

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**Avaliação de vacina recombinante de ortólogo de
subolesin em cães contra o carrapato *Rhipicephalus
sanguineus* (LATREILLE, 1806)**

**Suzana Akemi Tsuruta
Médica veterinária**

**UBERLÂNDIA – MINAS GÉRIAS – BRASIL
Junho de 2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**Avaliação de vacina recombinante de ortologo de
subolesin em cães contra o carrapato *Rhipicephalus
sanguineus* (LATREILLE, 1806)**

Suzana Akemi Tsuruta

Orientador: Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Clínica e Cirurgia Animal).

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Junho de 2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**Avaliação de vacina recombinante de ortólogo de
subolesin em cães contra o carrapato *Rhipicephalus*
sanguineus (LATREILLE, 1806)**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó

Docente da Faculdade de Medicina Veterinária
FAMEV/UFU

Prof. Dr. Fernando Antônio Ferreira

Docente da Faculdade de Medicina Veterinária
FAMEV/UFU

Prof. Dr. Márcio Botelho de Castro

Docente da Faculdade de Medicina Veterinária
UnB

**UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Junho de 2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

T882a Tsuruta, Suzana Akemi, 1979-

Avaliação de vacina recombinante de ortologo de subolesin em cães contra o carrapato *Rhipicephalus snguineus* (Latreille, 1806)

/ Suzana Akemi Tsuruta. - 2008.

53 f. : il.

Orientador:..Matias Pablo Juan Szabó.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro- grama de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Vacinas - Teses. 2. Carrapato - Teses. 3. Cães - Vacinação -

Teses. I. Szabó, Matias Pablo Juan. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU:

615.371:619

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Massao e Emília, as minhas irmãs Patrícia e Karina, aos meus amigos, em especial a Marlene, Prof. Matias, Guilherme, Marcus, Marcos (bola), e a todos os animais que participaram do experimento.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor **Matias**, que aceitou me orientar no experimento, mestrado e trabalho e vida pessoal.

Ao Doutorando **Carlos Roberto Prudêncio**, por me ajudar nos testes de ELISA e correção.

Ao hospital veterinário por fornecer o local para o experimento e me darem apoio, em especial ao **Prof. Marco, Amado e Vânia**.

Aos amigos que me contribuíram com o experimento, **Marlene, Marcus, Guilherme e Marcos**.

Aos membros do laboratório de análises do Hospital Veterinário, em especial ao **Felipe**.

Aos animais utilizados no experimento, em especial a **Tatá, Amarelinha e Yugui**.

As minhas irmãs, **Karina e Patrícia**, por me ajudar a cuidar dos meus filhotes.

E a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente com a realização deste trabalho.

**Subolesin recombinant of ortholog vaccine evaluation in dogs against tick
Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806)**

ABSTRACT - The *R. sanguineus* is the tick with most world wide distribution and represents, as curiosity, the unique genus in Brazil. This acarus is associated to the presence of its host, the dog, and is used as a vector to agents of high importance diseases such as canine erliquiosis and babesiosis and humans' botonose and spotted fever. The present paper had the aim to evaluate the efficiency and to characterize the induced immune answer by a mosquito subolesin recombinant vaccine and ortholog of the tick *Ixodes scapularis* against *R. sanguineus*. In this evaluation six dogs were vaccine inoculated and other six were inoculated only with the adjuvant. The animals were then challenged with experimental infestation to evaluate vaccine's efficiency. The tick dog's cutaneous reaction was rated by histopathology. Hyper sensibility cutaneous test with tick antigens was done to estimate vaccinated dog's immune answer alterations. Antibodies titles against the vaccinal antigen were estimated by ELISA. Although there was a decrease in the recovering rate of grubs and nymphs in the vaccinated animals there wasn't statistical differences in biological parameters between the two experimental groups. The vaccinated animals presented more discreet hemorrhages, necrosis and edema at the tick's fixation point. The cutaneous hyper sensibility of vaccinated animals was exacerbated. The vaccinated animals presented an elevation in anti-subolesin antibodies. It's been concluded that the tested vaccine doesn't induce to a remarkable resistance to the tick *R. sanguineus* in spite of it can modifcate the hot's reaction.

Key words: Dog, tick, *R. sanguineus*, subolesin, recombinant ortholog vaccine.

Avaliação de vacina recombinante de ortologo de subolesin em cães contra o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)

RESUMO - O *R. sanguineus* é o carrapato com a mais ampla distribuição mundial, e representa, a saber, a única espécie do gênero no Brasil. Este ácaro está associado à presença do seu hospedeiro, o cão, e serve de vetor para agentes de várias doenças de elevada importância como a erliquiose e babesiose canina e a febre botonosa e maculosa no humano. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia e caracterizar a resposta imune induzida por uma vacina recombinante de subolesin de mosquito e ortologo daquele do carrapato *Ixodes scapularis* contra o *R. sanguineus*. Nesta avaliação seis cães foram inoculados com a vacina e seis inoculados apenas com o adjuvante. Os animais foram então desafiados com infestação experimental para avaliar a eficácia da vacina. A reação cutânea dos cães aos carrapatos foi avaliada por histopatologia. Teste cutâneo de hipersensibilidade com antígenos do carrapato foi feito para analisar alterações na resposta imune dos cães vacinados. Títulos de anticorpos contra o antígeno vacinal foram avaliados por ELISA. Apesar de uma diminuição na taxa de recuperação de larvas e ninfas em animais vacinados não houve diferença estatística nos parâmetros biológicos entre os dois grupos experimentais. Os animais vacinados apresentaram hemorragia, necrose e edema mais discretos no ponto de fixação dos carrapatos. A hipersensibilidade cutânea dos animais vacinados estava exacerbada. Os animais vacinados apresentaram elevação nos títulos de anticorpos anti-subolesin. Conclui-se que a vacina testada não induz resistência apreciável ao carrapato *R. sanguineus* embora modifique as reações do hospedeiro.

Palavras-chave: Cão, Carrapato, *R. sanguineus*, subolesin, vacina recombinante ortologo

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	1
II- REVISÃO DE LITERATURA.....	3
II.1 O <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	3
II. 2. A imunidade a carrapatos e a transmissão de doenças infecciosas.....	5
II. 3. Controle de carrapato através de vacinas.....	6
III OBJETIVOS.....	8
IV. MATERIAL E MÉTODO.....	9
IV. 1. Carrapato.....	9
IV. 2 Hospedeiro experimental.....	9
IV. 3. Antígeno vacinal.....	10
IV. 4. Protocolo de vacinação com a proteína recombinante...10	
IV. 5. Infestações experimentais.....	11
IV. 6. Alterações microscópicas no ponto de fixação dos carrapatos em animais teste e controle	14
IV .7. Teste cutâneo de hipersensibilidade.....	16
IV .7. 1 . Extrato de Carrapato.....	16
IV .7.2. Teste cutâneo.....	16
IV. 8. Avaliação da resposta imune humoral de cães ao antígeno vacinal dos	18
IV. 9. Análise Estatística.....	19
V. RESULTADOS	
V. 1. Parâmetros biológicos dos carrapatos alimentados em animais vacinados ou controle.....	20
V.2. Alterações microscópicas no ponto de fixação dos carrapatos em animais teste e controle.....	25
V.3. Teste cutâneo de hipersensibilidade.....	27
V.4. Avaliação da resposta imune humoral de cães	

ao antígeno vacinal.....	29
V.5. Observações Clínicas	30
VI. DISCUSSÃO.....	32
VII. CONCLUSÃO.....	36
VIII. REFERÊNCIAS.....	37

Figuras

Figura 1. Manutenção da colônia de <i>R. sanguineus</i> em laboratório. 1A - Coelho com câmara de alimentação. 1B - A estufa B.O.D	9
Figura 2. Manutenção dos hospedeiros experimentais. 2A – Canil experimental do Hospital Veterinário. 2B -Residência particular e cão em experimento.	10
Figura 3. Frascos codificados contendo vacina ou solução controle	11
Figura 4. Câmaras de alimentação e infestação experimental dos cães. 4A- Câmaras de alimentação. 4B – Seringas adaptadas para liberação das formas imaturas dos carrapatos para as câmaras de alimentação. 4C - Adultos, ninfas e larvas de <i>R. sanguineus</i> . 4D - Cão com câmara de alimentação e colar elizabetano. 4E e 4F - Câmaras com infestação de cães com carrapato.	13
Figura 5. Etapas da biópsia realizada com saca bocado em cães para obtenção de amostra de pele parasitada pelo carrapato <i>R. sanguineus</i> . 5A – área parasitada após retirada da câmara de alimentação; 5B – Aplicação do anestésico local; 5C e 5D. incisão de pele com “punch”. E. incisão de pele. F. retirada do fragmento de pele. 5G – Ferida cirúrgica remanescente.	15

Figura 6. Teste cutâneo de hipersensibilidade. 6A e 6B cães com área a ser inoculada na orelha demarcada. 6C Inoculação de extrato. D. mensuração da espessura da orelha com espessímetro	18
Figura 7. Parâmetros biológicos de fêmeas alimentadas em cães vacinados com subolesin (teste) e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007	22
FIGURA 8. Parâmetros biológicos de ninfas alimentadas em cães vacinados com subolesin (teste) e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.	23
FIGURA 9. Parâmetros biológicos de larvas alimentadas em cães vacinados com subolesin (teste) e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007	24
FIGURA 10. Fotomicrografia de pele de cão vacinado, parasitada pelo carrapato <i>R. sanguineus</i> adulta. Note solução de continuidade epidérmica (seta) sob o cone de cimento do carrapato (cc), infiltrado leucocitário dérmico, hemorragia (círculo). Hematoxilina eosina, objetiva 10x.	26
Figura 11. Aumento na espessura do pavilhão auricular de cães induzido pelo extrato de <i>R. sanguineus</i> em cães vacinados com subolesin ou controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.	29
Figura 12. Anticorpos de cães contra subolesin de mosquito nos grupos vacinado e vacinado antes da inoculação da vacina (retângulos negros) e 45 dias após a vacinação (retângulos brancos), Uberlândia- MG, 2007.	30
Figura 13. Abscessos no local de inoculação da vacina nos cães.	31

