

# IMUNIZAÇÃO COM O PEPTÍDEO SINTÉTICO ANTI CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SBM7462® POR VIAS DE MUCOSA

GABRIEL D. CARVALHO<sup>1</sup>; ANA P. PECONICK<sup>2</sup>; CARLA L. MEDEIROS<sup>2</sup>; MARLENE I. VARGAS-V.<sup>3</sup>; JOAQUÍN H. PATARROYO<sup>4</sup>

**ABSTRACT:-** CARVALHO, G.D.; PECONICK, A.P.; MEDEIROS, C.L.; VARGAS-V., M.I.; PATARROYO, J.H. [Immunization with synthetic peptide anti-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SBM7462 via mucosal routes]. Imunização com o peptídeo sintético anti carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SBM7462 por vias de mucosa. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p. 9-13, 2008. Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Federal de Viçosa. Av. PH Rolfs s/n, Campus Universitário, Viçosa, MG 36570-000, Brasil. E-mail: jpatarro@ufv.br

The mucosal immunization consists on antigen administration in these surfaces it is a not invasive method, inductor of local and systemic immune response. This work evaluated the immune response of the synthetic vaccine anti-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SBM7462®, via oral and nasal routes. Were used 60 BALB/c mice, divided in three groups of 20 animals each (I: oral immunization; II: nasal immunization; III: animals not immunized). Nine and 15 days after the first and the second immunization was collected, separately for each group, T cells from the immunized animals, cultivating them per 10 days. After the incubation, were determined the percentage of cellular viability and the specific nature of this T cells, which had held as memory T cell. The averages of T cell SBM7462-reagents had been submitted to the analysis of variance and comparison for Tukey test, 5% of probability. Group II presented higher cellular proliferation “*in vitro*”. For ELISA test, were positive only two animals in group I and eight in group II. The oral and nasal routes alternatively viable for immunization with the synthetic peptide SBM7462®, however require greater number of doses to induce responses with high levels of immunoglobulins.

**KEY WORDS:** Immunization, tick, mucosal vaccine, oral immunization, nasal immunization.

## RESUMO

A vacinação via mucosa consiste na administração de antígenos nestas superfícies. É um método não invasivo indutor de resposta imune sistêmica e local. Neste trabalho avaliou-se a resposta imune à vacina sintética anticarrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SBM7462®, administrada pelas vias oral e nasal. Utilizaram-se 60 camundongos BALB/c, divididos em três grupos de 20 animais cada (I: imunização via oral; II: imunização via nasal; III: animais não imunizados). Aos 9 e 15 dias após a primeira e segunda imunização, coletaram-se, separada-

mente para cada grupo, os linfócitos T dos animais imunizados, cultivando-os em estufa por 10 dias. Após a incubação, determinou-se a porcentagem de viabilidade celular e a natureza específica dos linfócitos T, os quais se comportaram como linfócitos T de memória. As médias do número de linfócitos T SBM7462-reativos foram submetidas à análise de variância e comparação pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade. O Grupo II apresentou uma maior proliferação celular *in vitro*. Para o ELISA-indireto, foram positivos somente dois animais do Grupo I e oito do grupo II. As vias oral e nasal são vias alternativamente viáveis para imunização com o peptídeo sintético SBM7462®, porém requerem maior número de doses para induzir resposta com altos níveis de imunoglobulinas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Imunização, carrapato, vacina via mucosas, vacinação oral, vacinação nasal.

## INTRODUÇÃO

O processo de vacinação é o método que apresenta a melhor relação custo-benefício para prevenir perdas econômi-

\* Sob os auspícios da FAPEMIG e CNPq.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa (UFV) e Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIVICOSA, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFV, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Veterinária (DVT), UFV, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, DVT, UFV, Av. PH Rolfs s/n, Campus Universitário, Viçosa, MG 36570-000, Brasil. E-mail: jpatarro@ufv.br

<sup>5</sup> Patente Nacional PI0001717-5; Patente Internacional PCT/BR01/00057.

