

ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM CANDIDATO À VACINA DE DNA, UTILIZANDO-SE GENES SINTÉTICOS DERIVADOS DO PEPTÍDEO SBm7462 CONTRA O CARRAPATO *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus**

CARLA L. MEDEIROS¹; BIANCA G. MENDONÇA¹; LARISSA C. TAVARES¹; FLÁVIA A. GIRÃO¹; SIDIMAR SOSSAI¹; ANA P. PECONICK¹; GABRIEL D. CARVALHO¹; JOAQUÍN H. PATARROYO¹

ABSTRACT:- MEDEIROS, C.L.; MENDONÇA, B.G.; TAVARES, L.C.; GIRÃO, F.A.; SOSSAI, S.; PECONICK, A.P.; CARVALHO, G.D.; PATARROYO, J. H. [Elaboration and evaluation of a candidate to the DNA vaccine using synthetic genes derived from the peptide SBm7462 against the carrapato *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus*]. Elaboração e avaliação de um candidato à vacina de DNA, utilizando-se genes sintéticos derivados do peptídeo SBm7462 contra o carrapato *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p. 30-34, 2008. Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa. Avenida Peter Henry Rolfs, s/n Viçosa, MG. 36570-000, Brasil. E-mail: jpatarro@ufv.br

Rhiphicephalus (Boophilus) microplus is one of the most important arthropods in veterinary medicine due economic losses and health problems caused in cattle production. The vaccination represents optimum method evaluated with effective cost to prevent economic losses and to increase the duration and quality of life of the production animals. A synthetic peptide, SBm 7462, derived from Bm86, has been shown great results in control of ticks. The construction and synthesis of one nucleotide sequence based on this peptide might be useful for design a DNA vaccine that has many advances than peptide vaccine. A gene, called *seq1*, was constructed with a three repetition of nucleotide sequence of SBm 7462. It was cloned into a pCIneo vector expression in mammals and injected in BALB/c mouse. When mice were inoculated with the expression cassette they did not response in ELISA. They elevated antibody titles only when vaccinated with the syntetic peptide SBm7462[®]. And, the best titles of immunoglobulins were seen when the SBm7462[®] was administered subcutaneously.

KEY WORDS: Ticks, DNA Vaccine, Syntetic peptide SBm 7462, Bm86

RESUMO

Rhiphicephalus (Boophilus) microplus é um dos mais importantes artrópodes em medicina veterinária, em consequências das perdas econômicas e problemas de saúde causados na produção de gado. A vacinação representa o melhor método avaliado com custo efetivo para prevenir perdas econômicas e aumentar a duração e qualidade de vida dos animais de produção. Um peptídeo sintético, SBm 7462, derivado da proteína intestinal Bm86 do *R. (B.) microplus*, tem obtido excelentes resultados no controle de carrapatos. A construção e síntese de uma sequência nucleotídica baseada neste peptídeo podem ser úteis para o *design* de uma vacina DNA que tem mui-

tas vantagens sob uma vacina sintética. Um gene, denominado *seq1* foi construído repetindo-se três vezes a sequência nucleotídica do SBm 7462. Ele foi clonado dentro do vetor pCIneo de expressão em mamíferos e injetado em camundongos BALB/c. Quando camundongos foram inoculados com o cassete de expressão, eles não responderam ao ELISA. Eles elevaram os títulos de anticorpos apenas quando inoculados com o peptídeo sintético SBm7462[®]. E os melhores títulos de imunoglobulinas foram vistos quando o SBm7462[®] foi administrado subcutaneamente.

PALAVRAS-CHAVE: Carrapatos, Vacina de DNA, Peptídeo sintético SBm7462, Bm86.

INTRODUÇÃO

A demanda por vacinas parasitárias em saúde animal é crescente, e empresas remetem lucros acima de três bilhões de dólares somente nesse setor (DALTON; MULCAHY,

* Sob os auspícios da FAPEMIG, CAPES e CNPq.