Tabelas

Tabela 1. Parâmetros biológicos de fêmeas do <i>R. sanguineus</i> alimentadas em cães do grupo vacinado com subolisín e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007	20
Tabela 2.. Parâmetros biológicos de ninfas do <i>R. sanguineus</i> alimentadas em cães do grupo vacinado com subolisina e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.	21
Tabela 3. Parâmetros biológicos de larvas do <i>R. sanguineus</i> alimentadas em cães do grupo vacinado com subolisina e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.	21
Tabela 4. Alterações microscópicas da epiderme e derme no local de fixação de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em cães vacinados com subolesin e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.	26
Tabela 5. Infiltrado celular inflamatório no local de fixação de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em cães vacinados com subolesin e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007	27
Tabela 6. Aumento na espessura do pavilhão auricular de cães induzido pelo extrato de <i>R. sanguineus</i> em cães vacinados com subolisín ou controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007	28

.INTRODUÇÃO

Carrapatos são ectoparasitas de importância expressiva em virtude de seus efeitos deletérios sobre a saúde pública, saúde do animal em geral e economia em determinados países, notadamente no Brasil. Estes parasitas transmitem uma variedade maior de agentes patogênicos de que qualquer outro grupo de artrópodes, uma lista que inclui riquetsias, protozoários, espiroquetas, e vírus (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

Globalmente, carrapatos são considerados o segundo vetor em importância na transmissão de doenças infecciosas para o homem, perdendo apenas para mosquitos (PAROLA; RAOULT, 2001). Na Europa e Estados Unidos estes parasitas são os principais vetores de doenças infecciosas para o ser humano ao transmitirem a doença de Lyme e diversos outros bioagentes patogênicos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004; PIESMAN; 2004). Na América do Sul são responsáveis pela transmissão de uma zoonose de elevada taxa de mortalidade, a febre maculosa, que têm causado preocupação crescente na saúde pública (LEMONS et al., 1997; LABRUNA et al., 2004). Mais recentemente comprovou-se no Brasil, em um modelo experimental, a possibilidade de transmissão da leishmaniose visceral canina por carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (COUTINHO et al., 2005).

No caso dos animais domésticos os carrapatos são os principais vetores de agentes patogênicos causando uma extensa lista de doenças infecciosas em animais de produção, de companhia e silvestres. Esta lista inclui doenças que afetam seriamente a produção animal como é o caso da coudriose e teleriose, particularmente na África e dos agentes da babesiose e anaplasma presentes também no Brasil (JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Animais de companhia são também muito afetados e doenças como erliquiose canina são atualmente cosmopolitas e se constituem em uma das principais doenças infecciosas destes animais (SZABÓ et al., 2001; JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

Além de sua competência como vetores, carrapatos também causam danos diretos por hematofagia, gerando perda sanguínea e queda na produção, traumas locais que permitem o desenvolvimento de infecções secundárias e depreciação do

couro e paralisia via toxinas (JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Considerado apenas o Brasil os prejuízos diretos e indiretos do carrapato na bovinocultura são estimados em 2 bilhões de dólares por ano (GRISI, 2002).

O desenvolvimento de uma vacina é um processo longo e caro. Deve-se pesquisar por um antígeno protetivo, adjuvante adequado, produto com preço compatível, de uso fácil e inócuo. No caso de artrópodes vetores uma dificuldade adicional são os mecanismos de evasão do parasito que eficientemente controlam as reações de seu hospedeiro (BROSSARD; WIKEL, 2004). Este controle permite a hematofagia do parasito, mas também cria um meio privilegiado na pele e linfonodos regionais do hospedeiro para a transmissão de patógenos intracelulares inoculados pelo vetor (FERREIRA et al., 2003). Assim sendo, a pesquisa de antígenos vacinais adequados e que sejam efetivos apesar dos mecanismos de evasão do parasito é uma etapa crucial. Um gargalo nestas pesquisas é a avaliação da proteção induzida pelos diversos antígenos candidatos gerados. Este processo necessariamente passa pela inoculação dos antígenos no hospedeiro a ser favorecido pela vacina e o desafio com os vetores alvo da vacina.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II.1 O *Rhipicephalus sanguineus*

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) está presente em todos os continentes do planeta, onde parasita primariamente o cão doméstico. Embora ele tenha se originado na região afrotropical, sua distribuição quase cosmopolita se deve as migrações humanas pelo mundo, levando consigo o cão doméstico (Walker et al., 2000). A introdução do *R. sanguineus* nas Américas pode ter ocorrido recentemente, durante a colonização européia a partir do final do século XV, ou mesmo anteriormente, os relatos de fósseis de cães domésticos no Peru, Bolívia e México datados para antes do século XV (LEONARD et al., 2002).

No Brasil, *R. sanguineus* não era encontrado nos estados de Minas Gerais, São Paulo e na região Sul até antes de 1906, quando era bastante abundante na Bahia, Sergipe, Maranhão, Pará, Mato Grosso e em algumas localidades da cidade do Rio de Janeiro. De 1910 em diante, esta espécie tornou-se bastante abundante no Rio de Janeiro e nos demais estados das regiões Sudeste e Sul (ARAGÃO, 1911; 1936). Nas últimas décadas, tanto a prevalência quanto a intensidade das infestações por este carrapato em cães vêm aumentando. No Rio Grande do Sul, por exemplo, este carrapato foi citado de baixa ocorrência em 1947, tendo sido encontrado em apenas 1 (1,29%) de 77 cães examinados (CORRÊA, 1955). Cinco décadas mais tarde, este mesmo carrapato foi encontrado em 48,8% de 450 cães da cidade de Porto Alegre (RIBEIRO et al., 1997).

Atualmente, o *R. sanguineus* é considerado, juntamente com as pulgas, os principais ectoparasitas de cães em todo o Brasil. Em Uberlândia foi constatada em levantamento realizado em 2007 a infestação de, aproximadamente, 30% dos cães da área urbana do município pelo carrapato *R. sanguineus* (Luis Gustavo Antunes Souza, comunicação pessoal). Tal fato é retratado pela grande atenção com que a indústria farmacêutica veterinária trata este carrapato; até o início da década de 1980, não existia no mercado brasileiro nenhum produto comercial carrapaticida com indicação específica para tratamento de *R. sanguineus* em cães. Atualmente, há dezenas de produtos, das mais diversas formulações e apresentações,

representando um considerável faturamento da linha veterinária das indústrias farmacêuticas do Brasil.(LABRUNA, 2004).

Por ser um carrapato da família Ixodidae, o *R. sanguineus* apresenta três formas parasitárias dentro de seu ciclo de vida: larva, ninfa e adulto, este último é o único estágio com dimorfismo sexual. Em revisão realizada por Labruna (2004) o autor observa que cada estágio parasita o hospedeiro por alguns dias, três a sete dias para larvas e ninfas, cinco a dez dias para fêmeas adultas e mais de 15 dias para machos adultos. Neste período se alimenta principalmente de sangue, mas também de linfa e restos tissulares da derme e/ou epiderme lesada por diversas enzimas proteolíticas secretadas pela saliva do carrapato. No final do período parasitário, as larvas e ninfas ingurgitadas se desprendem do hospedeiro para fazer, no ambiente, a ecdise para o próximo estágio evolutivo, sendo ninfas e adultos, respectivamente. As fêmeas ingurgitadas, que foram fertilizadas pelos machos sobre o hospedeiro, se desprendem deste para fazerem a postura de ovos no ambiente. Cada fêmea pode colocar de 1000 a 3000 ovos, que após incubação de algumas semanas, darão origem às larvas. Os machos, que ficam sobre o hospedeiro por vários dias ou semanas, não ingurgitam ou não aumentam nitidamente de tamanho, mas podem fertilizar várias fêmeas neste período. A duração das fases de desenvolvimento em vida livre (ecdise, postura e incubação dos ovos) pode variar de poucas semanas a alguns meses, sendo inversamente proporcional à temperatura ambiente. A viabilidade dessas formas de vida livre é influenciada principalmente pelas condições microclimáticas (especialmente umidade relativa) do local onde o carrapato ingurgitado se encontra para dar seqüência ao ciclo. Não há estudos que evidenciem com clareza a duração de cada geração do *R. sanguineus* em condições naturais no Brasil.

O cão doméstico é o único hospedeiro primário conhecido para os três estágios parasitários (larva, ninfa e adultos) de *R. sanguineus*, para os quais, não desenvolve imunidade efetiva (SZABÓ et al., 1995), refletindo uma perfeita adaptação parasito-hospedeiro. Este fato demonstra que um único cão pode servir por tempo indeterminado como hospedeiro adequado para todos os estágios parasitários do *R. sanguineus*, e que a presença de um ou mais cães é um fator condicional ao estabelecimento de uma população de *R. sanguineus* num

determinado local. As principais áreas do corpo dos cães que o *R. sanguineus* parasita são a cabeça, pescoço, dorso, orelhas e espaços interdigitais.

O *R. sanguineus* é um carrapato de hábitos nidícola (do latim *nidi*=ninho; *cola*=que permanece). Portanto, é um carrapato que passa as fases de vida livre nas habitações ou locais de repouso de seu hospedeiro. Em se tratando dos cães, estes locais de repouso ou habitações podem ser, entre outros, a própria casa do cão, um cômodo de uma residência, um canto de um quintal. Desta forma, todas as fases de desenvolvimento em vida livre do carrapato (ecdises, postura e incubação dos ovos) se passam em frestas ou buracos presentes nas paredes ou teto destes locais onde o cão vive. É interessante observar que ao final de um repasto sangüíneo, os carrapatos nidícolas tendem a se desprender do hospedeiro quando este último se encontra no interior do abrigo, a fim de garantir o ciclo nidícola naquele ambiente, de forma que o estágio subsequente do carrapato não tenha dificuldade de encontrar o hospedeiro para dar seqüência ao ciclo (LABRUNA., 2004)

Os estágios ingurgitados de *R. sanguineus*, apresentam geotropismo negativo após se desprenderem do hospedeiro, propiciando para que as fases de ecdise, postura e incubação dos ovos se passem acima do nível do solo onde o cão vive (LABRUNA; PEREIRA, 2001). Tal comportamento é extremamente diferente de outras espécies de carrapatos do Brasil (ex. *Amblyomma cajennense*, *Boophilus microplus*, *Dermacentor nitens*), cujas formas ingurgitadas apresentam geotropismo positivo após se desprenderem de seus hospedeiros. O comportamento geotrópico negativo exercido pelos estágios ingurgitados de *R. sanguineus* são extremamente importantes no sentido de favorecer para que uma população de carrapatos colonize residências contíguas em uma determinada área, pois propicia para que os carrapatos atravessem barreiras físicas verticais, tais como muros e paredes.