cas e aumentar a qualidade de vida dos animais domésticos (AUCOUTURIER et al., 2001). No âmbito da Medicina Veterinária, muitos imunógenos ainda são produzidos utilizando-se tecnologia convencional, tais como vacinas atenuadas. Porém, com o desenvolvimento de pesquisas que aplicam ferramentas de biotecnologia, aquelas estão sendo usadas no desenvolvimento de vacinas. As vacinas “modernas” não são utilizadas apenas para o controle de doenças infecciosas, mas também para aumentar a produtividade do rebanho e o controle de ectoparasitos (BABIUK, 2002).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* representa o principal ectoparasito de bovinos nas regiões tropicais e subtropicais; e o seu controle repousa principalmente na utilização de fármacos carrapaticidas, os quais propiciam a seleção de populações resistentes (SANGSTER, 2001; TAYLOR, 2001). A dependência exclusiva de compostos químicos para o controle desse parasita tem-se tornado uma das principais preocupações técnico-científicas e econômicas da atualidade. Daí a necessidade de se desenvolver vacinas capazes de induzir a imunidade do hospedeiro contra o parasita.

O Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV/BIOAGRO/DVT/UFV) vem desenvolvendo pesquisas visando ao constante aprimoramento da vacina sintética anti carrapato *R. (B.) microplus* (SBm7462®), de comprovada eficiência, a qual já foi patenteada no Brasil, EUA, México, Austrália e União Européia. Os imunógenos sintéticos são desenhados para estimular uma resposta imune apropriada, incluindo epítomos de células B e T relevantes e excluindo aquelas regiões da proteína que poderiam atuar estimulando a atividade de mecanismos supressores, alérgicos e/ou auto-imunes. Patarroyo et al. (2002) demonstraram a eficácia de vacinas sintéticas na indução de uma forte atividade estimuladora das células linfóides por meio dos peptídeos sintéticos.

A vacinação via mucosa consiste na administração de antígenos nestas superfícies. É um método não invasivo que induz tanto uma resposta imune sistêmica como local (AIZPURUA; RUSSELL-JONES, 1988; BERGQUIST et al., 1997; KOGA et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune à vacina sintética anti carrapato *R. (B.) microplus* SBm7462®, administrada pelas vias de mucosa oral e nasal, uma vez que essas rotas podem ser uma alternativa viável para administração de vacinas sintéticas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado como antígeno o peptídeo sintético SBm7462®, o qual foi desenhado no LBCHV/BIOAGRO/DVT/UFV e sintetizado com o auxílio da Fundação Instituto de Imunologia da Colômbia (FIDIC), em Bogotá, Colômbia.

Foram utilizados 60 camundongos da raça BALB/c, adultos, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e mantidos durante o período experimental de 12 semanas no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV, em salas com temperatura e umidade controladas, submetidos a um regime

diário de luz artificial de 12 horas, recebendo ração comercial com composição nutricional adequada para roedores e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais com 20 animais cada: Grupo I: animais imunizados por via oral com 100mg do peptídeo SBm7462® diluído em 50mL de água milliQ q.s.p.; Grupo II: animais imunizados por via nasal com 100mg do peptídeo SBm7462® diluído em 50mL de água milliQ q.s.p.; Grupo III: animais não imunizados. Aos 9, 15, 30 e 45 dias após a primeira imunização, foram eutanasiados cinco animais de cada grupo. Coletaram-se, separadamente para cada grupo, os linfócitos dos animais imunizados. Os animais também tiveram seu sangue coletado em tubos de vidro sem anticoagulante, sendo centrifugadas, e os soros aliquotados, identificados e conservados em freezer a -20°C.

Foi utilizado o teste imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para a pesquisa de anticorpos no soro dos animais imunizados dos Grupos I e II. A leitura das amostras foi feita em leitor de ELISA a 492nm e para discriminar o ponto de corte entre positivo e negativo, utilizou-se a média dos valores dos controles negativos, acrescida de dois desvios padrão. Os valores foram expressos em médias de absorbância para cada grupo, individualmente.

Os animais foram eutanasiados de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, sendo o projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV (DVT/UFV), no processo nº 28/2006, e registrado sob o número 21.101.155.103/PPG/UFV.

Após a eutanásia, os animais foram mergulhados em álcool 70%. Sob condições de esterilidade em capela de fluxo laminar, retirou-se o baço dos animais de cada grupo, separadamente, os quais foram colocados em meio de cultura RPMI-1640 incompleto e submetidos ao protocolo de isolamento de células esplênicas. As suspensões de células esplênicas foram fracionadas em coluna de lã de náilon, para se obter um efuente da população de linfócitos T.

