

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Izabela Cosso Tavares Ribeiro

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES FORMULAÇÕES VACINAIS
CONTENDO ANTÍGENOS SALIVARES E INTESTINAIS CONTRA O
CARRAPATO *AMBLYOMMA SCULPTUM***

Belo Horizonte

2025

Izabela Cosso Tavares Ribeiro

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES FORMULAÇÕES VACINAIS
CONTENDO ANTÍGENOS SALIVARES E INTESTINAIS CONTRA O
CARRAPATO *AMBLIOMMA SCULPTUM***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título Doutorado em Parasitologia.

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Adalberto Alves Pereira-Filho

Belo Horizonte

2025

043

Ribeiro, Izabela Cosso Tavares.

Avaliação da eficácia de diferentes formulações vacinais contendo antígenos salivares e intestinais contra o carrapato *Amblyomma sculptum* [manuscrito] / Izabela Cosso Tavares Ribeiro. – 2025.

103 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo. Coorientador: Prof. Dr. Adalberto Alves Pereira-Filho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Amblyomma*. 3. Vacinas. 4. Saponinas de Quilaia. 5. Hidróxido de Alumínio. 6. Controle de Ácaros e Carrapatos. 7. Proteínas Recombinantes de Fusão. I. Araújo, Ricardo Nascimento. II. Pereira-Filho, Adalberto Alves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

TÍTULO DA TESE:

**"AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES FORMULAÇÕES VACINAIS
CONTENDO ANTÍGENOS SALIVARES E INTESTINAIS CONTRA O CARRAPATO
AMBLIOMMA SCULPTUM"**

ALUNA: IZABELA COSSO TAVARES RIBEIRO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENTOMOLOGIA

TESE 378/2025/12

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte e nove de agosto de 2025**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

Aparecida Sadae Tanaka

Membro externo - UNIFESP

Itabajara da Silva Vaz Junior

Membro externo - UFRGS

Gabriel Cerqueira Alves Costa

Membro externo - UNIFESP

Rodolfo Cordeiro Giunchetti

Membro interno - UFMG

Adalberto Alves Pereira Filho

Coorientador - UFMG

Ricardo Nascimento Araújo

Orientador - UFMG

Belo Horizonte, 29 de agosto de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Nascimento Araujo, Professor do Magistério Superior**, em 01/09/2025, às 14:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adalberto Alves Pereira Filho, Professor Magistério Superior-Substituto**, em 08/09/2025, às 19:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Cerqueira Alves Costa, Usuário Externo**, em 09/09/2025, às 14:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Coordenador(a)**, em 09/09/2025, às 15:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Itabajara da Silva Vaz Junior, Usuário Externo**, em 12/11/2025, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aparecida Sadae Tanaka, Usuária Externa**, em 13/11/2025, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4465481** e o código CRC **11D64537**.

Dedico esse trabalho aos meus 2 anjinhos que perdi durante o doutorado. Obrigada por me escolherem como casa no tempo que vocês precisaram!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e aos sagrados Orixás por sempre me guiarem, me protegerem e iluminarem os meus caminhos para a realização dos meus sonhos.

Ao meu orientador, professor doutor Ricardo Nascimento Araújo, que por 10 anos me ensinou, me orientou, teve muita paciência comigo e acreditou no meu potencial. Grande parte da profissional que sou hoje é graças a você, então muito obrigada!

Ao meu marido Gustavo, que sempre esteve ao meu lado me incentivando e acreditando em mim. Obrigada por ser meu porto seguro!

Aos meus pais, Angela e Marcelo, por absolutamente tudo. Não existem palavras para descrever o quanto eu sou grata a vocês. Se eu estou aqui hoje, sendo a primeira da família a fazer uma pós-graduação em uma universidade de prestígio, é graças a vocês. Vocês são meu maior exemplo e meu maior orgulho!

À minha irmã Manuela, por todo amor, compreensão e descontração. Aos meus filhos de 4 patas Sadam e Juno pelo amor imensurável.

Ao meu avô Alcindo que sempre me transmitiu muita sabedoria e instigou a minha curiosidade sobre diversos assuntos. Às minhas duas estrelinhas mais brilhantes do céu, vovó Dalva (*in memorian*) e vovó Leni (*in memorian*) que eu tenho certeza que estão vibrando muito lá de cima.