¹Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Viçosa, MG 36570-000, Brasil. E-mail: medcarla@yahoo.com.br e jpatarro@ufv.br

2001). Vacinas de DNA são os mais novos tipos de vacinas de subunidades, que permitem a expressão de proteínas em tecidos animais após a introdução de um plasmídeo ou um vetor viral, codificando o antígeno protetor selecionado (IVORY e CHADEE, 2004). Na medicina veterinária, são vários os trabalhos em aves, suínos, bovinos, ovelhas, patos, peixes e animais de companhia. (BABIUK et al., 1999; KRISHMAN, 2000; DUNHAM, 2002; CRAMPTON; VANNIASINKAM, 2007; LITTELVAN DEN HURK et al., 2000). Em 2005, duas vacinas de DNA foram licenciadas com aplicações na saúde animal, uma contra West Nile vírus (WNV) em cavalos e outra contra vírus de infecções hematopoiéticas necróticas (IHNV) em salmão (ULMER et al., 2006). Contudo, ainda existem poucos trabalhos com vacinas de DNA contra o carrapato *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus*.

A vacina sintética anti-*R. (B.) microplus* (SBm 7462), patenteada no Brasil, EUA, México, Austrália e na União Europeia, é uma vacina eficiente desenhada a partir da sequência da proteína intestinal de *R. (B.) microplus* denominada Bm86, com média de 80% de eficiência na redução de carrapatos (PATARROYO et al., 2002). Existe, porém, no mundo, apenas seis centros especializados na síntese química de peptídeos em escala industrial. Esse empecilho oneraria a produção e envio de grandes quantidades de peptídeo em curto espaço de tempo, o que, certamente, acarretariam problemas de distribuição dessa vacina entre os inúmeros potenciais mercados consumidores.

Para suprir esta necessidade, em curto prazo, vê-se como uma das alternativas viáveis, o desenvolvimento de uma vacina de DNA, na qual a produção do antígeno seria feita pelo próprio hospedeiro (via endógena) de modo eficiente e mais barato. Dentre as principais vantagens para o uso das vacinas de DNA estão: (a) a produção do antígeno é endógena; (b) desde que o animal atue como um biorreator, não há necessidade de processamento da vacina após a purificação do plasmídeo, ou seja, torna-se um processo de produção muito mais econômico; (c) como o antígeno é produzido endogenamente, não há necessidade de adjuvantes e muito menos efeitos adversos relacionados com este; (d) induzem uma resposta imune mais balanceada Th1/ Th2; (e) pode induzir resposta imune em neonatos mesmo na presença de anticorpos maternos, o que, também, leva a possibilidade de induzir imunidade *in utero*; (f) eliminação do risco de agentes contaminantes, que é um dos grandes problemas para as vacinas vivas convencionais, devido ao método de purificação (BABIUK et al., 2003).

O objetivo deste trabalho, foi desenvolver um candidato à vacina de DNA com um gene sintético que codifica o peptídeo SBm7462 e avaliar a resposta imunológica humoral em camundongos Balb/C.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a construção do cassete de expressão foi utilizado um gene sintético derivado do peptídeo SBm7462®, esenhado no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e

