificada (Milli-Q), 2,5 mL de Tris HCl 0,5 M (pH=8,8), 100 µL de SDS 10 % e 1,33 mL de Bisacrilamida 30 % foram adicionados a um béquer e homogeneizados lentamente para evitar formação de bolhas de ar. 50 µL de persulfato de amônio 10 % e 10 µL de TEMED foram adicionados no momento da montagem do gel.

3.2.2.3 **Western Blotting**

A confirmação, *in vitro*, da manutenção da atividade antigênica da proteína após a encapsulação foi avaliada por *Western Blotting*. As amostras submetidas à eletroforese em gel de acrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada a 37°C em tampão de bloqueio (PBS contendo 5 % de soroalbumina bovina) por 1 hora sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05 % de Tween 20) sob agitação por 10 minutos. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Adicionou-se então soro de camundongo vacinado com GAVACTM diluído 1:100 em PBS contendo 1 % de soroalbumina bovina, e incubou-se a 37° C por 2 horas sob agitação. Foi efetuada a lavagem como descrito anteriormente. A

membrana foi então incubada com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase a 37° C por 2 horas sob agitação. Após outra série de lavagens, procedeu-se à revelação da reação utilizando o substrato 3-3'-Diaminobenzidina (5 mg em 10 mL de PBS). A reação foi interrompida com água destilada e a membrana seca a temperatura ambiente.

3.2.2.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os títulos de anticorpos foram determinados nos soros pré-ímmunes e em soros coletados após imunização por ensaio imunoenzimático (ELISA). Placas de poliestireno de 96 poços foram recobertas com 0,1 mL de solução da proteína rBm86 em tampão de ligação (Na_2CO_3 14,3 mM, NaHCO_3 10,3 mM, NaN_3 0,02 %, pH=9,6) e incubadas durante a noite, a 4° C. Posteriormente, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (0,05 % de Tween 20 em PBS) e bloqueadas por 1 hora a 37°C com tampão de bloqueio (5 % de soro bovino fetal em PBS). Após lavagem, foram adicionadas as amostras (soros diluídos seriadamente) que foram incubadas por 2 horas, a 37°C. Após lavagem, anti-IgG de camundongo (B7022), anti-IgG1 e anti-IgG2a conjugados a biotina (A85-1 e R19-15, respectivamente) foram adicionados para detecção de anticorpos específicos. Após lavagem, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos com os reagentes A e B do kit StreptAB. Para detecção dos anticorpos, o substrato OPD foi adicionado; a reação foi finalizada pela adição de 50 μL de uma solução a 16 % de ácido sulfúrico. A leitura da absorbância foi realizada em 490 nm em leitor de ELISA. O título de anticorpos foi definido como a maior diluição do soro que apresenta valor de absorbância de 0,5.

3.2.2.5 Determinação da distribuição de diâmetro das microesferas

A distribuição de diâmetro das partículas foi determinada por difratometria laser, utilizando o Shimadzu Sald-2101. A difração a laser baseia-se no princípio (difração Fraunhöffer) de que, quanto menor o tamanho da partícula, maior o ângulo de difração de um feixe luminoso que atravessa uma população de partículas. Essa técnica não mede partículas individuais. Através de transformações matemáticas complexas (transformada de Fourier inversa), calcula-se uma estatística de

distribuição de tamanho dessa população de partículas. Opera em sistema ótico com um ou mais feixes de luz possibilitando medir a distribuição precisa do tamanho das partículas.

As amostras foram analisadas após ressuspensão em água. Os resultados foram expressos como valores cumulativos de % sob determinado diâmetro.

3.2.2.6 Ensaio de liberação *in vitro*

As microesferas foram ressuspensas em PBS (200 mg de microesferas em 3 mL de PBS) e mantidas sob agitação constante a 37° C. A coleta das alíquotas de sobrenadante (200 µL) foi realizada após centrifugação das amostras (15000 x g/5 min) em intervalos de tempo pré-estabelecidos. A cada coleta de amostra o volume de PBS foi repostado.

Uma curva de calibração foi construída utilizando-se BSA (Soroalbumina bovina) como padrão. As concentrações correspondentes foram: 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 e 200 µg/mL.

Um volume de 50 µL de cada concentração do padrão e amostra foi colocado numa placa de 96 poços. Foi adicionado, sob cada amostra e padrão, 200 µL do reagente *Coomassie Protein Assay Reagent*.

A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro Biotrak, utilizando o comprimento de onda de 600 nm.

Construiu-se uma curva de calibração a partir dos valores de absorbâncias encontrados para as diferentes concentrações de padrão. A concentração da proteína na amostra foi encontrada utilizando sua leitura de absorbância e a equação da reta da curva de calibração.

❖ Solução de PBS:

- pesaram-se 8 g de cloreto de sódio, 0,2 g de fosfato de potássio monobásico, 1,15 g de fosfato de sódio dibásico e 0,2 g de cloreto de potássio;
- transferiram-se os sais para béquer de 1 L;

- adicionaram-se 900 mL água purificada e forneceu-se agitação magnética até total dissolução dos sais;
- ajustou-se o pH para 7,4;
- completou-se o volume para 1 L com água purificada em proveta calibrada.

3.2.2.7 Avaliação da Imunogenicidade

Camundongos BALB/c foram imunizados com microesferas contendo Bm86. Em períodos de 1, 2, 3 e 4 semanas os camundongos foram sangrados pelo plexo orbital com auxílio de pipeta pasteur. O sangue total foi incubado à temperatura ambiente por 2 horas. As amostras foram então centrifugadas a 3200 x g, 4°C por 5 minutos para separação do soro. O soro foi coletado e armazenado a -20°C até o momento da dosagem quando foram diluídos 10 e 100 vezes.

A dosagem de anticorpos foi realizada por ELISA como descrito no item 3.2.2.4.

3.2.2.8 Ensaio de Esterilidade

O ensaio de determinação da esterilidade da formulação foi realizado conforme preconizado pela Farmacopéia Americana USPXXVIII com uma pequena adaptação. Para tal, a amostra de microesferas foi exatamente pesada e transferida para tubos contendo 10 mL de meio de cultura caseína-soja. Os tubos foram mantidos por 72 horas em estufa a 37°C, para pesquisa de bactérias, e a 25°C, para pesquisa de fungos. Após incubação, 1 mL de meio de cada tubo foi transferido para tubos contendo 10 mL de meio de cultura caseína-soja que foram incubados a 25°C e a 37°C por mais 15 dias. Como controle negativo utilizou-se o meio de cultura puro, e como controle positivo utilizou-se o meio de cultura inoculado com *Staphylococcus aureus* (pesquisa de bactéria) e *Candida albicans* (pesquisa de fungos). Após 15 dias realizou-se a leitura do ensaio, sendo que turvação do meio significa presença de microorganismos.

A adaptação foi feita em função da turvação inicial do meio causada pelas micropartículas. Para eliminar essa turvação fez-se uma diluição do meio para novo tubo após 72 hs de incubação.

3.2.2.9 Ensaio de Endotoxina

A contaminação por endotoxinas foi avaliada pelo teste cromogênico de LAL utilizando o kit QCL-1000 Chromogenic LAL Test (BioWhittaker).