Aos meus padrinhos Adriana e Paulo, e a todos os meus tios, primos e familiares que sempre acompanharam a minha trajetória acadêmica e sempre torceram muito por mim.

Aos meus amigos, que sorte eu tenho de ter vários que estão comigo sempre torcendo por mim. Dos bem antigos aos mais novos, só agradeço por sempre me darem força e acompanharem essa trajetória de perto! Vocês sabem quem são vocês.

Aos amigos e colegas de trabalho que já saíram e que ainda estão no Laboratório de Artrópodes Hematófagos, Jéssica, Gabriel, Naylene, Ana Carolina, Cristielen, Giovanna, Maycos, Maria Luiza e Hudson. Obrigada pela colaboração, pela disponibilidade, por toda ajuda e, principalmente, pela amizade. Vocês estão no meu coração.

Ao meu co-orientador Adalberto, por sempre estar disponível, me ajudar, me ensinar e render boas risadas.

À Márcia, por todo apoio que você sempre me ofereceu. Não somente o apoio técnico, mas por

sempre ter sido uma verdadeira mãezona para mim. Obrigada por esses 10 anos que tivemos trabalhando juntas! Sempre vou levar você no meu coração!

Aos colaboradores desse trabalho, professor Ricardo Fujiwara, professor Rodolfo Giunchetti, professor Ronaldo Nagem, professora Daniella Bartholomeu, Jordânia, Helen, Augusto, Matheus, Nathan e Vanessa.

Ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia e a todos os professores por todo ensinamento. Agradeço especialmente à Sumara e à Sibele, pela disponibilidade, ajuda e carinho que sempre tiveram com todos nós.

Aos animais utilizados, e às pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse feito.

Muito obrigada!

RESUMO

Amblyomma sculptum é o carrapato de maior importância médica no Brasil, principal vetor de *Rickettsia rickettsii*, causadora da febre maculosa brasileira, e responsável por prejuízos à pecuária. Seu controle baseia-se no uso de acaricidas sintéticos, que representam um investimento econômico considerável e potencial poluidor. Alternativas vacinais foram previamente testadas com quatro proteínas – rAsKunitz (Kn), rAs8.9kDa (8.9), rAsBasicTail (Bt) e rAsQuimera (Qui) - isoladamente ou em diferentes combinações associadas ao adjuvante (adj) Hidróxido de Alumínio em ensaios vacinais, atingindo até 99,9% de eficácia, afetando sobretudo na muda dos carrapatos e na redução da fertilidade das fêmeas. Este trabalho avaliou formulações contendo os antígenos Kn, 8.9, Bt e Qui com saponina como adjuvante e desenvolveu um novo antígeno quimérico baseado em proteínas salivares e intestinais. Os grupos experimentais foram: C1-PBS, C2-PBS+adj, V1-KnQui+adj, V2-BtQui+adj, V3-8.9Qui+adj, V4-Kn8.9Qui+adj e V5-Kn8.9BtQui+adj. Camundongos Swiss foram imunizados, coletou-se sangue em diferentes tempos e realizou-se desafio com larvas, ninfas e adultos. Todos os antígenos induziram resposta humoral com aumento significativo de IgG antígeno-específico ($p < 0,05$). A mortalidade total das larvas variou de 60,5% a 80%, sem diferença significativa entre vacinados e controles. Para ninfas, a mortalidade foi de 40% nos grupos C2 e V5, e 13,3% no grupo com menor taxa. A maioria das fêmeas apresentou 0% de mortalidade, exceto V1 e V5. A eficácia vacinal variou de 0% a 61%, sendo maior no grupo V5; C2, V2 e V4 não apresentaram eficácia. Para o novo antígeno, 175 peptídeos das regiões imunogênicas das proteínas K, 8.9, Bt e Qui foram sintetizados; 57 reagiram com soros de animais imunizados, e 22 foram selecionados para construir a rAsQuimeraII (570 aminoácidos, 57,3 kDa). Produzida em *Escherichia coli* BL21, foi testada em camundongos desafiados com ninfas de colônia e de campo (Itabirito, MG). A mortalidade das ninfas de campo foi de 52% e das de colônia, 36%, sugerindo maior efeito em carrapatos de campo. Contudo, a mortalidade não superou 60%, indicando que a rAsQuimeraII não alcançou o efeito desejado. Os resultados indicam que a saponina, como adjuvante, resultou em menor eficácia vacinal em comparação ao hidróxido de alumínio, e que a nova proteína, embora promissora em termos de resposta imune, não promoveu alta mortalidade dos estágios parasitários testados.