Vetores e o vetor pCIneo (Promega-EUA). O gene, denominado *seq1*, consta da sequência nucleotídica que codifica o peptídeo SBm 7462® ordenada repetidamente três vezes. Apresenta ainda em suas extremidades 5' e 3' sítios de restrição para enzimas *XhoI* e *EcoRI*, respectivamente. O gene de interesse foi sintetizado na Entelechon (Alemanha) e veio inserido no vetor pSCA, que possui 3.5kb de tamanho. Após sua multiplicação, a *seq1* foi isolada do vetor de clonagem por uma reação de clivagem utilizando-se 10 U das enzimas *XhoI* e *EcoRI*. Posteriormente, deu-se a purificação dos insertos a partir de gel de agarose 0,8%, utilizando-se o *kit* Wizard® SV and PCR Clean-up System (Promega-EUA), de acordo com instruções do fabricante. O vetor de expressão em mamíferos, pCIneo, foi clonado em *Escherichia coli* DH5á e purificado utilizando-se o *kit* citado anteriormente e também clivado com as mesmas enzimas utilizadas para o *seq1*. O cassete de expressão, pCIneo1, foi construído inserindo-se a *seq1* no vetor pCIneo através de extremidades coesivas ligadas com a enzima T4 DNA ligase. Para a clonagem do cassete de expressão, utilizaram-se as mesmas condições do vetor pCIneo vazio. Cerca de 16 clones foram submetidos à PCR de colônia, utilizando-se os *primers* T7 EEV (5' - AAG GCT AGA GTA CTT AAT ACG A - 3') e T3 (5' - ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA - 3') para identificação dos transformantes. As amplificações foram realizadas em termociclador "MJ Research, Inc. modelo PTC -100 – Watertown, EUA", como segue: 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 50°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Para cada reação utilizaram-se 100 ng de DNA, 1X PCR buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,3 mM de dNTPs, 3U de Go *Taq* DNA polimerase (Promega EUA) e 0,5 mM dos *primers forward* e *reverse*. A purificação do DNA plasmidial foi feita pelo Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega®), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, os cassetes de expressão foram submetidos ao sequenciamento para confirmar a orientação correta do inserto. Quatro clones positivos foram sequenciados no equipamento MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences, RU), com os *primers* T7EEV e T3.

O pCIneo1 foi inoculado em camundongos, para verificar a produção de anticorpos anti o peptídeo SEQ1. A produção de DNA plasmidial para a realização das vacinações foi feita utilizando-se o *kit* Pureyield™ Plasmid Maxiprep System (Promega, EUA). Foram utilizados cinco grupos de 5 animais. Os animais foram inoculados vias subcutânea (SC) e intramuscular (IM) a cada quinze dias, sob anestesia inalatória com éter. O número total de doses foi igual a três, de acordo com os seguintes tratamentos: 100 µg de pCIneo não recombinante (IM); 100µL de PBS (IM); 100µg de pCI neo/ gene1 (IM); 75mg de saponina com 100mg de peptídeo SBm7462 (IM) e 75mg de saponina com 100mg de peptídeo SBm7462 (SC). Amostras de sangue foram coletadas sem uso de anticoagulante a cada 14 dias, após cada vacinação, para realização de ELISA indireto, segundo método descrito por Sales Junior (2003), para detecção de IgGs totais expressadas. Procedeu-

se análise de variância (ANOVA), tendo sido testadas as pressuposições, utilizando-se $\alpha = 0,05$, seguida do teste de Duncan, ao mesmo nível de significância, para comparação de médias. As análises foram realizadas nos *softwares* MINITAB 14 e SAEG Demo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho estudou a construção e expressão *in vivo* de um candidato à vacina de DNA anti o carrapato *R. (B.) microplus*.

O gel de agarose 0,8% mostra a correta clivagem da *seq1*, devido à presença de uma banda entre 400 e 500pb, e o corte do vetor pCIneo (Figura 1).

Uma reação considerada positiva na PCR deveria amplificar 544pb. Dessa forma, apenas 3 das 16 colônias foram consideradas positivas (Figura 2).

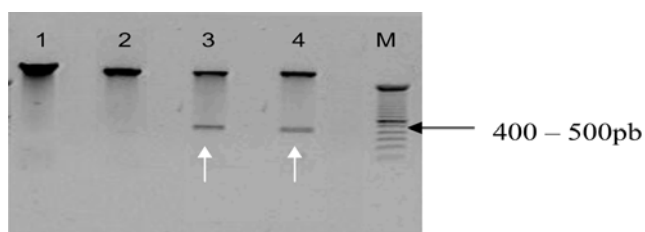


Figura 1. Fotografia do gel de agarose 1%, mostrando a clivagem da sequência 1 (fragmento de 438pb representado pelas setas em branco). M: representa o marcador de 100pb; 1: vetor pCIneo íntegro (sem clivar); 2: vetor pCIneo clivado; 3 e 4: sequências 1 clivadas do vetor de clonagem pSCA.