Os linfócitos T isolados foram cultivados por 10 dias, em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, em placas de cultivo celular, separadamente para os Grupos I e II, acrescidos de 1mg de SBm7462® e células esplênicas apresentadoras de antígenos, isoladas dos animais do Grupo III. Após o período de incubação, determinou-se a viabilidade celular dos linfócitos pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán SIGMA<sup>®</sup>, por meio de contagem em câmara de Neubauer e com auxílio microscópio de luz, com objetiva de 40X. Contou-se o número de células viáveis nos cinco quadrantes da câmara, ajustando-se o fator de diluição, para se obter o número total de células viáveis. Para determinação da porcentagem de viabilidade celular, usou-se a seguinte fórmula: Viabilidade Celular (%) = (total de células viáveis ÷ (total de células viáveis e não viáveis) x 100).

Com base nos valores do número de linfócitos SBm7462-reativos, obtidos após 10 dias de cultivo, para cada data de

coleta foram ajustadas regressões para cada grupo, utilizando-se o método quasi-Newton do programa STATISTICA versão 6.0 (STATSOFT, 1996). Os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão, no coeficiente de determinação e no comportamento do fenômeno em estudo. As médias obtidas pelo método de exclusão do Azul de Tripán foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e posterior comparação pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sistemas para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, 1993).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ELISA indireto usado neste trabalho já havia apresentado bons resultados em trabalhos anteriores com o peptídeo SBm7462®, em consequência à sua boa sensibilidade e especificidade (PIMENTEL, 2002; PATARROYO et al., 2002; SALES-JUNIOR, 2005). Tais autores observaram que ocorreu um aumento nos valores de absorbância após a segunda imunização com o peptídeo. Os resultados para o teste de ELISA estão representados na Tabela 1, e mostram que o maior número de animais positivos está presente no Grupo II (imunização nasal).

A não-detecção de níveis significativos de imunoglobulinas em algumas amostras pode se dar pelo fato de que a res-

Tabela 1. Número de animais positivos para o ELISA indireto, para os Grupo I e II, seguindo-se as datas de coleta.

Coletas	Grupo I(oral)	Grupo II(nasal)
09 dias	1	2
15 dias	0	2
30 dias	0	1
45 dias	1	3
Total de animais positivos	2	8

posta, após a primeira inoculação, corresponde a uma resposta imune primária, na qual se tem a estimulação de clones de linfócitos B reativos ao peptídeo pela primeira vez, com a produção indetectável de imunoglobulinas (PORTELA, 2000). Pode-se considerar também que somente duas imunizações não foram suficientes, sendo necessária a realização de mais imunizações para induzir uma resposta imune mais eficiente, com altos níveis de imunoglobulinas, pois alguns autores encontraram um pico de IgG após a terceira imunização com o peptídeo sintético SBm7462® (PORTELA, 2000; PIMENTEL, 2002; SALES-JUNIOR, 2005).

O cultivo celular a partir da suspensão de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com o peptídeo sintético SBm7462®, proporcionou culturas celulares formadas por populações de células homogêneas, as quais proliferaram ativamente em suspensão. A natureza específica dos linfócitos T foi confirmada pelo aumento no número de células após re-estimulação *in vitro* com o peptídeo sintético SBm7462®, podendo-se considerar esses como clones afins, uma vez que os

linfócitos selecionados para gerar a memória imunológica possuem uma alta afinidade pelo antígeno após um contato primário, conforme o já citado por Sprent (1997).

As culturas celulares dos linfócitos T isolados de cada grupo imunizado, separadamente, após 10 dias de cultivo e acompanhando-se as datas de coleta (9, 15, 30 e 45 dias após a primeira imunização), a partir de uma concentração celular inicial de  $2 \times 10^6$  células, apresentaram proliferação e reprodutibilidade *in vitro*. Sanchez (2004), utilizando-se de mesma metodologia, também obteve uma linhagem de linfócitos T SBm7462-reativos, após cultura e re-estímulo *in vitro* de linfócitos isolados de animais imunizados por via subcutânea, com somente duas inoculações do peptídeo sintético SBm7462®.

Na Tabela 2, pode-se observar os valores, em milhões, do número de linfócitos T SBm7462-reativos após 10 dias de cultivo celular, para as diferentes épocas de coleta, em cada grupo.

Os valores obtidos experimentalmente, e as curvas obtidas por análise de regressão do número de linfócitos T SBm7462-reativos, nos Grupos I e II, em relação ao tempo, apresentaram um comportamento cúbico, seguindo a equação  $y = a + bx + cx^2 + dx^3$ , conforme mostra a Figura 1.