Palavras-chave: carrapato-estrela; vacinas; saponina; hidróxido de alumínio; controle de carrapatos; proteína quimérica.

ABSTRACT

Amblyomma sculptum is the most medically significant tick in Brazil. It is the primary vector of *Rickettsia rickettsii*, the causative agent of Brazilian spotted fever, and responsible for losses in livestock farming. Its control is based on the use of synthetic acaricides, which represent a considerable economic investment and potential for pollution. Previous vaccine trials have tested four proteins — rAsKunitz (Kn), rAs8.9kDa (8.9), rAsBasicTail (Bt), and rAsChimera (Qui) — alone or in various combinations with the adjuvant aluminum hydroxide. These trials achieved up to 99.9% efficacy, primarily by affecting tick molting and reducing female fertility. This study evaluated formulations containing the antigens Kn, 8.9, Bt, and Qui with saponin as an adjuvant and developed a new chimeric antigen based on salivary and intestinal proteins. The experimental groups were: C1-PBS, C2-PBS+adj, V1-KnQui+adj, V2-BtQui+adj, V3-8.9Qui+adj, V4-Kn8.9Qui+adj, and V5-Kn8.9BtQui+adj. Swiss mice were immunized, blood was collected at different times, and challenged with larvae, nymphs, and adults. All antigens induced a humoral response with a significant increase in antigen-specific IgG ($p < 0.05$). Total larval mortality ranged from 60.5% to 80%, with no significant difference between vaccinated and control groups. For nymphs, mortality was 40% in groups C2 and V5, and 13.3% in the group with the lowest rate. Most females showed 0% mortality, except for V1 and V5. Vaccine efficacy ranged from 0% to 61%, with higher efficacy observed in group V5. Groups C2, V2, and V4 showed no efficacy. A total of 175 peptides were synthesized from the immunogenic regions of proteins K, 8.9, Bt, and Qui to create the new antigen. Of these peptides, 57 reacted with sera from immunized animals, and 22 were selected to construct rAsQuimeraII (570 amino acids, 57.3 kDa). Produced in *Escherichia coli* BL21, it was tested in mice challenged with colony and field nymphs (Itabirito, MG). Mortality of field nymphs was 52%, and of colony nymphs, 36%, suggesting a greater effect on field ticks. However, mortality did not exceed 60%, indicating that rAsQuimeraII did not achieve the desired effect. These results suggest that the saponin adjuvant resulted in lower vaccine efficacy than aluminum hydroxide and that, although the new protein is promising in terms of the immune response, it did not promote high mortality of the tested parasitic stages.

Keywords: star tick; vaccines; saponin; aluminum hydroxide; tick control; chimeric protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios de desenvolvimento de <i>Amblyomma sculptum</i>	20
Figura 2: Ciclo Biológico de <i>Amblyomma sculptum</i>	21
Figura 3: Mapa do Brasil demonstrando a distribuição geográfica do complexo <i>Amblyomma cajennense</i> sensu lato no país.....	23
Figura 4: Propriedades características de adjuvantes vacinais.....	30
Quadro 1: Formulações vacinais contendo o adjuvante saponina.....	36
Figura 5: Esquema de imunização vacinal.....	38
Quadro 2: Grupos experimentais rAsQuimeraII.....	46
Figura 6: Avaliação das purificações das proteínas recombinantes utilizadas nas formulações vacinais.....	48
Figura 7: Camundongo tendo seu peso mensurado.....	49
Figura 8: Média de peso dos camundongos em D-2 e D40 dos ensaios vacinais.....	50
Figura 9: Avaliação percentual imunofenotípica de leucócitos dos camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	54
Figura 10: Avaliação da resposta antígeno-específica produzida a partir da vacinação de camundongos com as formulações vacinais.....	55
Figura 11: Tempo de alimentação e peso final de larvas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com as formulações vacinais.....	57
Figura 12: Tempo de alimentação e peso final de ninfas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com as formulações vacinais.....	59
Figura 13: Parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com os alvos vacinais.....	62
Figura 14: Histogramas e diagrama de Venn gerados de acordo com a reatividade de cada <i>spot</i> pelo software ImageJ utilizando a extensão “Protein Array Analyzer”.....	66