II. 2. A imunidade a carrapatos e a transmissão de doenças infecciosas

Hospedeiros apresentam uma imunidade variável frente a espécies diversas de carrapatos. A imunidade pode ser manifestada da segunda infestação em diante, ou seja, após uma sensibilização prévia. Por exemplo, cobaias desenvolvem intensa resistência a *R. sanguineus* (CHABAUD, 1950), embora o hospedeiro natural, o cão,

não expresse resistência destacável, mesmo após diversas infestações (SZABÓ et al., 1995). O grau de resistência adquirida em cada hospedeiro é avaliado através de parâmetros biológicos dos carrapatos alimentados em hospedeiros em infestações sucessivas (SZABÓ et al., 1995). De forma geral os hospedeiros naturais não expressam uma resistência apreciável a carrapatos e mecanismos ecológicos são responsáveis pelo controle dos mesmos na natureza. Uma observação relevante é a capacidade superior de transmissão de agentes infecciosos em hospedeiros susceptíveis, não resistentes, associada a uma eficiente imunomodulação local, regional e sistêmica dos mecanismos reativos do hospedeiro pela saliva do carrapato (BROSSARD; WIKEL, 2004).

II. 3. Controle de carrapato através de vacinas

Como carrapatos podem atingir infestações de intensidade insuportável, principalmente em animais domésticos, vários métodos são empregados no seu controle. Entre estes, os mais utilizados são os acaricidas aplicados em animais ou no ambiente. Estes, entretanto, deixam resíduos nos produtos de origem animal, podem intoxicar e de forma mais grave, perdem sua eficácia por seleção de cepas resistentes de parasitos (GRAF et al., 2004). Ao mesmo tempo o desenvolvimento de novos acaricidas demanda muito tempo e é caro, reforçando a necessidade de novas alternativas para controle das infestações de carrapatos (GINSBERG., 2001) Entre as possibilidades de controle de carrapatos, uma das mais promissoras é o uso de vacinas baseadas em antígenos do(s) carrapato(s) alvo (DE LA FUENTE et al., 2004).

Com exceção de algumas doenças como a febre amarela, vacinas contra doenças transmitidas por artrópodes não estão disponíveis. De maneira geral, o controle destas doenças é feita através do controle do vetor e tratamento dos indivíduos doentes. Esta forma de lidar com o problema, entretanto, deriva no aumento da resistência dos vetores a inseticidas e dos patógenos às drogas utilizadas no tratamento (DE LA FUENTE; KOCAN, 2003; Kocan et al., 2003; WILLADSEN, 2004; KISHORE et al., 2006; SPERANÇA; CAPURRO, 2007).

Recentemente foi descrito o subolesin, um antígeno do carrapato *Ixodes scapularis* e demonstrou-se tanto por RNA de interferência (RNAi) como por testes de imunização com a proteína recombinante, diversos efeitos contra o carrapato como, proteção contra infestação, redução da sobrevivência e reprodução, degeneração do intestino, glândula salivar, tecidos da reprodutivos e embriões e diminuição dos níveis de infecção do vetor por *Anaplasma marginale* e *A. phagocytophilum* (ALMAZÁN et al., 2005a, 2005b; DE LA FUENTE et al., 2006a, 2006c; NIJHOF et al., 2007; KOCAN et al., 2007). Demonstrou-se também ser o subolesin do carrapato uma proteína intracelular e conservada nos ixodídeos e insetos (DE LA FUENTE et al., 2006a). Embora a função biológica do subolesin permaneça desconhecida, ela poderia estar envolvida na regulação da expressão gênica e modulação da alimentação, reprodução e desenvolvimento do carrapato (CANALES et al., 2009).

A caracterização de antígenos protetores conservados e comuns a diversos artrópodes vetores, como o subolesin, sugerem a possibilidade de seu uso no controle de múltiplas espécies de vetores. Estes antígenos representam, portanto, um primeiro passo para o desenvolvimento de vacinas universais para o controle da infestação de vetores e dos patógenos por estes transmitidos. (de la Fuente et al., 2006)

O presente trabalho relata a avaliação de uma vacina contra o carrapato do cão, *R. sanguineus*, baseada no ortólogo da sublesin, identificada em mosquitos e cuja capacidade protetora foi caracterizada em experimentos de RNAi e/ou métodos imunológicos em carrapatos e flebotomíneos (Canales et al., 2009). Esta avaliação fez parte de um projeto multi-institucional de desenvolvimento e teste da vacina contra outras espécies de carrapatos (*Ixodes scapularis* e *Amblyomma americanum*) e flebotomíneos (*P. perniciosus*) envolvendo três instituições da Espanha (Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, Centro Nacional de Microbiología, do Instituto de Salud Carlos e Departamento de Patología Animal da Facultad de Veterinaria), o México (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia da Universidad Autónoma de Tamaulipas), Estados Unidos (Department of Veterinary Pathobiology, Center for Veterinary Health Sciences, Oklahoma State University) e Brasil (Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia)

III. OBJETIVOS

1. Determinar o efeito de vacina com proteína recombinante de ortólogo de subolesin de mosquitos sobre carrapato *R. sanguineus* em cães domésticos.
2. Determinar o efeito de vacina com proteína recombinante de ortólogo de subolesin de mosquitos sobre aspectos imunopatológicos da reação de cães contra carrapatos *R. sanguineus*, através da reatividade cutânea com a inoculação de extrato de carrapato na extremidade do pavilhão auricular (Teste cutâneo de hipersensibilidade), nas diferenças da reação local do hospedeiro ao carrapato (histopatologia), e na resposta imune humoral (Teste ELISA).

IV. MATERIAL E MÉTODO

IV. 1. Carrapato

Para o experimento utilizou-se larvas, ninfas e adultos do carrapato *R. sanguineus* da colônia do Laboratório de Ixodologia da FAMEV-UFU. Os exemplares iniciais desta colônia foram recolhidos de cães da cidade de Uberlândia-MG. Para a manutenção da colônia dos carrapatos, os diversos instares do ácaro (larva, ninfa e adulto) foram alimentados em coelhos (Figura 1).

Para a alimentação dos carrapatos estes ficam restritos aos hospedeiros por câmaras de plástico transparente (Szabó et al., 1995) coladas com material atóxico ao seu dorso depilado. E a ecdise dos instares ingurgitados, ovipostura das fêmeas, bem como para sua simples manutenção, os ácaros são mantidos em estufa B.O.D. (Figura 1) com ausência de fotoperíodo, temperatura constante de 27-28°C e umidade em torno de 85%.



Figura 1. Manutenção da colônia de *R. sanguineus* em laboratório. **1A** - Coelho com câmara de alimentação. **1B** - A estufa B.O.D.

IV. 2 Hospedeiro experimental

Foram utilizados 12 cães, 8 sem raça definida e 4 Red heeler, machos e fêmeas, com cinco a seis meses de idade, vacinados (três doses de octupla e uma de raiva) e vermifugados antes dos experimentos. Ração comercial e água foram fornecidos 'ad libitum'. Na fase pré-experimental e experimental os cães foram mantidos no canil experimental do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia ou em casas particulares (figura 2).



Figura 2. Manutenção dos hospedeiros experimentais. **2A** – Canil experimental do Hospital Veterinário. **2B** - Residência particular e cão em experimento.

IV. 3. Antígeno vacinal

Para os experimentos utilizou-se ortólogo recombinante de sublesin da larva de mosquito *Aedes albopictus* e expresso em *Pichia pastoris*. A vacina foi produzida conforme detalhado por CANALES et al., (2009).

IV. 4. Protocolo de vacinação com a proteína recombinante

Cães do grupo teste (n=6) foram vacinados com doses de 1 ml contendo 100µg de antígeno recombinante e adjuvante (montanide ISA 50 V2 - Seppic, Paris, França). Os cães do grupo controle (n=6) foram vacinados com a mesma dose e o mesmo adjuvante, mas com solução salina substituindo o antígeno. Cada animal foi inoculado duas vezes por via subcutânea com intervalo de um mês entre as

aplicações. As vacinas e respectivos controles foram enviados em frascos codificados para o Laboratório de Ixodologia da Universidade Federal de Uberlândia sendo, portanto os experimentos realizados às cegas (Figura 3). Para vacinação os animais foram contidos manualmente, o local da aplicação sofreu assepsia com álcool iodado e os produtos (antígeno ou salina) inoculados com seringas estéreis e descartáveis.

As vacinações e infestações foram realizadas em duas etapas, na primeira com quatro animais controle e três testes e na segunda com dois animais controle e três testes.



Figura 3. Frascos codificados contendo vacina ou solução controle.

IV. 5. Infestações experimentais

As infestações experimentais serviram para observar um possível efeito da vacina sobre parâmetros biológicos dos carrapatos. As infestações experimentais foram realizadas 30 dias após a segunda dose das vacinas. Para as infestações foram utilizadas 250 larvas, 50 ninfas e 55 adultos (25 fêmeas e 30 machos). Os carrapatos foram restritos aos animais por câmaras de alimentação coladas ao dorso depilado dos animais (Figura 4) conforme descrito por Szabó et al., (1995). As formas imaturas (larvas e ninfas) foram liberadas em uma câmara e os adultos em outra. Os cães foram tranquilizados para montagem das câmaras com acepromazina 0,2%, na dose de 0,1 ml por kg, de peso vivo, via intramuscular e tricotomizados na região do tórax e abdômen. Os carrapatos foram liberados 24 horas após a

montagem das câmaras com intervalo de tempo necessário para que a cola secasse. Após a infestação as câmaras foram observadas diariamente e os carrapatos alimentados (ingurgitados) que se desprenderam recolhidos. Os carrapatos adultos eram então pesados e acondicionados individualmente em frascos transparentes identificados e com aeração. Larvas e ninfas foram pesadas e acondicionados nos frascos em grupos diários.