Graficamente, pode-se observar que houve aumento do número de linfócitos para os Grupos I e II, nas diferentes épocas de coleta.

Tabela 2. Número de linfócitos T SBm7462-reativos (milhões) após 10 dias de cultivo celular.

Coletas	Grupo I(oral)	Grupo II(nasal)
09 dias	$11 \times 10^6$ A	$15 \times 10^6$ B
15 dias	$14 \times 10^6$ A	$18 \times 10^6$ B
30 dias	$20 \times 10^6$ A	$30 \times 10^6$ B
45 dias	$46 \times 10^6$ A	$55 \times 10^6$ B

\*Médias seguidas pelas mesmas letras, na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

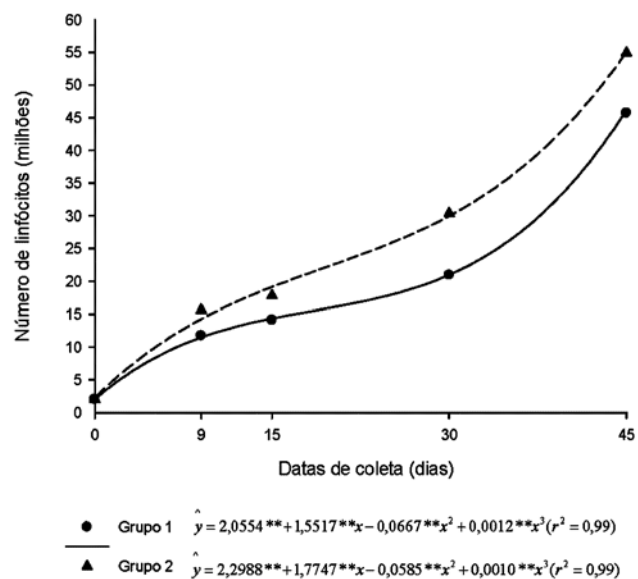


Figura 1. Curvas de regressão do número de linfócitos T SBm7462-reativos (número de linfócitos em milhões), nos Grupos I e II, em relação ao tempo.



cas de coleta, sendo que ocorreu maior proliferação nas datas de coleta após a segunda imunização dos animais.

Para todas as datas de coleta, o Grupo II (imunização nasal) apresentou uma maior proliferação celular *in vitro*, após o estímulo com o peptídeo sintético SBm7462®. A maior proliferação de linfócitos T de memória, obtidos dos animais imunizados por via nasal, corrobora os estudos de alguns autores que mostram essa via como uma rota viável para a administração de antígenos. Hirabayashi et al. (1990) propõem que a rota nasal é mais viável que a oral, pois o trato respiratório é um ambiente menos ácido e proteolítico e também menos colonizado por micro-organismos. Para Hirabayashi et al. (1990) a imunização por via oral requer geralmente doses maiores e administrações repetidas, em decorrência da instabilidade dos antígenos e do ambiente proteolítico e ácido do estômago. Outros autores também citam que a imunização oral é um procedimento que requer uma quantidade maior de antígenos para poder ultrapassar a barreira do trato gastrointestinal (MOWAT, 1994; KE; KAPP, 1996; SUN et al., 1999; GABIUS, 2001).

Muitos antígenos são pouco imunogênicos quando administrados por via mucosa, provavelmente porque falham ao interagir efetivamente com o tecido linfóide associado às mucosas (AIZPURUA; RUSSELL-JONES, 1988). Lehner et al. (1993) destacaram a influência das rotas de imunização e a importância destas para o desenho de peptídeos sintéticos usados para imunização via nasal.

Os linfócitos T SBm7462-reativos, obtidos neste trabalho, comportaram-se como linfócitos T de memória, clones altamente afins que proliferaram após o re-estímulo *in vitro*. Os linfócitos T SBm7462-reativos obtidos dos animais imunizados por via nasal foram os que apresentaram uma maior proliferação celular após re-estimulação *in vitro*. As vias de mucosa oral e nasal podem ser consideradas vias alternativas para a imunização com o peptídeo sintético SBm7462®, porém a imunização por essas vias parece requerer um maior número de doses para induzir uma resposta imune com altos níveis de imunoglobulinas. A via nasal foi a que apresentou melhores resultados para a imunização com o peptídeo sintético SBm7462®.

**Agradecimentos:-** Ao Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores e ao Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária da UFV, onde se realizou este trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZPURUA, H.J.; RUSSELL-JONES, G.J. Oral vaccination: identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *Journal of Experimental Medicine*, v. 167, n. 2, p. 440-451, 1988.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, v. 19, n. 17-19, p. 2666-2672, 2001.