Esse método se fundamenta no emprego de um substrato cromogênico sintético incolor. O substrato é composto por um pequeno peptídeo ligado por uma arginina C-terminal a uma molécula do cromóforo p-nitroanilina (pNA). Uma vez ativada a cascata do LAL, a enzima coaguladora provoca a liberação da molécula de pNA de cor amarela. O desenvolvimento da coloração é proporcional à concentração de endotoxina na amostra.

O kit QCL utiliza o método do ponto final. Neste método, transfere-se a amostra e o reativo LAL para placas de 96 poços que são incubados a 37°C. Após incubação, adiciona-se o substrato cromogênico e retorna-se à incubação a 37°C. A reação é interrompida pela adição de solução de ácido sulfúrico e a leitura de DO feita em leitor de microplacas.

Para realização do ensaio, uma massa de microesferas foi exatamente pesada e ressuspenso em água estéril e apirogênica. A suspensão foi mantida sob agitação a 37° C por 24 horas e depois centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e submetido à análise de endotoxinas.

3.2.2.10 Ensaio de soro conversão em bovinos

Quinze animais mestiços *Bos taurus* pesando entre 200 e 300 Kg foram divididos em 4 grupos de 3 animais. Este estudo teve um caráter exploratório para avaliar a capacidade de indução da resposta imune em bovinos, mas o objetivo não foi de avaliar a eficácia, uma vez que o número de animais é pequeno para ter uma avaliação estatística. Os grupos receberam as seguintes formulações:

Grupo 1 – Controle não vacinado.

Grupo 2 – 3 doses de GAVAC® nas semanas 0, 4 e 7.

Grupo 3 – 3 doses de TickGard® nas semanas 0, 4 e 7.

Grupo 4 – 1 dose de microesferas contendo Bm86.

Os animais foram sangrados antes da vacinação para avaliação do soro pré-imune e a cada 2 semanas para pesquisa da produção de anticorpos anti-Bm86.

Avaliou-se a produção de IgG total e das sub-classes IgG1 e IgG2a específicos para a rBm86 por ELISA. A cada coleta de sangue, os animais foram pesados e avaliados clinicamente para detecção de possíveis efeitos adversos. Os animais foram mantidos em estado de semi-confinamento recebendo silagem e ração *ad libitum* para compor a dieta.

3.2.3 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

As formulações foram submetidas a estudos de estabilidade de longa duração (4° C) e acelerado (30° C e 65 % UR; 40° C e 75 % UR) por um período de 3 meses. Para isso foram acondicionadas em frascos de vidro de 2mL contendo 1,0 g de microesferas liofilizadas. A amostragem foi estabelecida de acordo com o preconizado pelo VICH (*Veterinarian International Conference on Harmonization*). As microesferas foram caracterizadas mensalmente até o terceiro mês. A avaliação da estabilidade das formulações foi realizada pela observação das características físicas das microesferas, como aparência, fluidez, ressuspensão em PBS, pela avaliação da integridade da proteína encapsulada por SDS-PAGE e manutenção da capacidade de ser reconhecida por anticorpos anti-Bm86 utilizando *Western Blotting*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os requerimentos que uma microesfera polimérica deve encontrar para ser considerada uma boa vacina são eficiência na encapsulação da proteína, alto rendimento, estabilidade da proteína encapsulada, uniformidade lote a lote e inter-lote, e partículas isentas de agregados. É importante que o processo de preparo seja simples, reprodutível e escalonável e que o método de encapsulação seja capaz de produzir diferentes tipos de perfis de liberação por manipular as condições do preparo (Sinhá; Trehan, 2003). Buscando atender esses requerimentos de uma boa formulação, selecionou-se o método de emulsão múltipla e evaporação de solvente que apresenta como vantagens: possibilidade de se utilizar solução aquosa da proteína, alto rendimento no preparo, eficiência na encapsulação, possibilidade de escalonamento. Além disso, é possível variar os parâmetros de preparo para se produzir formulações de diferentes características.

Na fase inicial do estudo foram preparadas várias formulações de microesferas, variando-se parâmetros tais como velocidade de agitação para evaporação do solvente, concentração da solução do tensoativo e o tipo de polímero. Estas variações visaram estabelecer as condições mais adequadas para produção de microesferas com distribuição média de diâmetro maior que 10 μm , eficiência de encapsulação da proteína superior a 90% e capacidade de sustentar a liberação *in vitro* da proteína por um período superior a 60 dias.

O tamanho da partícula é muito importante no tipo de resposta imune que será gerada. Nosso objetivo é que as partículas formem um depósito no sítio de injeção e mantenha anticorpos e outros componentes de defesa na circulação sanguínea. Pequenas partículas, normalmente menores que 10 μm , são fagocitadas por macrófagos e rapidamente retiradas da circulação sanguínea, enquanto partículas maiores que 10 μm não podem ser fagocitadas (Sinhá; Trehan, 2003). Essas partículas maiores poderão formar um depósito extracelular e estimular resposta imune secundária por meio de Células B. Além disso, Células T possivelmente podem ser estimuladas por meio de fragmentos ou agregados liberados pelas microesferas (Johansen *et al.*; 1999).

O tamanho das microesferas é determinado pela velocidade de agitação, viscosidade da solução polimérica e da fase aquosa interna, e concentração de PVA na fase aquosa externa (Jelery; Davis; O'Hagan; 1991). A velocidade de agitação é um fator dominante porque é ela que provê a energia para dispersar a fase oleosa na aquosa (Yang; Chung; Ng, 2001). Seguindo essa linha de pensamento, prepararam-se microesferas pelo método de emulsão múltipla e evaporação do solvente, em escala de bancada, variando-se os seguintes parâmetros: velocidade de agitação para formação da emulsão múltipla e evaporação do solvente (500 ou 800 rpm), concentração da solução de PVA (1% ou 3%) e tipo do polímero (PLGA 50:50, PLGA 75:25 ou PLA). Essas variações estão descritas na **Tabela 2**.

As microesferas resultantes foram avaliadas quanto à taxa de encapsulação e distribuição de tamanho. A **Figura 8** ilustra a curva de calibração para a Bm86 pelo método Bradford. Os resultados encontram-se nas **Tabelas 3 e 4**. Como demonstrado por (Yang; Chung; Ng, 2001) a velocidade de agitação interfere no tamanho das partículas, sendo que quanto maior a velocidade de agitação menor será o tamanho das partículas resultantes. Assim como a velocidade de agitação, a concentração de PVA na fase aquosa externa também interfere no tamanho da partícula. Foi verificado que uma maior concentração de PVA na fase aquosa externa levou à formação de partículas menores, o que pode ser explicado pelo fato do PVA estabilizar as gotas formadas e evitar coalescência entre as mesmas (Yang; Chung; Ng, 2001).