Os frascos com carrapatos eram mantidos em dessecador em estufa BOD conforme descrito anteriormente para a colônia e os seguintes parâmetros biológicos observados: pesos das fêmeas ingurgitadas (PFI), da ninfa ingurgitada (PN) e da massa de ovos (PMO); período de ingurgitamento (pING), período pré postura (pPP) e incubação (pINC); taxa de recuperação de ninfas (TRN), taxa de recuperação de larvas (TRL), taxa de eclodibilidade (%ECLO), taxa de ecdise de ninfas (TEN), taxa de ecdise de larvas (TEL) e índice de eficiência de conversão da reserva alimentar em ovos (IECO). Considerando:

pING: número de dias decorridos desde a liberação dos carrapatos sobre o hospedeiro até o seu desprendimento, ingurgitada ou semi- ingurgitados.

pPP: número de dias decorridos desde o desprendimento da fêmea até o início da ovipostura.

pINC: número de dias decorridos desde o início da oviposição até o início da eclosão das larvas.

%ECLO: porcentagem de eclosão de larvas avaliadas visualmente por 3 avaliadores.

IECO = $\frac{PMO \times 100}{PFI}$

PFI



Figura 4. Câmaras de alimentação e infestação experimental dos cães. **4A**- Câmaras de alimentação. **4B** – Seringas adaptadas para liberação das formas imaturas dos carrapatos para as câmaras de alimentação. **4C** - Adultos, ninfas e larvas de *R. sanguineus*. **4D** - Cão com câmara de alimentação e colar elizabetano. **4E e 4F** - Câmaras com infestação de cães com carrapato.

IV. 6. Alterações microscópicas no ponto de fixação dos carrapatos em animais teste e controle

A análise histológica no ponto de fixação dos carrapatos foi realizada para verificar possíveis alterações na reação dos hospedeiros vacinados contra o carrapato adulto e esta ilustrada na Figura 5. As amostras de pele parasitada foram coletadas ao final das infestações no ponto de fixação das últimas fêmeas em ingurgitamento. Os cães foram tranquilizados com acepromazina na dose de 0,1 ml por kg de peso vivo, intramuscular, e no local da biópsia foi realizado anestesia local com lidocaína.

A carrapata fixada foi seccionada na altura das peças bucais para evitar o desprendimento voluntário e depois foi realizada biópsia através da excisão da pele (epiderme, derme e hipoderme) do hospedeiro com auxílio de um saca bocado ("punch").

Os fragmentos de pele foram colocados em formol tamponado (ph-7,0) durante 24 horas e depois transferidos para solução de álcool a 70%, fixados e processados de acordo com técnicas histológicas de rotina. Estes fragmentos foram então seccionados para obtenção de cortes seriados de 4µm de espessura. As lâminas obtidas foram coradas com duas técnicas de coloração: hematoxilina-eosina e may-grunwald & giemsa; o primeira, para observar aspectos gerais da reação ao carrapato, e a segunda para evidenciar células inflamatórias, especialmente basófilos e mastócitos. A avaliação das seções foi qualitativa e semi-quantitativa baseada em escores seguindo a seguinte escala: - (ausência/negativo); + (pouco/intensidade baixa); ++ (número moderado/intensidade média); +++ (número elevado/intenso).

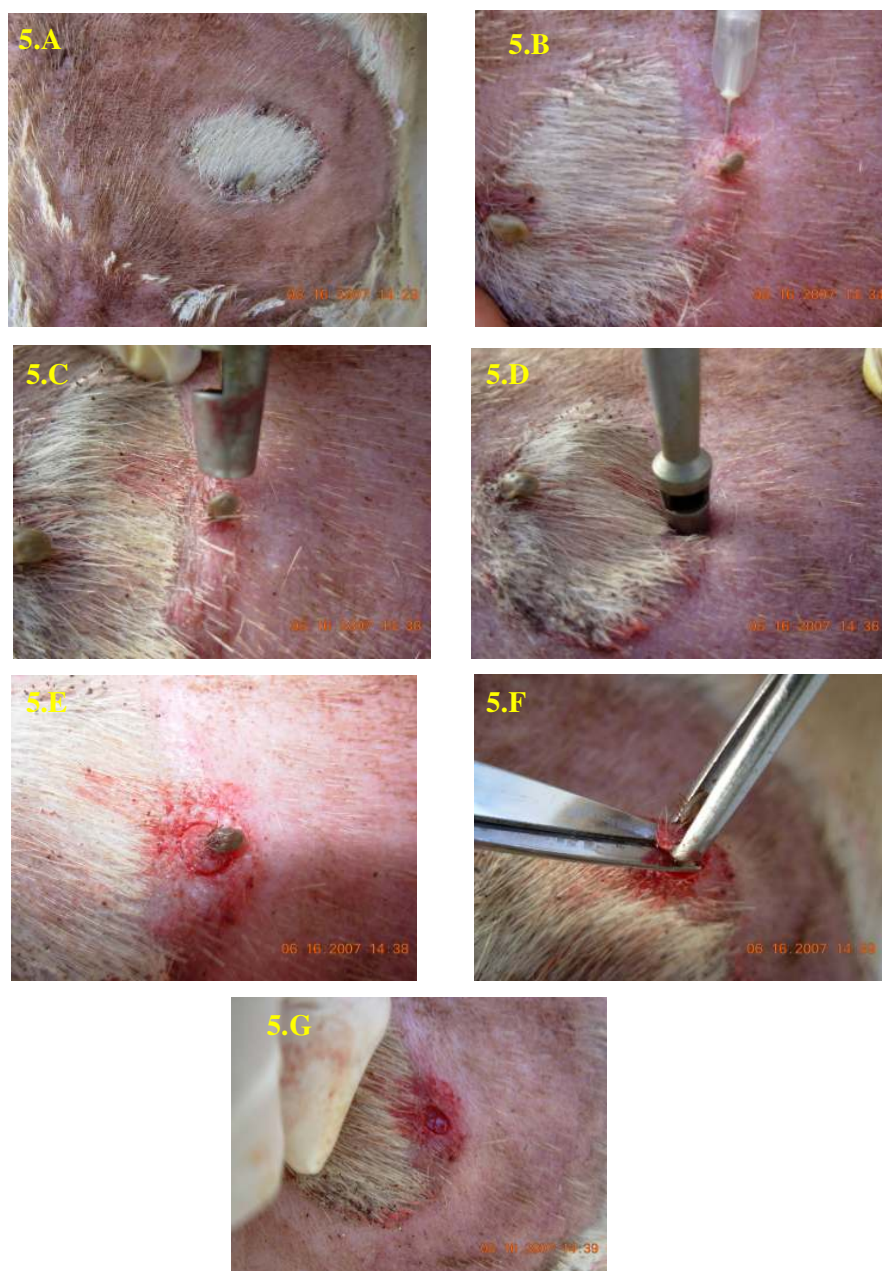


Figura 5. Etapas da biópsia realizada com saca bocado em cães para obtenção de amostra de pele parasitada pelo carrapato *R. sanguineus*. **5A** – área parasitada após retirada da câmara de alimentação; **5B** – Aplicação do anestésico local; **5C e 5D**. incisão de pele com “punch”. **E**. incisão de pele. **F**. retirada do fragmento de pele. **5G** – Ferida cirúrgica remanescente

IV .7. Teste cutâneo de hipersensibilidade

Teste cutâneo de hipersensibilidade foi realizado para verificar se a vacina alteraria a resposta imune do cão ao carrapato *R. sanguineus*. Este teste permite uma análise quantitativa através da mensuração do grau de distensão tecidual, e qualitativa pelo surgimento temporal de um aumento de espessura. De uma forma mais específica, o padrão reativo pode fornecer indícios de maior ou menor envolvimento da imunidade humoral histaminóide (hipersensibilidade imediata), ou de anergia no processo (SZABÓ et al., 1995b). O teste cutâneo foi realizado utilizando como antígeno, o extrato de carrapato preparado de adultos não alimentados do carrapato *R. sanguineus*.

IV .7. 1 . Extrato de Carrapato

Extrato de carrapatos adultos não alimentados do carrapato *R. sanguineus* foram mortos por congelamento em nitrogênio líquido e triturados em salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, refrigerada, pH 7,2, em um grau e pistilo de porcelana mantidos em cama de gelo picado. A suspensão resultante, de aproximadamente 10%(p/v), foi então ultra sonicada a 20 Mhz em três ciclos de 10 segundos cada e um de 60 segundos em um aparelho de ultra-som (Branson Sonifier 250). Em seguida o extrato foi centrifugado a 12000 g por uma hora a 4°C, o sedimento descartado e o sobrenadante resultante filtrado através de filtros millex-GV (Millipore) de 0,22µm de porosidade. Foram obtidos, com este método 10 ml de extrato de carrapato adulto não alimentado. A concentração protéica, presente, presente no extrato, determinada de acordo com o método de Lowry et al. (1951), foi de 2,5mg/ml. Esse extrato foi armazenado a -20 °C até o seu uso.

IV .7.2. Teste cutâneo de Hipersensibilidade

Para o teste cutâneo de hipersensibilidade, a extremidade do pavilhão auricular dos cães foram tricotomizados na face dorsal e ventral com muito cuidado para evitar ferimentos acidentais. Em seguida, desengordurou-se a orelha dos

animais com álcool e foi marcado na face interna e correspondente externa, uma circunferência de 1 cm de diâmetro. Neste local inoculou-se, intradermicamente, 0,1 ml de extrato de carrapato, contendo 25µg de proteína solúvel diluído em salina tamponada por fosfatos (PBS). O mesmo volume, apenas de PBS, foi injetado na orelha direita para controle das reações inespecíficas induzidas pelo ato da injeção. A avaliação da reação foi realizada medindo-se a espessura da orelha 10 minutos, 1 hora, 2h, 6h, 24hs, 48hs, 72hs e 96 hs após a inoculação com um espessímetro de papel (Mitutoyo, Kawasaki, Japan).

Os resultados deste teste foram expressos em porcentagem de aumento da espessura do pavilhão auricular esquerdo (teste) em relação a espessura inicial (pré inoculação). O valor do aumento percentual do pavilhão direito foi descontado do esquerdo para se subtrair a reação inespecífica induzida pelo ato da inoculação e a distensão dos tecidos pelo volume de líquido inoculado. O teste cutâneo foi realizado uma semana após o término da infestação pelos carrapatos.



Figura 6. Teste cutâneo de hipersensibilidade. **6A e 6B** cães com área a ser inoculada na orelha demarcada. **6C** Inoculação de extrato. **D.** mensuração da espessura da orelha com espessímetro.