Figura 15: Sequência de aminoácidos da proteína AsQuimeraII.....	68
Figura 16: SDS-PAGE da proteína recombinante rAsQuimeraII após expressão em sistema heterólogo.....	69
Figura 17: SDS-PAGE e Western Blot da proteína recombinante rAsQuimeraII.....	69
Figura 18: Avaliação da resposta antígeno-específica produzida a partir da imunização de camundongos com as proteínas rAs8.9kDa e rAsQuimeraII.....	70
Figura 19: Tempo de alimentação e peso final de ninfas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com as proteínas rAs8.9kDa e rAsQuimeraII.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso molecular e ponto isoelétrico das proteínas maduras (sem peptídeo sinal) e suas recombinantes produzidas em <i>E. coli</i> BL21.....	37
Tabela 2: Função renal e hepática dos camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	51
Tabela 3: Parâmetros hematológicos dos camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	52
Tabela 4: Porcentagem da mortalidade de larvas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	56
Tabela 5: Porcentagem de muda de larvas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	57
Tabela 6: Porcentagem da mortalidade de larvas de <i>A. sculptum</i> ao longo de todo o desafio parasitário.....	58
Tabela 7: Porcentagem da mortalidade de ninfas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	59
Tabela 8: Porcentagem de muda de ninfas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	60
Tabela 9: Porcentagem da mortalidade de ninfas de <i>A. sculptum</i> ao longo de todo o desafio parasitário.....	60
Tabela 10: Porcentagem de recuperação de fêmeas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	61
Tabela 11: Valores para cálculo da eficácia vacinal baseado nos parâmetros obtidos nos desafios parasitários com os três estágios de desenvolvimento de <i>A. sculptum</i>	63
Tabela 12: Eficácia vacinal das formulações vacinais contra o carrapato <i>A. sculptum</i>	64
Tabela 13: Peptídeos imunogênicos selecionados a partir do <i>Immunoblotting</i>	67
Tabela 14: Porcentagem da mortalidade de ninfas de <i>A. sculptum</i> do laboratório e de campo alimentadas em camundongos imunizados com as proteínas rAs8.9kDa e rAsQuimeraII.....	71

Tabela 15: Porcentagem de muda de ninfas de <i>A. sculptum</i> de laboratório e de campo alimentadas em camundongos imunizados com rAs8.9kDa e rAsQuimeraII.....	72
Tabela 16: Porcentagem da mortalidade de ninfas de <i>A. sculptum</i> de laboratório e de campo ao longo de todo o desafio parasitário.....	73
Tabela 17: Eficácia vacinal das proteínas rAs8.9kDa e rAsQuimeraII contra ninfas de laboratório e ninfas de campo.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

adj – adjuvante

ALT – alanina aminotransferase

APC's – células apresentadoras de antígenos

AST – aspartato aminotransferase

BSA – *Bovine serum albumin* (albumina do soro bovino)

CD3/ 4/ 8/ 14/ 19 /21 – *Cluster of Differentiation* 3/ 4/ 8/ 14/ 19/ 21

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média

DCM – diclorometano

DMF – N,N-dimetilformamida

DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DP – desvio padrão

DTT – ditioneitol

EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid*

EGS – extrato de glândula salivar

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FE – fertilidade do ovo

fec – eclodibilidade, em porcentagem, de larvas de ovos postos por adultos ingurgitados recuperados do grupo controle

fev – eclodibilidade, em porcentagem, de larvas de ovos postos por adultos ingurgitados recuperados do grupo vacinado

FMB – Febre Maculosa Brasileira

HCM – hemoglobina corpuscular média

HGB – hemoglobina

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IgG – imunoglobulina G

IPTG – *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

LTC's – linfócitos T citotóxicos

OA – oviposição de fêmeas adultas

oac – peso médio da massa de ovos postos por fêmeas ingurgitadas recuperadas do grupo controle

oav – peso médio da massa de ovos postos por fêmeas ingurgitadas recuperadas do grupo vacinado

OD – densidade óptica

OPD – *o-phenylenediamine dihydrochloride*

PBS – *phosphate buffered saline* (tampão fosfato)