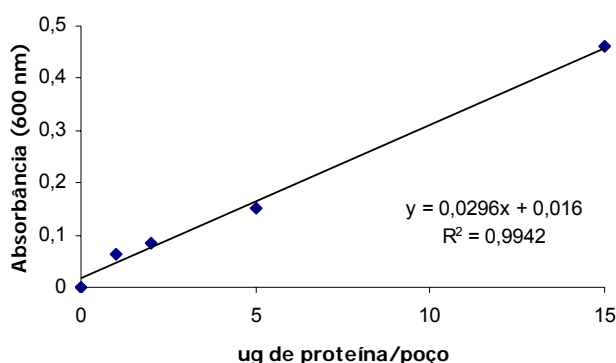


Figura 8: Curva de calibração utilizada na determinação da taxa de encapsulação de Bm86 em microesferas preparadas sob diversas condições. Método Bradford, $\lambda = 595$ nm.

Tabela 3: Valores encontrados na determinação da taxa de encapsulação de Bm86 nas diversas formulações.

Formulações	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Massa de ME (mg)	12,6	22,9	19,0	5,4	26,1	27,7
Absorbância* (600 nm)	0,256	0,395	0,362	0,149	0,396	0,295
	0,242	0,375	0,361	0,164	0,409	0,279
Bm86 extraída (µg)	23,615	37,399	35,017	9,493	39,172	27,466
µg de Bm86/ mg de ME	1,9	1,6	1,8	1,8	1,5	1,0
Encapsulação %	91,4	76,9	86,6	85,9	71,9	48,2

*Absorbância das amostras da extração diluídas 3x, exceto para F4 que foi diluída apenas 2x.

Tabela 4: Distribuição do diâmetro das partículas preparadas nas diversas condições.

Formulações	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Mediana diâmetro (µm)	10,753	15,099	10,064	54,786	57,493	39,821
Mediana volume (µm)	10,700	13,858	9,889	55,095	59,505	43,753

As formulações que melhor se enquadram nos objetivos do projeto são as formulações 1 e 2, que contêm PLGA como matriz polimérica, solução 3% de PVA como estabilizante, velocidade de agitação de 11000 rpm para formação da emulsão primária e de 800 rpm para formação da emulsão múltipla e evaporação do solvente. A formulação 1, preparada com PLGA 50:50, apresentou partículas na faixa de 10,7 µm e 91,4 % de Bm86 encapsulada. A formulação 2, preparada com PLGA 75:25, apresentou partículas na faixa de 15,0 µm e 76,9 % de Bm86 encapsulada.

A formulação 3 também apresentou bons resultados, mas visto que para o preparo da formulação 4 foram utilizadas as mesmas condições e esta apresentou diâmetro de partícula muito elevado, decidiu-se pelas condições das formulações anteriores.

As formulações preparadas com o polímero PLA (formulações 5 e 6) apresentaram diâmetro de partícula muito elevado e a formulação 6 apresentou baixa taxa de encapsulação, descartando o uso deste polímero.

Definidos os parâmetros de processo, decidiu-se por preparar novas microesferas, como se segue:

- Velocidade de agitação para formação da emulsão primária: 11000 rpm durante 1 minuto.
- Velocidade de agitação para formação da emulsão múltipla: 800 rpm até total evaporação do solvente.
- Fase aquosa externa: solução 3% de PVA.
- Fase orgânica: diclorometano.
- Fase aquosa interna: solução de proteína (5 mg/mL).
- Matriz polimérica: seguintes polímeros – PLGA 50:50, PLGA 75:25 e Policaprolactona (PCL).

As formulações assim preparadas foram denominadas: Formulação 1 (PLGA 50:50), Formulação 2 (PCL) e Formulação 3 (PLGA 75:25).

Visando o escalonamento, o preparo das formulações foi realizado utilizando o conjunto de reatores demonstrado na **Figura 7**. Foram utilizados os parâmetros anteriormente definidos e as proporções dos constituintes da formulação também foram mantidas. O volume preparado foi de apenas 1 L, pois houve problema na fase de evaporação de solvente na produção de lotes maiores. O projeto dos reatores está sendo revisto de forma a resolver este problema. As microesferas foram secas por liofilização e não por filtração, já que o volume de preparo era pequeno e a perda no Reator 3 seria muito grande.

As microesferas resultantes foram analisadas quanto ao tamanho de partícula e taxa de encapsulação. A **Figura 9** apresenta as curvas de distribuição de tamanho das partículas encontradas para as formulações 1, 2 e 3.

A quantificação da proteína rBm86 encapsulada nas formulações foi realizada por espectrofotometria em $\lambda = 600$ nm pelo Método de Bradford, utilizando o corante *Coomassie Blue*.

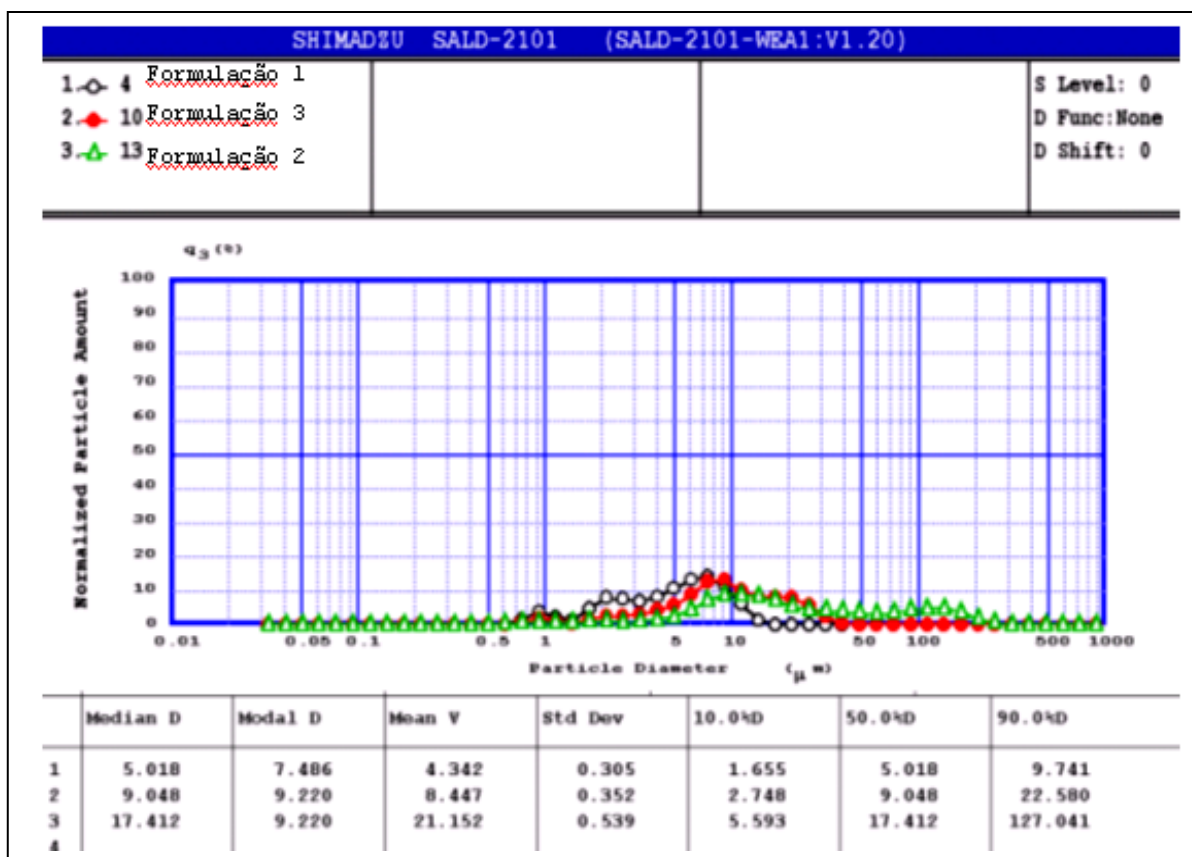


Figura 9: Perfil de distribuição de diâmetro das microesferas que constituem as 3 formulações avaliadas: Formulação 1 – PLGA 50:50, Formulação 2 – PCL e Formulação 3 – PLGA 75:25.