IV. 8. Avaliação da resposta imune humoral de cães ao antígeno vacinal.

A avaliação da resposta imune humoral foi realizada com soro dos cães vacinados e controle através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Para tal soro dos cães foi obtido no dia da primeira vacina (dia 0) e quinze dias após a segunda dose (dia 45) Após padronização do ensaio o teste ELISA foi realizado da seguinte forma: placas de ELISA com 96 orifícios (NUCI[®]) foram sensibilizadas com o antígeno, previamente diluído 80µg em tampão carbonato (100 µl por orifício) e incubadas overnight a 4°C, permitindo a ligação do antígeno a microplaca. No dia seguinte, foi removido a solução de antígeno e a placa lavada três vezes com tampão de lavagem (PBS-T20), em volume de 100 µl por orifício. Para o bloqueio da placa foi utilizado um PBS-T20 e leite em pó Molico[®] na concentração de 5% durante uma

hora a 37 °C, a solução foi lavada três vezes com PBS-T20. Acrescentou-se os soros dos cães 1:800, diluídos em tampão de bloqueio, em volumes de 100 µl/orifício. Foi Incubado por uma hora a 37 °C, removido a diluição dos soros e lavou três vezes com líquido de lavagem. Remove-se o anticorpo anticão (KPL 1:2500 conjugado com enzima peroxidase). Acrescentou 100 µl por orifício de uma solução de OPD (ortofenilenodiamina) preparada em tampão citrato- fosfato acrescentado de 0,001% de H₂O₂. Incubou por 15 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl por orifício de uma solução de H₂SO₄ 2M. Os resultados foram obtidos com base na leitura da densidade ótica (D.O.) espectrofotômetro com filtro de 492 nm.

IV. 9. Análise Estatística

Os dados dos parâmetros biológicos dos carrapatos alimentados em animais vacinados e controle foram comparados pelo teste T não pareado e diferenças foram consideradas significativas se $P \leq 0,05$. O mesmo teste foi utilizado para comparar os aumentos de espessura no teste cutâneo de hipersensibilidade dos dois grupos de cães. Neste caso as comparações foram realizadas apenas entre os mesmos tempos pós-inoculação dos animais teste e controle.

V. RESULTADOS

V. 1. Parâmetros biológicos dos carrapatos alimentados em animais vacinados ou controle

Os dados biológicos dos carrapatos alimentados em cães estão apresentados nas Tabelas 1 a 3 e Figuras de 8 a 10. Os parâmetros biológicos das larvas, ninfas e adultos dos carrapatos não diferiram significativamente quando alimentados em cães vacinados com sublesin ou em cães controle. Apesar de não significativa, foi digna de nota a recuperação menor de ninfas e larvas dos cães teste.

Tabela 1. Parâmetros biológicos de fêmeas do *R. sanguineus* alimentadas em cães do grupo vacinado com subolisin e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.

Dados biológicos	Vacinado (n=6) Média ± SD	Controle (n=6) Média ± SD
Recuperação (%)	70.0 ± 27.2	69.3 ± 36.5
Peso de ingurgitamento (mg)	141.9 ± 11.8	138.9 ± 10.6
Peso da massa de ovos (mg)	52.2 ± 37.1	59.7 ± 24.6
Período de ingurgitamento (dias)	7.1 ± 0.3	6.9 ± 0.5
Período de pré-ovipostura (dias)	5.9 ± 1.4	5.5 ± 2.0
Período mínimo de incubação dos ovos(dias)	19.0 ± 3.3	21.0 ± 1.9
Eclosão dos ovos (%)	70.1 ± 23.1	69.4 ± 16.2

Tabela 2. Parâmetros biológicos de ninfas do *R. sanguineus* alimentadas em cães do grupo vacinado com subolisin e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.

Dados biológicos	Vacinado (n=6) Média ± SD	Controle (n=6) Média ± SD
Recuperação (%)	50.7 ± 14.6	61.3 ± 40.0
Peso de ingurgitamento (mg)	4.0 ± 0.4	3.8 ± 0.3
Período de alimentação (dias)	5.2 ± 0.7	4.8 ± 0.6
Período mínimo de ecdise (dias)	13.8 ± 1.8	13.6 ± 2.3
Ecdise (%)	88.7 ± 15.9	91.8 ± 7.8

Tabela 3. Parâmetros biológicos de larvas do *R. sanguineus* alimentadas em cães do grupo vacinado com subolisin e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.

.Parâmetros Biológicos	Vacinado (n=6) Media ± SD	Controle (n=6) Média ± SD
Recuperação (%)	23.6 ± 14.1	40.3 ± 30.5
Peso de ingurgitamento (mg)	0.28 ± 0.08	0.29 ± 0.11
Período de ingurgitamento (dias)	4.5 ± 0.3	4.6 ± 0.5
Período mínimo de ecdise (dias)	9.8 ± 1.1	10.6 ± 1.6
Ecdise (%)	90.7 ± 10.5	77.0 ± 31.6

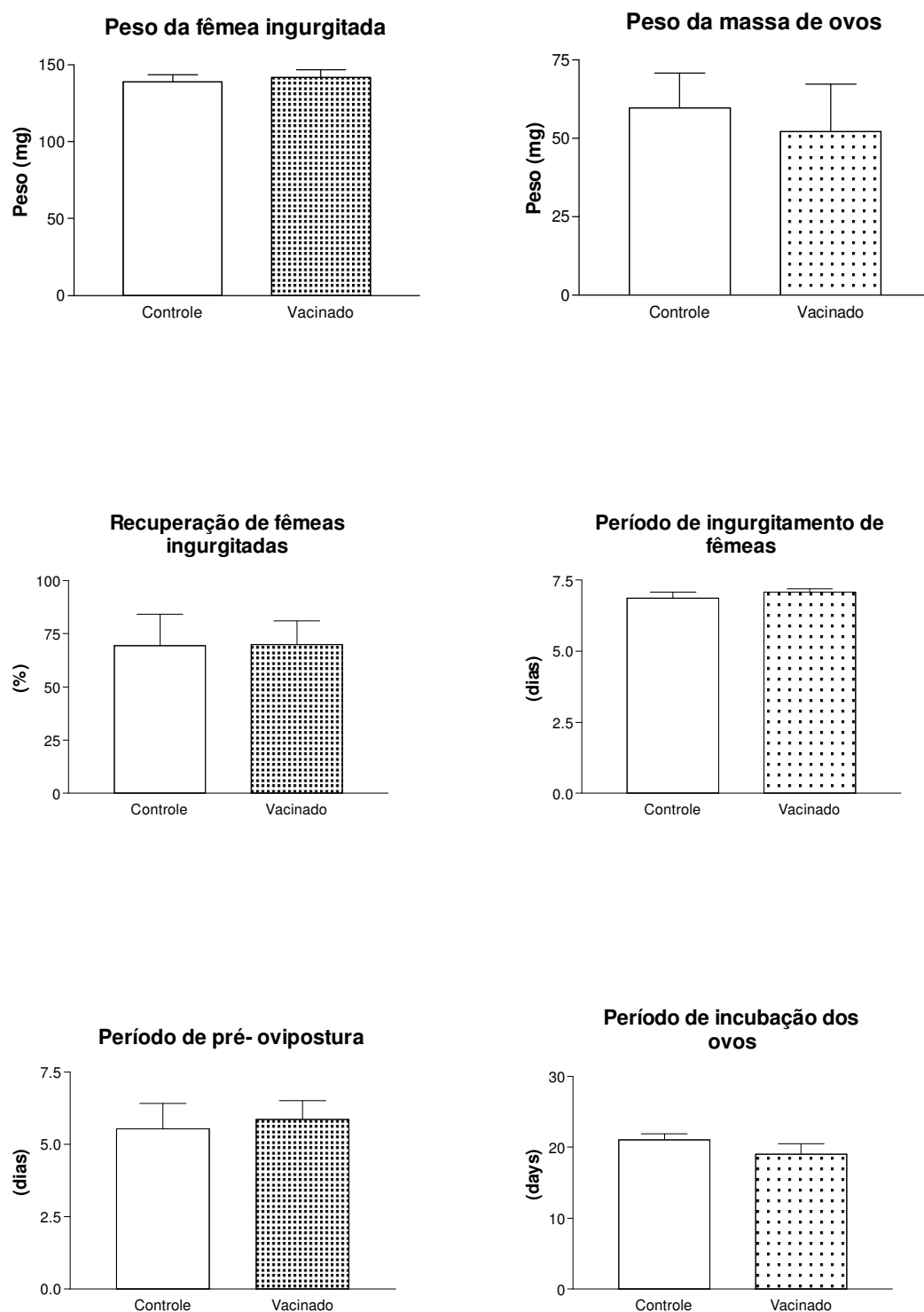


Figura 7. Parâmetros biológicos de fêmeas alimentadas em cães vacinados com subolesin (Vacinado) e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.