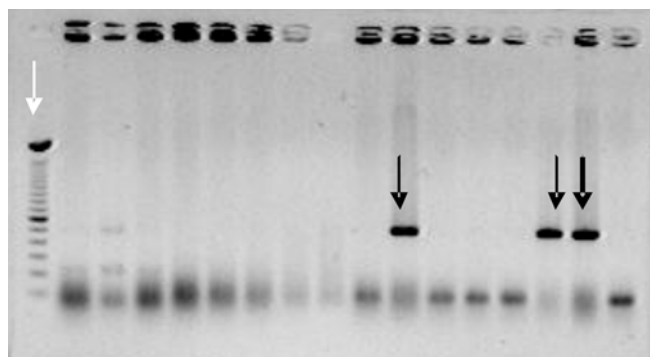


Figura 2. Fotografia do gel de agarose 0,8% da PCR de 16 colônias transformadas. As setas em preto representam as bandas de 547pb (438pb + 106pb) amplificadas, ou seja, colônias positivas. A seta branca mostra o marcador DNA ladder 100pb (Promega-USA).

O sequenciamento do cassete de expressão foi feito para verificar possíveis erros durante a ligação da *seq 1* no pCIneo. De acordo com os resultados obtidos (Figura 3), o inserto estava com orientação e nucleotídeos, exatamente, como desenhado. Assim, a *seq 1* estava corretamente inserida no vetor pCIneo, sem nenhum erro, pronta para codificar a expressão do peptídeo.

Nos ensaios de ELISA, realizados com soro dos animais inoculados, não houve diferença significativa entre grupos vacinados com: PBS, pCIneo vazio e pCIneo 1 (Figura 4),

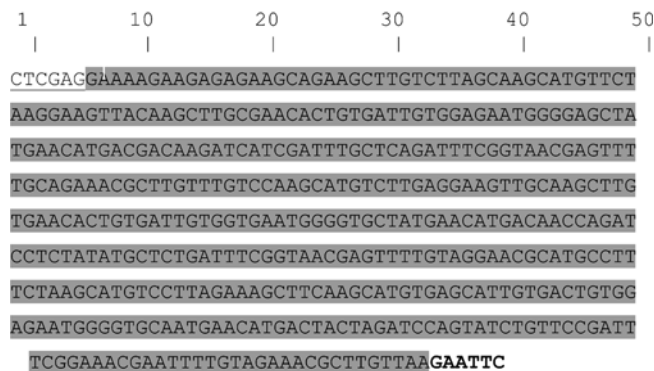


Figura 3. Mostra a sequência nucleotídica resultante do sequenciamento do cassete de expressão (pCIneo 1). A região sublinhada representa o sítio de restrição XhoI e, em itálico, o sítio de restrição EcoRI. A região cinza são os nucleotídeos que compõem a sequência nucleotídica e que formam o *seq 1*.

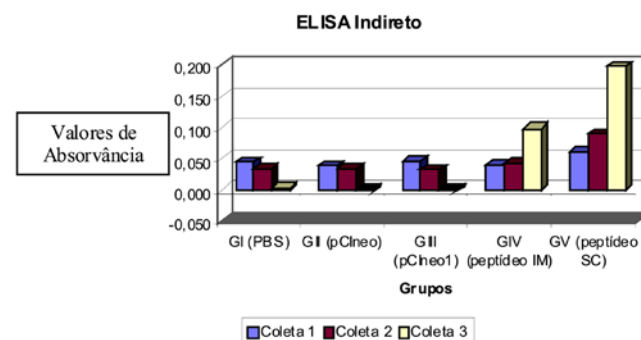


Figura 4. Gráfico de comparação dos valores de absorvância entre grupos vacinados, descontando-se o valor da absorvância branca.