As três formulações foram submetidas ao ensaio de liberação *in vitro* (**Figura 10**). A formulação 1 apresentou um perfil de liberação rápida para os fins propostos, liberando cerca de 90 % de toda a proteína encapsulada em um período de 60 dias. Por outro lado, as formulações 2 e 3 apresentaram um perfil mais sustentado de liberação com cerca de 30 e 50% de antígeno liberado ao final de 90 dias, respectivamente. A **Figura 11** mostra a curva de calibração da Bm86 empregada nos estudos de liberação *in vitro*.

Após a rehidratação das partículas secas, o antígeno presente na superfície da partícula ou próximo dela é liberado para o meio ao seu redor. Esta liberação inicial é seguida por uma difusão do antígeno através de poros ou canais presentes na microesfera. À medida que a água vai entrando em contato com esses canais, o polímero formador da matriz sofre hidrólise e os poros são aumentados, acelerando

a liberação do antígeno (Cleland, 1999). Esta teoria de hidrólise da matriz está relacionada não só ao tamanho da partícula, mas também com a natureza hidrofóbica/hidrofílica do polímero. Utilizando polímeros mais hidrofóbicos, como a PCL, a água terá mais dificuldade em penetrar nos seus poros e conseqüentemente a hidrólise da matriz será mais demorada e a liberação do antígeno também. Isso explica a diferença nos perfis de liberação das 3 formulações.

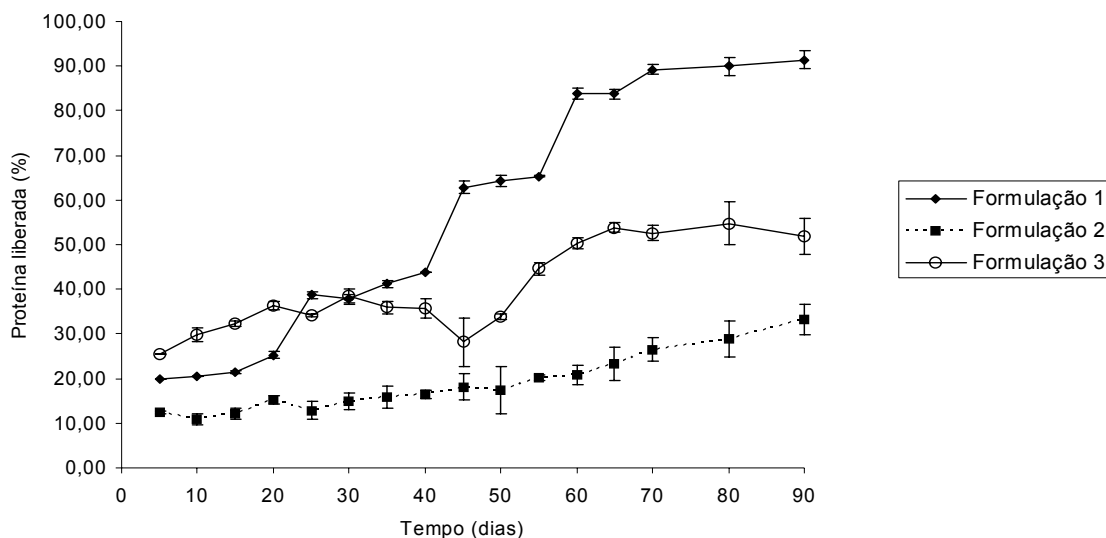


Figura 10: Perfil de liberação *in vitro* da proteína rBm86 a partir de microesferas obtidas a partir de diferentes polímeros.

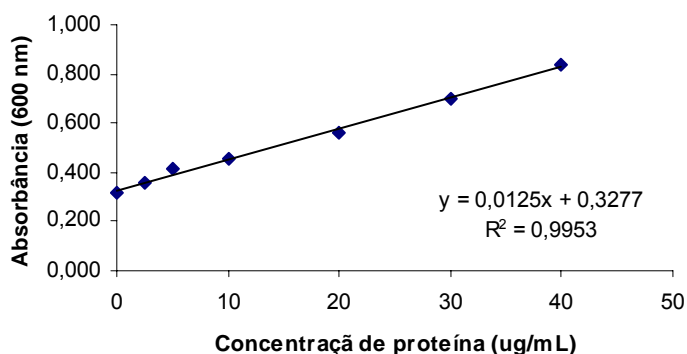


Figura 11: Curva de Calibração utilizada no estudo de liberação *in vitro* de Bm86 a partir de microesferas.

A formulação 2, que apresentou maior diâmetro e foi preparada com o polímero mais hidrofóbico (PCL) liberou a menor porcentagem de antígeno ao final do estudo. As formulações 1 e 3, de hidrofílicidades parecidas, apresentaram diferença na porcentagem de liberação devido à diferença no diâmetro das partículas. A **Tabela 5** mostra que houve uma relação direta entre o diâmetro das partículas e a porcentagem liberada de antígeno ao final de 60 dias.

Tabela 5: Relação entre diâmetro médio das partículas e porcentagem de rBm86 liberada ao final de 60 dias de estudo de liberação *in vitro*.

Formulação	Diâmetro* (μm)	% de rBm86 liberada em 60 dias
1	10	91,43
2	130	33,10
3	25	51,78

* 90% das partículas apresentam diâmetro inferior ao indicado

Uma importante característica do sistema de liberação é a capacidade em liberar o material encapsulado numa forma bioativa, ou seja, numa forma completamente imunogênica. Para determinar qual preparação apresentaria melhor indução de resposta imune, as formulações 2 e 3 foram administradas em camundongos BALB/c e a produção de imunoglobulinas anti-Bm86 foi avaliada no soro destes animais.

Como demonstrado pela **Figura 12**, a formulação 3 estimula a produção de níveis mais elevados de anticorpos o qual é sustentado por todo período avaliado em comparação com a formulação 2. Considerando os dados obtidos no estudo de liberação *in vitro*, estes dados sugerem que uma quantidade maior de antígeno na estimulação inicial do sistema imune do indivíduo vacinado pode ser importante para se gerar uma resposta mais efetiva.

Com base nestes dados optou-se por utilizar a formulação 3 nos próximos ensaios. Além disto, as condições de obtenção da formulação 3 foram estabelecidas como padrão e a formulação foi submetida a um estudo de estabilidade acelerada.