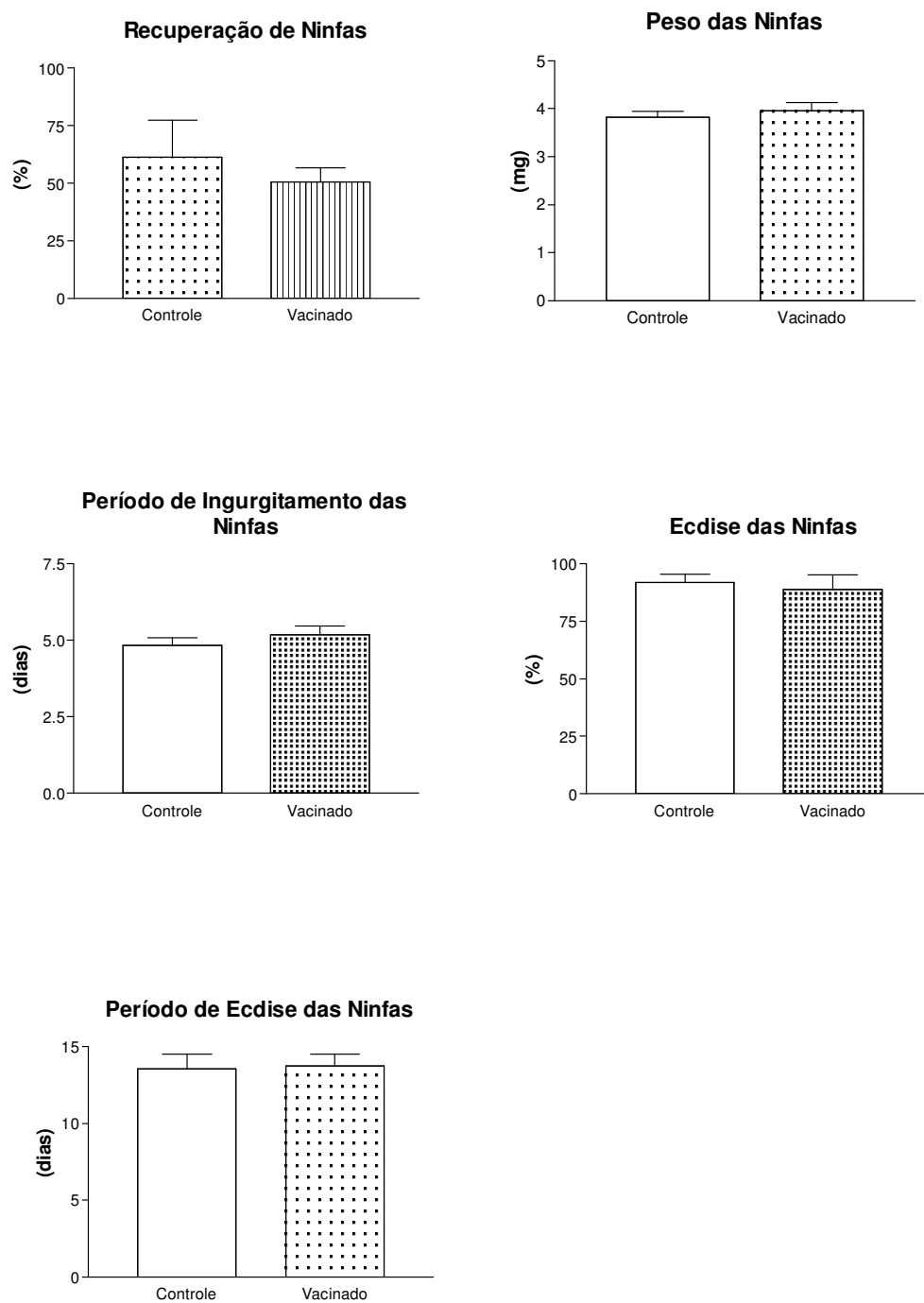


FIGURA 8. Parâmetros biológicos de ninfas alimentadas em cães vacinados com subolesin (Vacinado) e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.

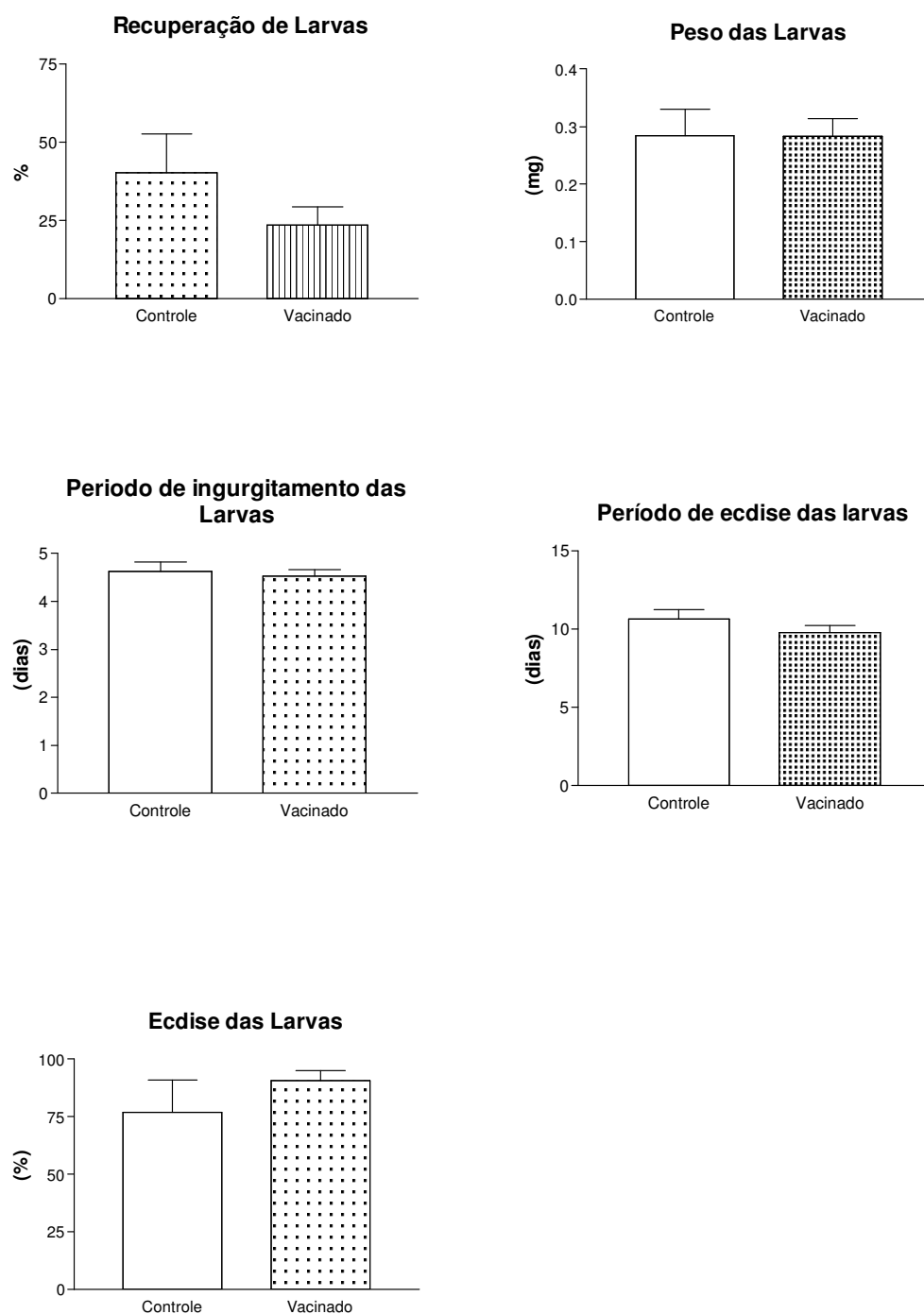


FIGURA 9. Parâmetros biológicos de larvas alimentadas em cães vacinados com subolesin (Vacinado) e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.

V.2. Alterações microscópicas no ponto de fixação dos carrapatos em animais teste e controle

Os resultados destas observações estão apresentados nas Tabelas 4 e 5. Não foi possível analisar amostras de todos os cães, pois em alguns a coloração ou os cortes obtidos não foram adequados. Observaram-se em ambos os grupos solução de continuidade da epiderme no local de alimentação do carrapato, presença do cone de cemento (massa homogênea eosinofílica sobre o epitélio do hospedeiro, produzido pelo carrapato para melhor fixação à pele), níveis variados de hiperplasia e espongiose epidérmicas e apoptose ocasional de queratinócitos. Na derme foram observados em graus variados edema, áreas de necrose liquefativa justapostas ao local de fixação do artrópode, hemorragia e infiltrado de células inflamatórias (Tabela 4 e figura 11). No infiltrado inflamatório observou-se predominantemente neutrófilos (tabela 5), mas também algumas células mononucleares e raros eosinófilos. Mastócitos foram observados freqüentemente, porém em sua maioria na periferia das lesões. De forma geral, as diferenças nas alterações histológicas na pele de cães vacinados e controle foram pequenas. Observou-se, entretanto, hemorragia, edema, necrose e infiltrado celular mais intensos nos cães controle.



FIGURA 10. Fotomicrografia de pele de cão vacinado, parasitada pelo carrapato *R. sanguineus* adulta. Solução de continuidade epidérmica (seta) sob o cone de cimento do carrapato (cc), infiltrado leucocitário dérmico, hemorragia (círculo). Hematoxilina eosina, objetiva 10x.

Tabela 4. Alterações microscópicas da epiderme e derme no local de fixação de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* em cães vacinados com subolesin e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.

Cães									
Vacinado					Controle				
Aspectos gerais	3	7	10	11	4	5	6	8	9
Hiperplasia	++	+	+	+	++	++	++	+	+
Espongiose	+	+	+	+	+	+	+	++	+
Exocitose	-	-	+	-	+	-	+	+	+
Necrose	+	+	+	+	++	++	++	+	+
Hemorragia	+	+	+	+	+++	++	+++	+	+
Edema	++	+	+	+	++	++	++	++	+
Infiltrado	++	++	++	++	+++	+++	+++	+	++

Tabela 5. Infiltrado celular inflamatório no local de fixação de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* em cães vacinados com subolesin e cães controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.

Cães							
Vacinado					Controle		
Células	3	7	10	11	4	6	9
Neutrófilo	++	++	+++	++	+++	+++	++
Mastócito	++	+	+	+	+	+	+
Mononucleares	+	+	++	+	+	+	+
Eosinófilo	-	-	+	-	-	+	-
Basófilo	-	-	-	-	-	-	-

V.3. Teste cutâneo de hipersensibilidade

Os resultados do teste cutâneo de hipersensibilidade estão apresentados na Tabela 6 e Figura 12. O teste cutâneo não foi realizado em um animal controle porque o animal precisou ser deslocado para outra cidade. Os animais do grupo vacinado apresentaram aumento imediato da espessura da orelha (10 minutos após inoculação) induzido pelo extrato de carrapato. (Os animais controle apresentaram uma reação moderada aos 10 minutos e 48 horas após inoculação. As reações do grupo vacinado e controle diferiram significativamente com 6 e 96 horas após inoculação ($P < 0.05$).

Tabela 6. Aumento na espessura do pavilhão auricular de cães induzido pelo extrato de *R. sanguineus* em cães vacinados com subolisin ou controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.