BABIUK, L.A. Vaccination: A Management Tool in Veterinary

Medicine. *Veterinary Journal*, v. 164, n. 3, p. 188-201, 2002.

BERGQUIST, C.; JOHANSSON, E.-L.; LAGERGARD, T.; HOLMGREN, J.; RUDIN, A. Intranasal Vaccination of Humans with Recombinant Cholera Toxin B Subunit Induces Systemic and Local Antibody Responses in the Upper Respiratory Tract and the Vagina. *Infection and Immunity*, v. 65, n. 7, p. 2676-2684, 1997.

GABIUS, H.J. Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: case studies for the mistletoe and galectin-1. *Biochimie*, v. 83, n. 7, p. 659-666, 2001.

HIRABAYASHI, Y.; KURATA, H.; FUNATO, H.; NAGAMINE, T.; AIZAWA, C.; TAMURA, S.; SHIMADA, K.; KURATA, T. Comparison of intranasal inoculation of influenza HA vaccine combined with cholera toxin B subunit with oral or parenteral vaccination. *Vaccine*, v. 8, n. 3, p. 243-248, 1990.

KE, Y.; KAPP, J.A. Oral antigen inhibits priming of CD8+ CLT, CD4+ T cells, and antibody response while activating CD8+ suppressor T cells. *Journal of Immunology*, v. 156, n. 4, p. 916-921, 1996.

KOGA, T.; MCGHEE, J.R.; KATO, H.; KATO, R.; KIYONO, H.; FUJIIHASHI, K. Evidence for early aging in the Mucosal Immune System. *Journal of Immunology*, v. 165, n. 13, p. 5352-5359, 2000.

LEHNER, T.; BROOKS, R.; PANAGIOTIDI, C.; TAO, L.; KLAVINSKIS, L.S.; WALKER, J.; WALKER, P. T and B cell functions and epitope expression in nonhuman primates immunized with simian immunodeficiency virus antigen by the rectal route. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, p. 8638-8642, 1993.

MOWAT, A.M. Oral tolerance and regulation of immunity to dietary antigens. In: OGRA, P.L.; STROBER, W.; MESTECKY, J.; MCGHEE, J.R.; LAMM, M.E.; BIOENENSTOCK, J.E. (ed.). *Handbook of Mucosal Immunity*. San Diego: Academic Press, 1994. p.185-201.

PATARROYO, J.H.; PORTELA, R.W.; DE CASTRO, R.O.; COUTO PIMENTEL, J.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E.; VARGAS, M.I.; PRATES, A.A.; DIAS MENDES, M.A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 88, n. 3-4, p. 163-172, 2002.

PIMENTEL, J.C. A vacina sintética SBm7462 no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em animais estabulados e a campo. 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

PORTELA, R.W.D. Comparação experimental de três peptídeos sintéticos como imunógeno no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). 2000. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

SAEG. Sistemas para análises estatísticas Versão 5.0. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 1993.

- SALES JUNIOR, P.; GUZMAN, F.; VARGAS, M.I.; SOSSAI, S.; PATARROYO, A. M.; LOMBANA, C.Z.G.; PATARROYO, J. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm7462. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 107, n. 3, p. 281-290, 2005.
- SANCHEZ, I.X.B. Estudo “in vitro” da apoptose induzida em linfócitos de camundongos (Balb/c) imunizados com o peptídeo sintético SBm7462. 2004. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- SANGSTER, N.C. Managing parasiticidae resistance. *Veterinary Parasitology*, v. 98, n. 1-3, p. 89-109, 2001.
- SPRENT, J. Immunological memory. *Current Opinion in Immunology*, v. 9, n. 3, p. 371-379, 1997.
- STATSOFT. Statistica for Windows V.6.0. Tulsa: Statsoft, 1996.
- SUN, J.; DIRDEN-KRAMER, B.; ITO, K.; ERNST, P.B.; VAN HOUSTEN, N. Antigen-specific T cell activation and proliferation during oral tolerance induction. *Journal of Immunology*, v. 162, n. 10, p. 5868-5975, 1999.
- TAYLOR, M.A. Recent Developments in Ectoparasiticides. *Veterinary Journal*, v. 161, n. 3, p. 253-268, 2001.

Recebido em 30 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 14 de setembro de 2008.