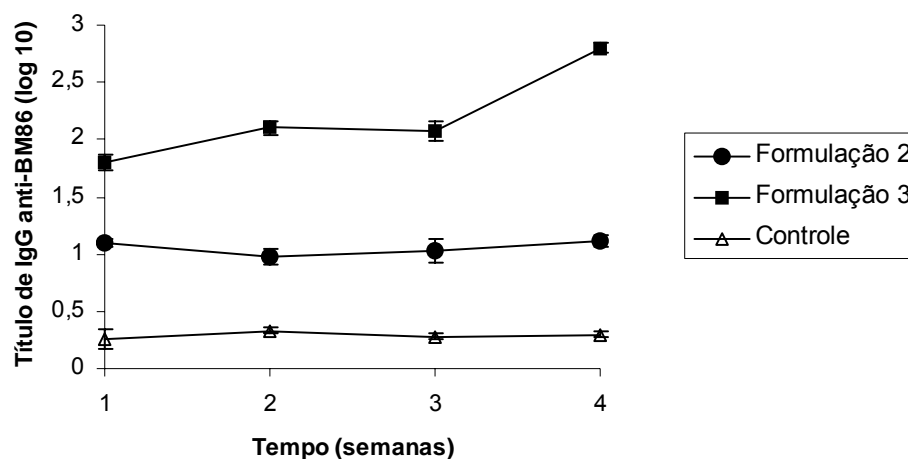


Figura 12: Avaliação dos níveis séricos de IgG anti-Bm86 em camundongos BALB/c vacinados com dose única de microesferas contendo BM86, Formulações 2 e 3. Como controle utilizou-se um soro não imune.

Durante o preparo das microesferas, os antígenos são expostos a condições extremas, tais como o processo de evaporação do solvente, altas velocidades de homogeneização e exposição direta a solventes orgânicos (Igartua, *et al.*; 1998) que levam à necessidade de se confirmar a integridade do peptídeo. A integridade da proteína rBm86 encapsulada na formulação 3 foi avaliada por SDS-PAGE e *Western Blotting*. A **Figura 13** apresenta o perfil de separação eletroforética da proteína antes de ser encapsulada e após o processo de encapsulação. O resultado do SDS-PAGE indica que o processo de produção das microesferas não causa nenhum tipo de degradação estrutural na proteína. As bandas apresentadas pela proteína antes e após a encapsulação são correspondentes no gel.

Para o ensaio de *Western Blotting* utilizou-se soro de camundongos imunizados com GAVAC[®] como anticorpo primário. Os resultados demonstraram que a proteína extraída das microesferas é reconhecida pelo soro imune sugerindo que o processo de preparo da microesfera não interfere na atividade antigênica da proteína.

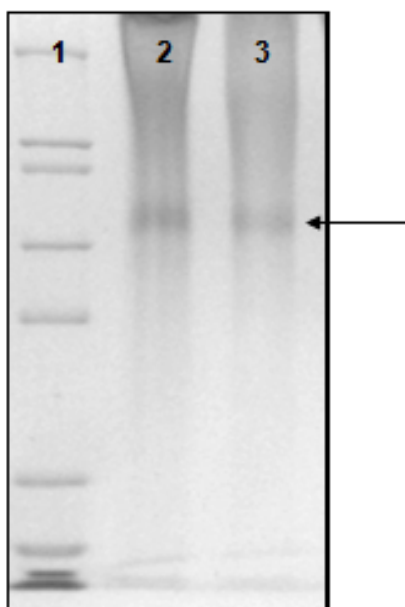


Figura 13: SDS-PAGE da proteína rBm86 encapsulada em microesferas (formulação 3).Canaletas: 1) Padrão de peso molecular; 2) rBm86 antes do encapsulação; 3) rBm86 extraída das microesferas (seta).

Uma formulação para uso como vacina parenteral deve ser estéril e livre de pirogênios. Como a esterilização a quente das microesferas não é possível devido à baixa temperatura de transição vítrea dos polímeros e aos efeitos deletérios à proteínas encapsuladas, a esterilidade deve ser conseguida pela utilização de processos assépticos (Johansen *et al*, 2000). A avaliação realizada quanto à esterilidade da formulação indicou ausência de contaminação microbiológica por fungos e bactérias. No teste de endotoxinas bacterianas o resultado encontrado foi de 0,17 UE/mg de microesferas. O limite de contaminação por endotoxina estabelecido para uso humano é $\leq 5\text{UE/Kg}$ de peso corpóreo. Traçando um paralelo, tem-se que 200 mg de microesferas (dose por animal) apresentam uma contaminação de 34 UE. Levando-se em consideração o peso corpóreo de um bovino e a via de administração (subcutânea ou intramuscular) podemos concluir que a utilização desta formulação é extremamente segura em relação aos efeitos adversos ocasionados por pirogênios.

Para completar a caracterização da formulação realizou-se um estudo em bovinos. Esse estudo foi feito comparando-se a resposta imune encontrada para a

microesfera com aquela encontrada para as duas vacinas do mercado, GAVAC e TickGard.

Os animais foram divididos em 4 grupos de 3 animais, que foram identificados como Grupo 1: grupo controle; Grupo 2: GAVAC; Grupo 3: TickGard; Grupo 4: microesferas. O grupo controle recebeu apenas solução de PBS, os grupos 2 e 3 receberam 3 doses das vacinas GAVAC e TickGard, administradas nas semanas 0, 4 e 7 e o grupo 4 recebeu 1 dose da microesfera ressuspensa em PBS na semana 0. Os animais foram sangrados a cada 2 semanas para avaliação dos títulos de anticorpos. Os resultados dos testes ELISA demonstram que as microesferas são capazes, após única administração, de estimular resposta humoral e sustentá-la (**Figura 14**). Isto demonstra que o mesmo padrão observado em modelo murino foi induzido em bovinos, provando que o princípio proposto também é válido para estes animais. A indução de níveis de anticorpos encontrada com a administração de uma única dose de microesferas é similar à indução pela administração de 3 doses das vacinas Gavac e TickGard. Além disto, segundo avaliação clínica, os animais não apresentaram nenhuma reação no sítio de administração das partículas e o ganho de peso dos animais foi significativo em todos os grupos avaliados.