Aumento da espessura na orelha (%)		
Tempo pós inoculação	Vacinado (n=6) Média ± SD	Controle (n=5) Média ± SD
10 min	43.7 ± 38.1	10.2 ± 9.4
1h	32.5 ± 27.4	5.0 ± 7.1
6h	32.5 ± 33.8	2.2 ± 4.9
24h	41.5 ± 37.6	6.5 ± 6.2
48h	29.0 ± 22.9	9.2 ± 9.2
72h	28.6 ± 22.1	7.2 ± 8.3
96h	36.5 ± 26.9	3.6 ± 3.1

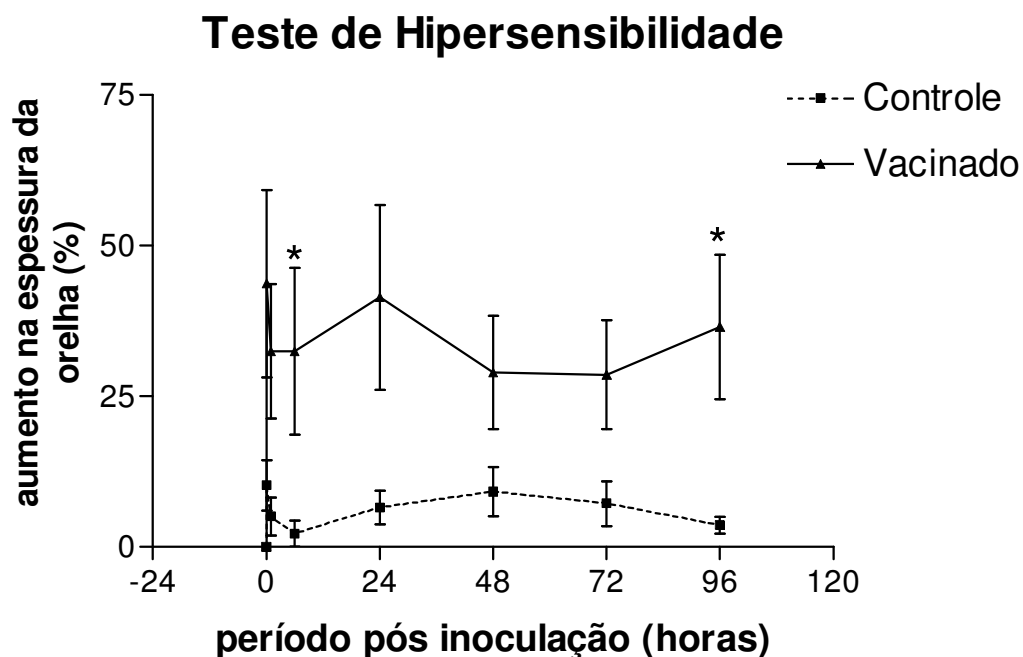


Figura 11. Aumento na espessura do pavilhão auricular de cães induzido pelo extrato de *R. sanguineus* em cães vacinados com subolesin ou controle, Uberlândia, Minas Gerais, 2007

V.4. Avaliação da resposta imune humoral de cães ao antígeno vacinal

A titulação de anticorpos anti-subolesin de cães vacinados e controle por teste ELISA está apresentado na Figura 13. Os dados de três cães foram eliminados por inconsistência dos dados por possível erro de identificação dos tubos. Observou-se, apenas nos animais vacinados, um aumento no título de anticorpos reagentes contra subolesin após as duas inoculações.

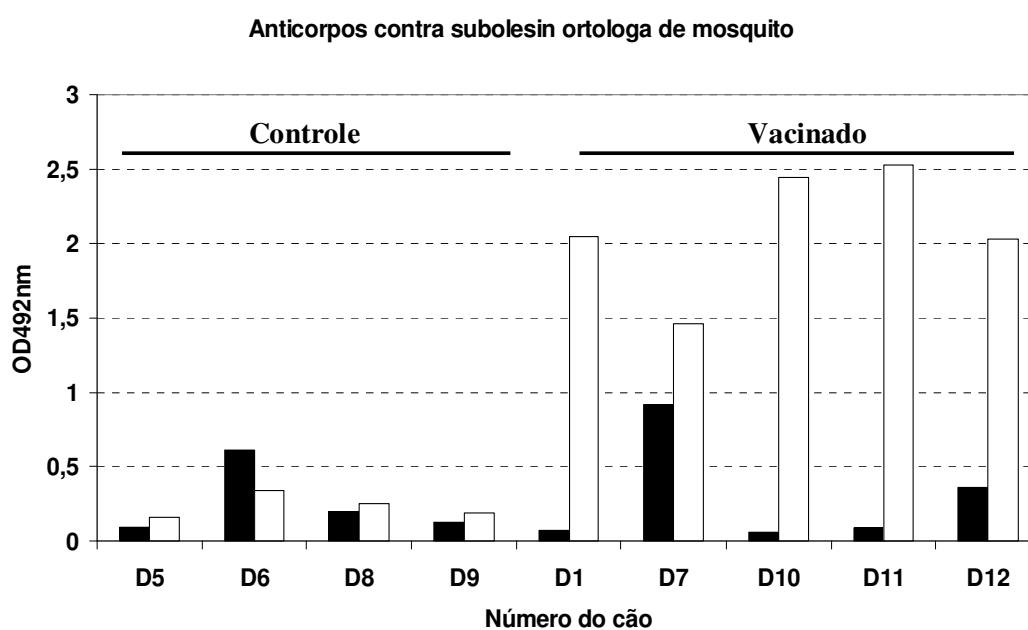


Figura 12. Anticorpos de cães contra subolesin de mosquito nos grupos vacinado e vacinado antes da inoculação da vacina (retângulos negros) e 45 dias após a vacinação (retângulos brancos), Uberlândia- MG, 2007

V.5. Observações Clínicas

Observou-se em três animais teste e três animais controle abscessos no local da inoculação da vacina ou adjuvante.



Figura 13. Abscessos no local de inoculação da vacina nos cães.

VI. DISCUSSÃO

Na comparação dos dois grupos experimentais observou-se que a vacina interferiu no sistema imunológico do cão. Os resultados encontrados, entretanto, não demonstraram diferenças significativas no desempenho dos carrapatos alimentados em animais vacinados e controle. Por outro lado, percebeu-se, embora sem significância estatística, uma recuperação de ninfas e larvas maior no grupo controle do que no teste. Estes resultados indicam que na forma atual a vacina não é eficaz, mas que, provavelmente, aumentando o número de animais no experimento e/ou aumentando a dose protéica da vacina um efeito significativo poderá ser obtido contra as formas imaturas do carrapato. Resultado desta magnitude não teria aplicação imediata, mas seria muito significativo. Isto porque o cão não desenvolve uma resistência efetiva contra o *R. sanguineus*, mesmo após múltiplas infestações (SZABÓ et al., 1995a) indicando uma capacidade eficiente de lidar com as reações imune, inflamatória e hemostática do seu hospedeiro. Também merece menção que até o momento nenhum outro antígeno de eficácia, mesmo que parcial, contra o *R. sanguineus* foi apresentado na literatura. Por último deve-se ressaltar que se trata de antígeno ortólogo e não aquele do carrapato.

Considerando o contexto acima mencionado, o desenvolvimento de abscessos no local da aplicação é ainda uma preocupação remota. Entretanto, havendo o desenvolvimento de uma vacina comercial o adjuvante terá que ser modificado, pois estas reações seriam inaceitáveis para um produto comercial.

As observações histológicas não indicaram diferenças extremas entre o grupo vacinado e o grupo teste. De forma geral as reações observadas em ambos os grupos foram semelhantes àquelas já descritas para esta relação hospedeiro-parasita e caracterizadas por alterações dérmicas e epidérmicas inespecíficas e um infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico (THEIS; BUDWISER, 1974; SZABÓ; BECHARA, 1999). Como já foi citado, cães não desenvolvem resistência a esta espécie de carrapato e, portanto, a infiltração celular intensa na pele deste hospedeiro, mesmo modulada por uma reação imune, não representa uma reação

eficaz. Neutrófilos são considerados células primariamente fagocitárias, mas possuem capacidade limitada de secreção elementos imunomoduladores (LLOYD; OPPENHEIM, 1992; CASSATELLA, 1995). Entretanto, apesar da semelhança das alterações observadas no ponto de fixação do carrapato em animais controle e vacinados, merece menção a presença de alterações inespecíficas no ponto de fixação do carrapato mais intensas particularmente da hemorragia, necrose e edema em animais controle. Embora o significado destas alterações seja especulativo poderiam indicar uma reação mais vantajosa para o carrapato pois estes em área com maior hemorragia e necrose (tecido liquefeito) poderiam teriam seu repasto sanguíneo facilitado.

Os testes cutâneos de hipersensibilidade (TCH) são amplamente utilizados na identificação de alérgenos específicos em indivíduos atópicos ou alérgicos. Nestas situações estão envolvidas, principalmente, reações de hipersensibilidade do tipo I ou anafilático e a tardia ou tipo IV (SZABÓ, 1995c). Porém em outras situações estes testes cutâneos podem sugerir o mecanismo potencial de reação do hospedeiro ao carrapato. O termo potencial é importante, pois na relação habitual de parasitismo a saliva do ácaro interfere nesta reação.

Neste experimento o TCH foi realizado para verificar a predominância, ausência ou presença de reação imediata ou tardia aos antígenos do carrapato de animais vacinados e controle. A distensão dos tecidos neste contexto permitiu uma análise das reações de cada hospedeiro a antígenos dos carrapatos sem interferência da saliva deste ácaro. Avalia-se na TCH, a distensão tecidual associada ao processo inflamatório induzido pelo extrato. Compõem tal distensão tecidual, o edema resultante de aumento local de permeabilidade dos vasos de microcirculação e o acúmulo de células inflamatórias como consequência do fenômeno de quimiotaxia.

O teste cutâneo permite uma análise quantitativa através da mensuração do grau de distensão tecidual, e qualitativa pelo surgimento temporário do aumento temporário da espessura da pele. De uma forma mais específica, o padrão reativo pode fornecer indícios de maior ou menor envolvimento da imunidade humoral histaminóide (hipersensibilidade imediata) e da imunidade celular (hipersensibilidade tardia), ou de anergia no processo. Os resultados anteriores (SZABÓ, et al 1995b)

mostraram que os cães sensibilizados por infestações manifestam uma reação imediata intensa, mas não uma tardia aos antígenos de carrapato. Reação esta não manifesta durante o parasitismo. Neste trabalho foi observado que os animais controle apresentaram reações reduzidas ao extrato enquanto animais vacinados apresentaram reações mais intensas e significativas com 6 e 96 horas pós estímulo. A reação reduzida nos animais controle possivelmente ocorreu a menor concentração (metade) de antígenos usada no teste em relação aquela do trabalho de Szabó (1995b). Esta atitude foi tomada para permitir a visualização melhor das diferenças entre animais vacinados e controle. Uma reação de hipersensibilidade imediata intensa poderia se sobrepor e mascarar reações mais tardias e menos intensas.