discordando de outros trabalhos com vacinas de DNA contra o *R. (B.) microplus* (DE ROSE et al., 1999; RUIZ et al., 2007). A ANOVA da primeira e terceira coletas mostra diferença significativa (p -valor = 0,04094 e p -valor = 0,01171, respectivamente) entre os grupos (I, II e III), utilizando-se $\alpha = 0,05$, sendo os grupos II e III diferentes do grupo I, de acordo com o teste Duncan. Os dados referentes a essas coletas apresentaram coeficientes de variação considerados altos ($CV = 30,691$ e $CV = 16,613$, respectivamente), de modo que se tomou o resultado da segunda coleta ($CV = 6,417$) como parâmetro de conclusão. A ANOVA da segunda coleta mostrou que não existe diferença significativa entre o grupo pCIneo1 e os controles PBS e pCIneo vazio. Pode-se notar, também, que nos grupos I, II e III houve uma mínima diminuição dos títulos de anticorpos durante o decorrer das três coletas, concordando com os trabalhos de Wang et al. (2008), que demonstraram esse tipo de resposta em coelhos quando inoculados com vetores plasmidiais vazios, ou seja, quando não há expressão de proteínas.

Além disso, pode-se verificar um aumento gradual dos títulos de anticorpos anti o peptídeo SBm7462 nos dois grupos (IV e V) vacinados com o peptídeo SBm7462. O maior pico de IgG para esses dois grupos, ocorreu após a terceira imunização com o peptídeo sintético SBm7462, concordando com trabalhos anteriores (PORTELA, 2000; PIMENTEL, 2002;

SALES-JUNIOR, 2003). Contudo, houve maior aumento dos títulos de IgG no grupo V (vacinado subcutaneamente) do que no grupo IV (vacinado intramuscularmente). Como visto em outros trabalhos (RAO et al., 2006; WANG et al., 2008), a resposta imune é fortemente influenciada pela via de inoculação. De acordo com Leitner et al. (2000), em contraste com a musculatura, a pele tem importantes funções imunológicas, como sendo a “primeira linha de defesa” para o sistema imune.

Se forem extrapolados esses resultados do peptídeo para vacinas de DNA, há um indício para a não expressão da SEQ1. De acordo com Shedlock e Weiner (2000), a extensão da proteção elicitada pelos vários modos de administração de uma vacina de DNA é determinada pelo *network* entre APCs/antígeno no tecido local alvo e a quantidade de plasmídeo administrado. Como as APCs são mais prevalentes na pele do que nos músculos, a via SC requer menor quantidade de plasmídeo para eliciar uma resposta no animal. Assim, a magnitude da resposta imune SC pode ser maior que a IM, se for comparada uma mesma dose de DNA plasmidial pelas duas vias. Pode-se supor, então, que a concentração da construção pCIneo1 aplicada tenha sido menor que a necessária para induzir resposta humoral via de inoculação IM.

Vajdy et al. (2004) afirmam que mudanças na sequência nucleotídica de alguns genes para melhor refletir códons preferenciais usados em mamíferos pode resultar em um aumento marcante no nível de expressão em células eucarióticas. Além disso, a inserção de uma sequência Kozak (GCCa/gCCAUGG) ao redor do códon iniciador pode ser fundamental para a ótima expressão de uma proteína em células de mamíferos (KOZAK, 1999). Brice et al. (2007) relatam, ainda, que um aumento no intervalo das imunizações tem correlação direta com o aumento da resposta celular antígeno específica e, também, na resposta de anticorpos. Dessa forma, são necessários mais testes e mudanças na construção pCIneo para se afirmar o uso ou não dessa construção com vacina de DNA.