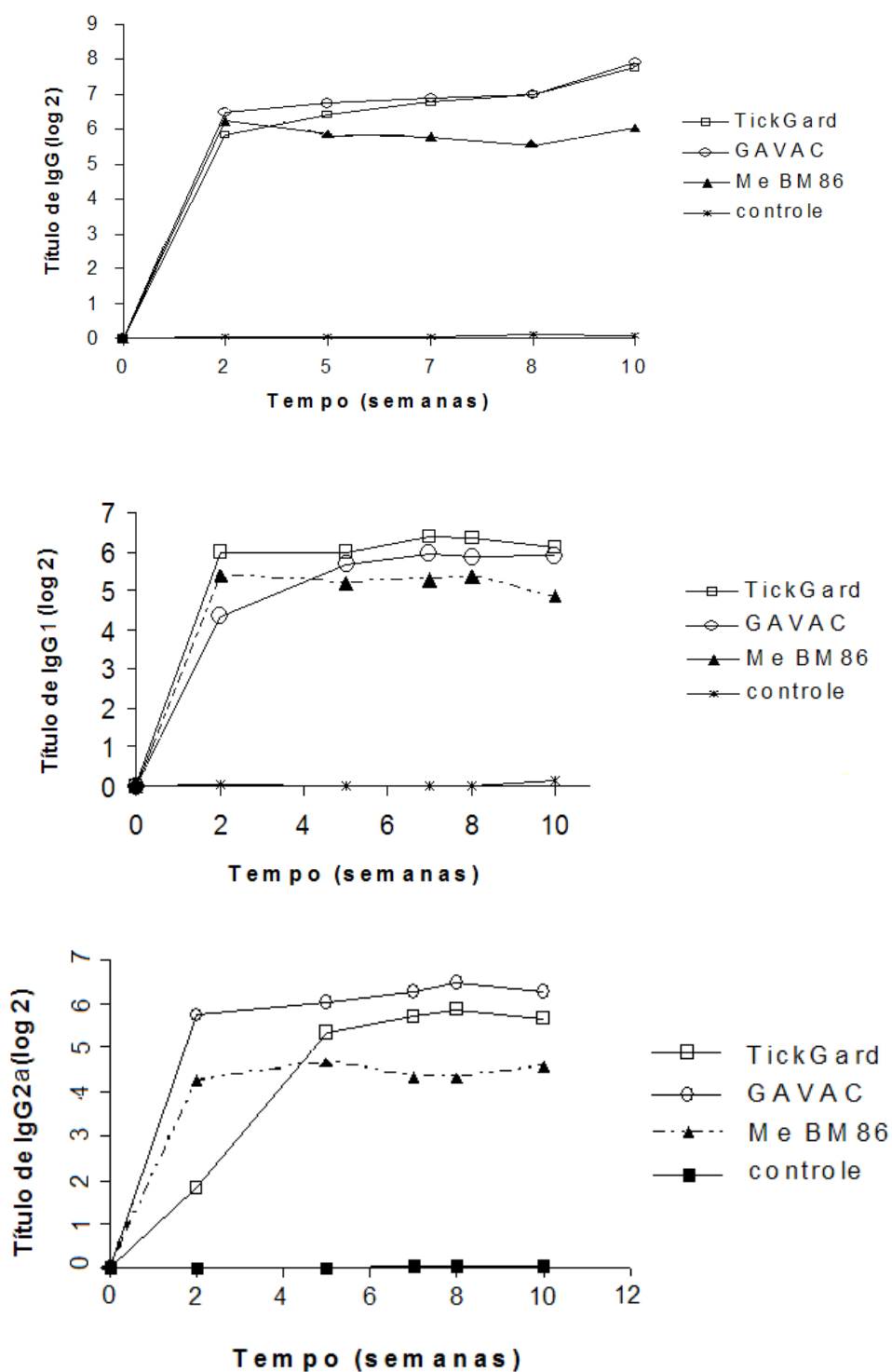


Figura 14: Avaliação de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-Bm86 no soro de bovinos vacinados com 3 doses das vacinas comerciais (GAVAC e TickGard) ou dose única (200mg) da formulação de microesfera.

O sucesso de uma formulação vacinal não depende apenas do bom resultado em testes de desempenho, mas também da habilidade da proteína em se manter ativa durante o preparo do produto final e da sua liberação, tão bem quanto durante a estocagem em longo prazo.

Para se determinar as condições em que a formulação deve ser armazenada realizou-se um estudo de estabilidade. O estudo foi planejado de acordo com o preconizado pelo VICH – na estabilidade em tempo real o produto deve ser caracterizado mensalmente até o terceiro mês e, em seguida, a cada 3 meses; no estudo de estabilidade acelerada o produto deve ser caracterizado mensalmente até completar 3 meses. A formulação foi caracterizada quanto ao teor de proteína encapsulada e distribuição de diâmetro das partículas. A proteína foi caracterizada quanto à sua estrutura e capacidade de ser reconhecida como antígeno.

As formulações foram armazenadas a 4° C (em geladeira) ou a 30° C e 65 % de umidades relativas (câmara climática) e caracterizadas a cada 30 dias. Como mostra a **Tabela 6**, a concentração de proteína encapsulada nas diferentes formulações não se altera significativamente em função do tempo a 4° C ou 30° C, no período avaliado.

Tabela 6: Determinação da concentração da proteína rBm86 em microesferas armazenadas sob diferentes condições de temperatura e umidade.

Tempo de armazenamento	Concentração µg/mg de rBm86 em microesferas armazenadas a diferentes temperaturas	
	4°C	30°C
Tempo zero	1,98 (100,0%*)	1,98 (100,0%*)
30 dias	1,96 (98,9%*)	2,01 (101,6%*)
60 dias	1,93 (97,4%*)	1,94 (98,1%*)

*Taxa de encapsulação da rBm86

A integridade da proteína foi avaliada por eletroforese em gel de acrilamida e demonstrou-se que as diferentes condições de armazenamento não alteram as características estruturais da proteína no período de 30 e 60 dias (**Figura 15**).

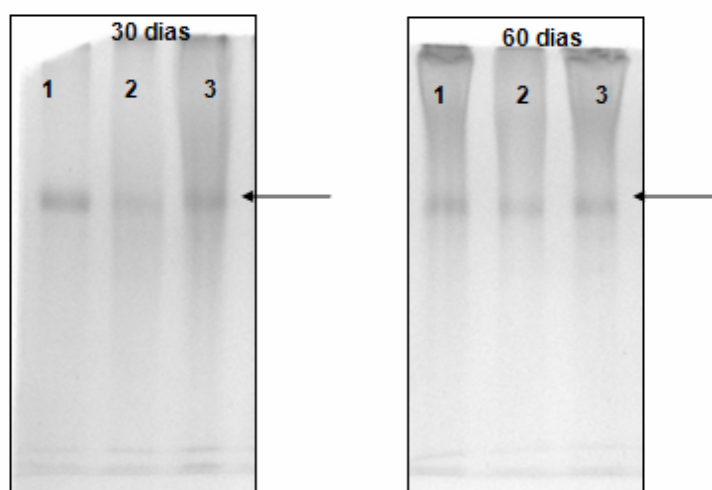


Figura 15: SDS-PAGE mostrando rBm86 (seta) extraída de microesferas armazenadas sob diferentes condições por um período de 30 e 60 dias. 1) rBm86 não encapsulada utilizada como padrão; 2) rBm86 encapsulada em microesferas armazenadas a 4° C; 3) rBm86 encapsulada em microesferas armazenadas a 30°C e 65% de umidade relativa.

A estabilidade das partículas foi avaliada pelo perfil de distribuição de tamanho e pela ausência de agregados após a sua ressuspensão. Até 60 dias de teste as partículas mantiveram-se estáveis e de fácil ressuspensão em tampão PBS. A **Figura 16** demonstra que não há alteração na distribuição de diâmetro neste período. Com 90 dias de teste as partículas armazenadas a 30°C mostraram-se instáveis, sendo que grande parte das partículas apresentava-se fundida nas paredes dos frascos. Com este resultado verificou-se que a vacina deve ser armazenada à temperatura de 4°C.