De fato observou-se uma reação imediata mais intensa nos cães vacinados, reação esta que se prolongou por todo o período de observação. Novamente o significado desta reação dos animais vacinados é desconhecido, mas indica que a vacina com um antígeno ortólogo foi capaz de induzir uma alteração na resposta imune de cães contra antígenos do carrapato *R. sanguineus*. Esta observação reforça a tese de que seria interessante repetir este teste com doses protéicas maiores ou com número maior de vacinações.

O teste imunoenzimático (ELISA) foi usado neste projeto para avaliar a soroconversão dos animais vacinados e assim confirmar o reconhecimento específico dos vacinais pelos cães do grupo teste em oposição aos do grupo controle. Observou-se nestes ensaios um aumento no título de anticorpos reagentes contra subolisin após as duas inoculações nos animais vacinados mas não nos animais controle. Estes resultados podem mostrar que a subolisin foi especificamente reconhecido pelo sistema imunológico do cão.

No contexto geral de avaliação deste projeto desprende-se que a vacina da forma apresentada está longe de um produto comercial. Porém considerando íntima relação do carrapato alvo, o *R. sanguineus* com seu hospedeiro, o cão, e a eficácia dos mecanismos de evasão deste parasito frente aos processos reativos do hospedeiro, os resultados são promissores pois foi detectada uma interferência na resposta imune do cão. Neste ponto é importante ressaltar que até o momento apenas duas vacinas comerciais anti-artrópodes foram lançadas no mundo, ambas

contra o carrapato do boi, o *Boophilus microplus* e ambas baseadas no mesmo antígeno (DE LA FUENTE et al., 2007). Estas vacinas, entretanto, não foram um sucesso comercial principalmente pela dificuldade e limitações em sua utilização, muito embora sejam um marco científico e estabelecimento de conceito na pesquisa de vacinas. Da mesma a vacina testada neste projeto é um marco científico pela utilização de antígenos ortólogos e testes anteriores com RNAi. O trabalho nesta linha deve continuar para obtenção de um produto de boa eficácia. As regiões afetadas pela leishmaniose e carrapatos em cães certamente de beneficiarão de tal produto.

VII. CONCLUSÃO

Conclui-se que a vacina recombinante e ortologo de subolesin em cães não induz resistência ao carrapato *R. sanguineus* na dose e apresentação testada mas modifica os aspectos imunopatológicos (TCH, Teste ELISA e Histopatológico) do hospedeiro aos antígenos do carrapato.

REFERÊNCIAS

- ALMAZÁN, C.; KOCAN, K. M.; BERGMAN, D.K.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; DE LA FUENTE, J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. **Vaccine**, Amsterdam, v. 21, p.1492-1501, 2003.
- ALMAZÁN, C.; BLAS-MACHADO, U.; KOCAN, K. M.; YOSHIOKA, J. H.; BLOUIN, E. F.; Mangold, A.J. Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. **Vaccine**, Amsterdam, v. 23, p. 4403- 4416, 2005.
- ALMAZÁN, C.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; DE LA FUENTE, J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. **Vaccine**, Amsterdam, v. 23, p. 5294-5298, 2005.
- ANDREOTTI, R. Performance of two BM86 Antigen vaccine formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v.15, n. 3, p. 97-100, 2006.
- ARAGAO, H.B., FONSECA, F. Notas de ixodologia. IX. O complexo *Amblyomma*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 59, p. 131-148, 1961.
- ARAGAO, H.B., Ixodidas Brasileiros e de alguns Países Limítrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 31, p.759-1846, 1936.
- ARAGAO, H. B., Notas sobre ixodidas brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 145-195, 1911.
- BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick Immunobiology. **Parasitology**, Cambridge, v.129, p. 136-176, 2004.

CANALES, M., NARANJO, V., ALMAZÁN, C., MOLINA, R., TSURUTA, S.A., SZABÓ, M.P.J., MANZABO-ROMAN, R., LASTRA, J. M. P., KOGAN, K. M., JIMENEZ, M. I., LUCIENTES, J. VILLAR, M., DE LA FUENTE, J. Conservation and immunogenicity of the mosquito ortholog of the tick-protective antigen, subolesin. **Parasitol. Res.** Feb. 21, 2009.

CASSATELA, M. A. The Production of Cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today**, London, v. 16, n. 1, p. 21-26, 1995.

CORRÊA, O. Carrapatos determinados no Rio Grande do Sul. Biologia, Patologia e Controle. **Instituto Pesquisa Veterinário Desidério Finamor**, Eldorado do Sul, v. 1, p. 35-50, 1955.

CHABAUD, A. G. L'Infestation par des ixodines provoque-t-elle une immunité chez L'hôte (2nd note). **Annales de Parasitologie**, Paris, v. 25, p.475-479, 1950.

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R.T. BOTELHO, J.R.; GENARO, M.M.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Switzerland, v.128. p. 149-155, 2005.

DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; BLAS-MACHADO, U.; NARANJO, V.; MANGOLD, A. J.; BLOUIN, E. F.; GORTAZAR, C.; KOGAN, K. M. The tick protective antigen, 4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick blood ingestion and reproduction. **Vaccine**, Amsterdam, v. 24, p. 4082-4095, 2006.

DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; BLOUIN, E. F.; NARANJO, V.; KOCAN, K.M. Reduction of tick infections with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* by targeting the tick protective antigen subolesin. **Parasitology Research**, Berlin; v.100, p. 85-91, 2006.

GRISI, L. Prováveis prejuízos causados pelo carrapato. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.21. p.125, 2002.

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**, Cambridge , v.129, p.S427-442. 2004.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, Cambridge, v.129, p.3-14, 2004.

KEMP, D. H.; STONE, B. F.; BINNINGTON, K. C. Tick attachment and feeding. Role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response. In: OBENCHAIN, F. D.; GALUN, R. Ed. **Physiology of ticks**. Oxford, 1982. p. 1-82.

KISHORE, K.; KUMAR, V.; KESARI, S.; KUMAR, A. J.; DAS, P.; BHATTACHARYA, S. K., Vector control in leishmaniasis. **Indian Journal of Medicine Research**, Nova Deli, v.3, p.467-472, 2006.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J; GUGLIELMONE, A.A.; MELÉNDEZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, Pennsylvania, v.16, p.698-712, 2003.

KOCAN, K.M.; MANZANO-ROMAN, R.; DE LA FUENTE, J. Transovarial silencing of the subolesin gene in three-host ixodid tick species after injection of replete females with subolesin dsRNA. **Parasitology Research**, Berlim, v.100: p.1411-1415, 2007.

LEMOS, E. R. S.;MACHADO, D. R.;PIRES,F. D. A.; MACHADO, S. L.; COSTA, L.M.C.; COURA, J.R. Rickettsiae- infected ticks in endemic area of spotted fever in the state of Minas Gerais, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 4, p. 477-481, 1997.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDGE, J. W.; BOUYER, D. H.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D.H. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick

Amblyomma longirostre in Brazil. **Journal Medicine Entomology**, Lanham, v. 41, n. 5, p. 533-537, 2004.

LABRUNA, M. B. Biologica-Ecologia De *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **In. Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 8.; Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses**, Ouro Preto. Anais... Ouro Preto, 2004.

LEONARD, J. A.; WAYNE, R. K.; WHEELER, J.; VALADEZ, R.; GUILLEN, S.; VILA, C. Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. **Science**. Leon, V.298, p. 1613-1616, 2002.

LABRUNA, M. B.; CAMPOS PEREIRA, M. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**. São Paulo, v.30. p. 24-32, 2001.

LLOYD, A. R.; OPPENHEIM, J. J. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune responses. **Immunology Today**, London, v. 13, n. 5, p. 169-72, 1992.

LOWRY, O. H. ; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L. A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v.9, p.265-75, 1951.

NIJHOF, A. M.; TAOUFIK, A.; DE LA FUENTE J.; KOCAN K. M.; DE VRIES E.; JONGEJAN F. Gene silencing of the tick protective antigens, *Bm86*, *Bm91* and *subolesin*, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, 2007; 37: 653-662.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Inoculation sur des milieux de culture spécifiques. Biologie moléculaire. Detection & Isolement (1). **Clinical Infect Disease**, Chicago, v. 32: p. 897-928, 2001.

PIESMAN, J. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal Ixodes. In 2004

RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O. & VARGAS, C.R.B. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria (1997), 27: 285-289.

SPERANÇA, M. A.; CAPURRO, M. L. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2007; 102: 425-433.

SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on a natural (dog) and an unnatural host (guinea pig). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 23, n. 11, p. 915-928, 1999.

SZABÓ, M. P. J.; MORELLI Jr. J.; BECHARA, G. H. Cutaneous hypersensitivity induced in natural (dog) and laboratory hosts (guinea pig) by extracts of the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.19, p. 723-730, 1995b.

SZABÓ, M. P. J.; CUNHA, T. M.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental and applied acarology**, Amsterdam, v. 25, n.10-11,p. 909-916, 2001.

SZABÓ, M. J. P.; MUKAI, L. S.; ROSA, P. C.; BECHARA, G.H. Differences in the acquired resistance of dogs, and guinea pigs to repeated infestations with adult ticks of *Rhipicephalus sanguineus* (acari: Ixodidae). **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v.32, n. 1, p. 13-50, 1995.

THEIS, R. J.; BUDWISER, P. D. *Rhipicephalus sanguineus* from the dog. **Journal of the American Veterinary Association**, Schaumburg, v. 153, n.4, p. 433-7, 1968.

TSUDA, A.; MULENGA, A.; SUGIMOTO, C.; NAKAJIMA, M.; OHASHI, K.; ONUMA, M. cDNA cloning, characterization and vaccine effect analysis of *Haemaphysalis longicornis* tick saliva proteins. **Vaccine**, Amsterdam ; v.19, p. 4287– 4296, 2001.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, Cambridge, v. 129, p. S367-S874, 2004