Agradecimentos: Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Projeto de Apoio ao Desenvolvimento de Tecnologias Agropecuárias para o Brasil (PRODETAB) e à Universidade Federal de Viçosa (UFV).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABIUK, L.A.; LITTEL-VAN DEN HURK, S.V.D.; BABIUK, S.L. Immunization of animals: from DNA to dinner plate. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 72, n. 1, p. 189-202, 1999.
- BABIUK, L.A.; PONTAROLLO, R.; BABIUK, S.; LOEHR, B., I.; LITTEL-VAN DEN HURK, S.V.D. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. *Vaccine*, v. 21 n.7, p. 649-658, 2003.
- BRICE, G.T.; DOBANÔ, C.; SEDEGAH, M.; STEFANIAK, M.; GRABER, N.L.; CAMPO, J.J.; CARRUCI, D.J.; DOOLAN, D.L. Extended immunization intervals enhance of plasmid DNA vaccine. *Microbes and Infection*, v. 9 n.12, p.1439-1446, 2007.
- CRAMPTON, A.; VANNIASINKAM, T. Parasite vaccines: The new generation. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 7 n 5, p. 664-673, 2007.
- DALTON, J.P.; MULCAHY, G. Parasite vaccine - a reality? *Veterinary Parasitology*, v. 98 n.1, p.149-167, 2001.
- DE ROSE, R.; McKENNA, R.V.; COBON, G.; TENNENT, J.; ZAKRZEWSKI, H.; GALE, K.; WOOD, P.R.; SCHEERLINCK, J.-P.Y.; WILLADSEN, P. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 17 n. 3, p. 151-160, 1999.
- DUNHAM, S.P. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Research in Veterinary Science*, v. 73, n.1, 9-16, 2002.
- IVORY, C.; CHADEE, K. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genetic Vaccines and Therapy*, v. 2, n.17, p. 1-8, 2004.
- KOZAK, M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, v. 234, n. 2, p.187-208, 1999.
- KRISHMAN, R.B. Current status of DNA vaccines veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 43, n.1, p. 3-11, 2000.
- LEITNER, W.W.; YING, H.; RESTIFO, N.P. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*, v. 18, n.9, p. 765-777, 2000.
- LITTEL-VAN DEN HURK, S.V.D.; GERDTS, V.; LOEHR, B.I.; PONTAROLLO, R.; RANKIN, R.; UWIERA, R.; BABIUK, L.A. Recent advances in use of dna vaccines for the treatment of diseases of diseases of farmed animals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 43, n.1, p. 13-28, 2000.
- PATARROYO, J.H.; PORTELA, R.W.; DE CASTRO, R.O.; COUTO PIMENTEL, J.; Guzman, F.Q.; PATARROYO, M.E.; Vargas, M.I.; PRATES, A.A.; DIAS MENDES, M.A. Immunization of cattle with syntetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 88, n.3, 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. 78f. 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. 87f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.
- RAO, S.S.; GOMEZ, P.; MASCOLA, J.R.; DANG, V.; KRIVULKA, G.R.; YU, F.; LORD, C.I.; SHEN, L.; BAILER, R.; NABEL, G.J.; LETVIN, N. L. Comparative

- evaluation of three different intramuscular delivery methods for DNA immunization in a nonhuman primate animal model. *Vaccine*, v. 24, n.3, p. 367-373, 2006.
- RUIZ, L.M.; ORDUZ, S.; LÓPEZ, E.D.; GUZMÁN, F.; PATARROYO, M.E.; ARMENGOL, G. Immune response in mice and cattle after immunization with a *Boophilus microplus* DNA vaccine containing bm 86 gene. *Veterinary Parasitology*, v. 144, n.1, p. 138-145, 2007.
- SALES-JUNIOR, P.A. *Utilização de microesferas biodegradáveis PLGA como sistema de liberação para a vacina sintética SBm7462 no controle do Boophilus microplus (Canestrini, 1887): modelo experimental em camundongos*. 2003. 77f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.
- SHEDLOCK, D.J.; WEINER, D.B. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity *Journal of Leukocyte Biology*, v. 68, n. 6, p.763-806, 2000.
- ULMER, J.B.; WAHREN, B.; LIU, M.A. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends in Molecular Medicine*, v. 12 n. 5, p. 217-222, 2006.
- VAJDY, M.; SRIVASTAVA, I.; POLO, J.; DONNELLY, J.; O'HAGAN, D., T; SINGH, M. Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA- based vaccines. *Immunology an Cell Biology*, v. 82, n.6, p. 617-627, 2004.
- WANG, S.; ZHANG, C.; ZHANG, L.; LI, J.; HUANG, Z.; LU, S. The relative immunogenicity of DNA vaccines delivered by the intramuscular needle injection, electroporation and gene gun methods. *Vaccine*, 2008. doi:10.1016/j.vaccine.2008.1002.1033.

Recebido em 30 de abril de 2008.

Aceito para publicação em 14 de setembro de 2008.