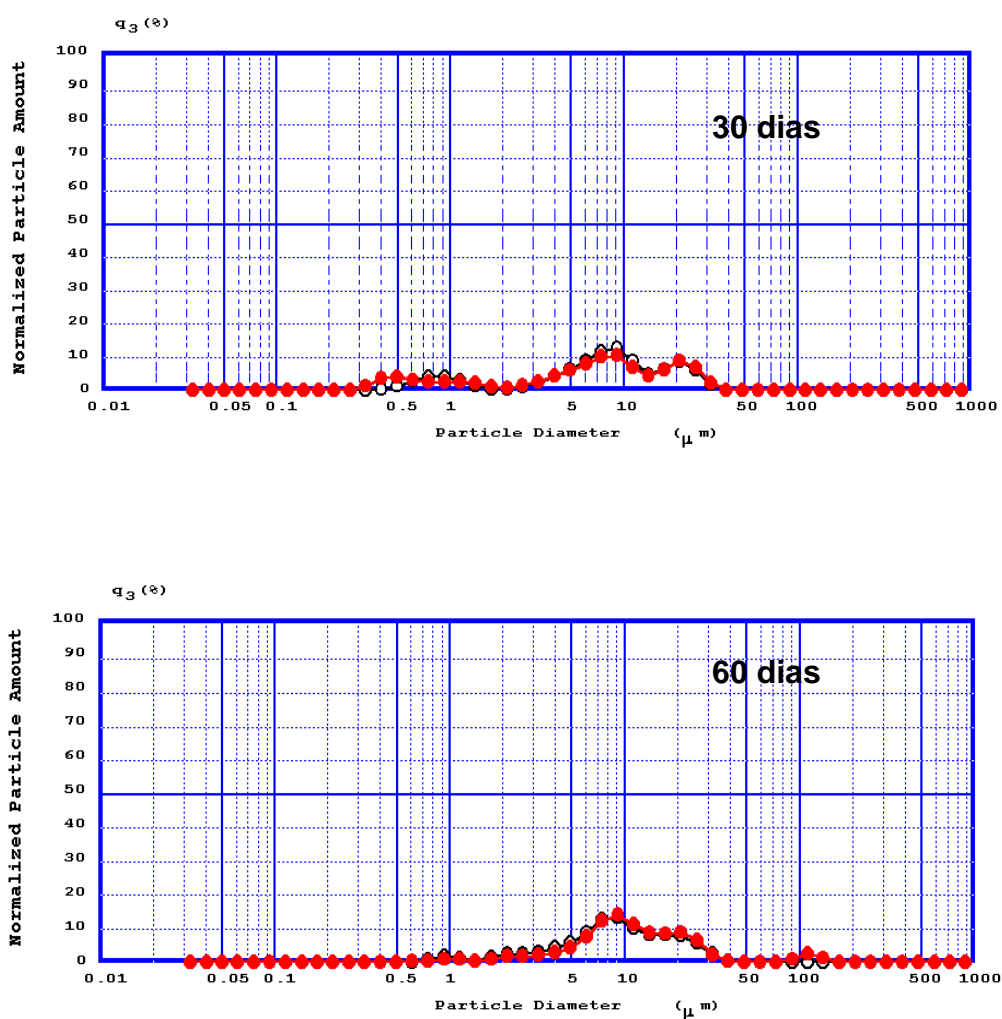


Figura 16: Perfil de distribuição de diâmetro das microesferas contendo rBM86 (Formulação 3) armazenadas a 4°C (○) ou a 30°C (●) por 30 e 60 dias.

A microesfera preparada utilizando os parâmetros definidos como mais adequados foi capaz de proporcionar uma liberação sustentada do antígeno encapsulado e induzir resposta imune sustentada em modelo bovino. Os resultados demonstram que as microesferas estudadas são sistemas de liberação adequados para a vacina gênica contra o carrapato bovino, garantindo, assim, a saúde animal e redução de custos com manejo do gado.

5 CONCLUSÕES

- O método baseado em emulsão múltipla e evaporação de solvente foi adequado para o estudo, permitindo variar parâmetros de processo para o desenvolvimento da formulação mais adequada.
- Os aumentos na velocidade de agitação e na concentração de PVA na fase aquosa externa permitiram uma diminuição no tamanho da partícula, atingindo diâmetros entre 10 e 25 μm .
- A formulação mais adequada aos objetivos da vacina de dose única apresentou taxa de encapsulação de 98,6%, diâmetro de 25 μm , liberação *in vitro* de 50% em 60 dias e boa resposta antigênica.
- A proteína encapsulada, rBm86, se manteve íntegra durante o processo de preparo das microesferas.
- Uma dose de microesferas contendo rBm86 encapsulada estimulou níveis de anticorpos similares aos de três doses das vacinas comerciais.
- Os resultados demonstram que as microesferas estudadas são sistemas de liberação adequados para a vacina gênica contra o carrapato bovino, garantindo, assim, a saúde animal e redução de custos com manejo do gado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREOTTI, R. **Caracterização de inibidores de serinoproteases (BmTIS) presentes em larvas de carrapatos *Boophilus microplus* e o seu efeito no controle da infestação parasitária em bovinos.** Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências, São Paulo, 2002.
2. ANDREOTTI, R. A synthetic bmti n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. **Experimental Parasitology** 116, p. 66–70, 2007.
3. ALLRED, D.R. Babesiosis: persistence in the face of adversity. **TRENDS in Parasitology**, 19, nº2, p.51-55, February 2003.
4. BARKER, S.C.; MURRELL, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. **Experimental and Applied Acarology**, 28, p.55–68, 2002.
5. BILATI, U.; ALLÉMAN, E.; DOELKER, E. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 59, p.375–388, 2005.
6. BOCK, R.; JACKSON L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, 129, p.S247–S269, 2004.
7. BOUÉ, O.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; RORODRIGUES, M.; DE LA FUENTE, J. Reproductive and safety assessment of vaccination with Gavac™ against the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Theriogenology**, 51, p.1547-1554, 1999.
8. BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72, p.248-254, 1976.

9. BROSSARD, M.; WIKEL, S.K. Tick immunobiology. **Parasitology**, 129, p.S161–S176, 2004.
10. CANALES, M.; ENRIQUEZ, A.; RAMOS, E.; CABRERA, D.; DANDIE, H.; SOTO, A.; FALCON, V.; RODRIGUEZ, M.; DE LA FUENTE, J. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. **Vaccine**, 15, n°4, p. 414-422, 1997.
11. CLELAND, J.L.; Single-administration vaccines: controlled release technology to mimic repeated immunizations. **TIBTECH**, 17, p.25-29, January 1999.
12. DHANARAJU, M.D.; VEMA, K.; JAYAKUMAR, R.; VAMSADHARA, C. Preparation and characterization of injectable microspheres of contraceptive hormones. **International Journal of Pharmaceutics**, 268, p.23–29, 2003.
13. DALTON, J.P.; MULCAHY, G. Parasite vaccines: a reality? **Veterinary Parasitology**, 98, p.149–167, 2001.
14. DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. **Parasite Immunology**, 28, p.275-283, 2006.
15. DE VOS, S.; ZEINSTRA, L.; TAOUIK, O.; WILLADSEN, P., JONGEJAN, F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. **Experimental and Applied Acarology**, 25, p. 245–261, 2001.
16. FU, K.; PACK, D.W.; KLIBANOV, A.M.; LANGER, R. Visual Evidence of Acidic Environment Within Degrading Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Microspheres. **Pharmaceutical Research**, 17, n°1, 2000.
17. GEORGE, J.E.; POUND, J.M.; DAVEY, R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**, 129, p.S353–S366, 2004.
18. GILLESPIE, R.D.; MBOW, M.L. e TITUS, R.G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite Immunology**, 22, p. 319-331, 2000.

19. GRAF, J.F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING, N.; SABATINI, G.A.; MOLENTO, M.B.; BORDIN, E. L.; ARANTES, G.J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, 129, p.S427–S442, 2004.
20. HANES, J.; CLELAND, J.L.; LANGER, R. New advances in microsphere-based single-dose vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 28, p.97–119, 1997.
21. HORAK, I.G.; CAMICAS, J.L.; KEIRANS, J.E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari:Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology**, 28, p.27–54, 2002.
22. IGARTUA, M.; HERNANDEZ, R.M.; ESQUISABEL, A.; GASCO'N, A.R.; CALCO, M.B.; PEDRAZ, J.L. Enhanced immune response after subcutaneous and oral immunization with biodegradable PLGA microspheres. **J. Control Release**, 56, p27-54, 1998.
23. JELERY, H.; DAVIS, S.S.; O'HAGAN, D.T. The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles oil-in-water emulsion solvent evaporation. **Int. J. Pharm.** , 77, 169-175, 1991.
24. JIANG, W.; GUPTA, R.K.; DESHPANDE, M.C.; SCHWENDEMAN, S.P. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 57, p.391– 410, 2005.
25. JOHANSEN, P.; MOON, L.; TAMBER, H.; MERKLE, H.P.; GANDER, B.; SESARDIC, D. Immunogenicity of single-dose diphtheria vaccines based on PLA/PLGA microspheres in guinea pigs. **Vaccine**, 18, 209-215, 1999.
26. JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, 129, p.S3–S14, 2004.
27. JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses **Veterinary Parasitology**, 137, p.1–10, 2006.
28. KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; GARCIA-GARCIA, J. C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales:Anaplasmataceae): recent advances in

- defining host–pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, 129, p.S285–S300, 2004.
29. NUTTALL, P.A.; TRIMNELL, A.R.; KAZIMIROVA, M.; LABUDA, M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**, 28, p.155–163, 2006.
 30. PATARROYO, J.H.; PORTELA, R.W.; DE CASTRO, R.O.; PIMENTEL, J.C., GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E.; VARGAS, M.I.; PRATES, A.A.; MENDES, M.A.D. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 88, p.163–172, 2002.
 31. PITT, C.G.; GRATZL, M.M.; KIMMEL, G.L.; SURLES, J.; SCHINDLER, K. Aliphatic polyesters II: The degradation of poly (DL-lactide), poly (ε-caprolactone), and their copolymers *in vivo*. **Biomaterials**, 2, p.215-220, October 1981.
 32. PRUETT, J.H. Immunological control of arthropod ectoparasites: a review. **International Journal for Parasitology**, 29, p.25-32, 1999.
 33. RATHBONE, M.J.; GURNY, R. Controlled Release veterinary drug delivery: Biological and pharmaceutical considerations. Elsevier Science, 2000. Sales-Junior,
 34. SALES-JUNIOR, P.A.; GUZMAN, F.; VARGAS, M.I.; SOSSAI, S.; PATARROYO V., A.M.; GONZÁLEZ, C.Z.L.; PATARROYO, J.H. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm7462. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 107, p.281–290, 2005.
 35. SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, 26, nº5, p.726-737, 2003.
 36. SCOPES, R.K. Protein Purification – Principles and Practice. Third Edition, 1994.

37. SERRANO, M.C.; PAGANI, R.; VALLET-REGÍ, M.; PENÑA, J.; RÁMILA, A.; IZQUIERDO, I.; PORTOLÉS, M.T. In vitro biocompatibility assessment of poly(e-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**, 25, p.5603–5611, 2004.
38. SINGH, M.; O'HAGAN, D.T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **International Journal for Parasitology**, 33, p.469–478, 2003.
39. SINHA, V.R.; TREHAN, A. Biodegradable microsphere for protein delivery. **Journal of Controlled Release**, 90, p.261-280, 2003
40. SOSSAI, S.; PECONICK, A.P.; SALES-JUNIOR, P.A., MARCELINO, F.C.; VARGAS, M.I.; NEVES, E.S.; PATARROYO, J.H. Polymorphism of the BM86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, 37, p.199–214, 2005.
41. TAMBER, H.; JOHANSEN, P.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery **Advanced Drug Delivery Reviews**, 57, p.357– 376, 2005.
42. TRIMNELL, A.R.; HAILS, R.S., NUTTALL, P.A. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. **Vaccine**, 20, p. 3560–3568, 2002.
43. VALLE, M.R.; MENDEZ, L.; VALDEZ, M.; REDONDO, M.; ESPINOSA, C.M.; VARGAS, M.; CRUZ, R.L.; BARRIOS, H.P.; SEOANE, G.; RAMIREZ, E.S.; BOUE, O.; VIGIL, J.L.; MACHADO, H.; NORDELO, C.B.; PIÑEIRO, M.J. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac[™]. **Experimental and Applied Acarology**, 34, p.375–382, 2004.
44. VERCRUYSSSE, J.; KNOX, D.P.; SCHETTERS, T.P.M.; WILLADSEN, P. Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. **TRENDS in Parasitology**, 20, nº10, p.288-492, October 2004.
45. VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M. Diagnóstico em anaplasmosse bovina. **Ciência Rural**, 31, nº2, p.361-368, Santa Maria, 2001.

46. 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**, 56, p.286–295, 1999.
47. WILLADSEN, P.; RIDING, G.A.; McKENNA, R.V.; KEMP, D.H.; TELLAM, R.L.; NIELSEN, J.N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G.S.; GOUGH, J.M. Immunologic Control of a parasitic arthropod: Identification of a Protective Antigen from *Boophilus microplus*. **The Journal of Immunology**, 143, n°4, p.1346-1351, August 15 1989.
48. WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. Immunology of the Tick–Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. **Parasitology Today**, vol. 15, n°7, p.258-262, 1999.
49. WILLADSEN, P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasitas. **Veterinary Parasitology**, 101, p.353–367, 2001.
50. WILLADSEN, P. Vaccination against ectoparasitas. **Parasitology**, 133, p.S9–S25, 2006.
51. WILLADSEN, P.; EISEMANN, C.H.; TELLAM, R.L. 'Concealed' Antigens: Expanding the Range of Immunological Targets. **Parasitology Today**, vol. 9, n° 4, p. 132-135, 1993.
52. WILLADSEN, P. Tick control: Thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, 138, p.161–168, 2006.
53. WINZENBURG, G., SCHMIDT, C., FUCHS, S., KISSEL, T. Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery. **Advanced Drug Delivery**, vol 56, n°10, p.1453-1466.
54. YANG, Y.; CHUNG, T; NG, N. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. **Biomaterials**, 22, p.231-241, 2001.