RA – recuperação de adultos ingurgitados

rac – adultos ingurgitados recuperados do grupo controle

rav – adultos ingurgitados recuperados do grupo vacinado

RL – efeito na recuperação de larvas ingurgitadas

rlc – larvas ingurgitadas recuperadas do grupo controle

rlv – larvas ingurgitadas recuperadas do grupo vacinado

RN – recuperação de ninfas ingurgitadas

rnc – ninfas ingurgitadas recuperadas do grupo controle

rnv – ninfas ingurgitadas recuperadas do grupo vacinado

SDS – sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TFA – ácido trifluoroacético

VCM – volume corpuscular médio

VL – viabilidade de larvas ingurgitadas

vlc – larvas ingurgitadas recuperadas que mudaram para ninfas do grupo controle

vlv – larvas ingurgitadas recuperadas que mudaram para ninfas do grupo vacinado

VN – viabilidade de ninfas ingurgitadas

vnc – ninfas ingurgitadas recuperadas que mudaram para adultos do grupo controle

vnv – ninfas ingurgitadas recuperadas que mudaram para adultos do grupo vacinado

LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES DE MEDIDA E VARIÁVEIS

% – porcentagem

± – mais ou menos

°C – graus celsius

d – dias

dL – decilitro

fL – fentolitro

g – aceleração da gravidade

kDa – kilodaltons

L – litros

M – molar

mg – miligramas

min – minutos

mL – mililitro

mM – milimolar

n – número amostral

nm – nanômetro

pg – picogramas

pH – potencial hidrogeniônico

pI – ponto isoelétrico

PM – peso molecular

rpm – rotações por minuto

V – volts

µg – microgramas

µL – microlitros

µm – micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	<i>Amblyomma sculptum</i>	20
1.1.1	Taxonomia e classificação.....	20
1.1.2	Ciclo biológico	20
1.1.3	Distribuição e epidemiologia.....	22
1.2	Importância médica e veterinária	24
1.3	Controle de carrapatos.....	24
1.4	Hematofagia e o sistema complemento.....	25
1.5	Vacinas contra carrapatos.....	27
1.6	Adjuvantes vacinais.....	29
1.6.1	Função dos adjuvantes	29
1.6.2	Mecanismo de ação	30
1.6.3	Classificação.....	31
1.6.4	O adjuvante ideal.....	32
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	Aspectos éticos	35
4.2	Manutenção da colônia de origem de <i>Amblyomma sculptum</i> em laboratório	35
4.3	Formulações vacinais	35
4.4	Produção <i>in vitro</i> das proteínas recombinantes.....	36
4.4.1	Transformação e expressão	36
4.4.2	Purificação das proteínas recombinantes	37
4.5	Avaliação da eficácia das formulações vacinais utilizando a saponina	38
4.5.1	Imunização dos grupos experimentais	38

4.5.2	Análise de inocuidade e resposta imune pós imunização.....	39
4.5.2.1	Análise comportamental e aspecto macroscópico do local da injeção.....	39
4.5.2.2	Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos	39
4.5.2.3	Avaliação do perfil fenotípico das populações de leucócitos.....	40
4.5.2.4	Avaliação da resposta humoral nos animais imunizados	41
4.5.3	Desafio parasitário e avaliação da eficácia vacinal	41
4.6	Construção de um novo antígeno vacinal com regiões imunogênicas de proteínas salivares e intestinais	42
4.6.1	Proteínas usadas para seleção de regiões imunogênicas a serem avaliadas	42
4.6.2	<i>Spot</i> síntese	42
4.6.3	<i>Immunoblotting</i>	43
4.6.4	Síntese da QuimeraII.....	45
4.6.5	Ensaio vacinal com a rAsQuimeraII e desafio parasitário	45
4.7	Análise estatística	46
5	RESULTADOS.....	48
5.1	Eficácia das formulações vacinais com a saponina.....	48
5.1.1	Expressão e purificação das proteínas recombinantes utilizadas nas formulações vacinais.....	48
5.1.2	Vacinação dos hospedeiros e avaliação da inocuidade das formulações vacinais	49
5.1.3	Parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais dos grupos experimentais	50
5.1.4	Imunofenotipagem <i>ex vivo</i> de leucócitos circulantes em camundongos	53
5.1.5	Produção de anticorpos antígeno-específicos no soro dos grupos experimentais imunizados	54
5.1.6	Parâmetros alimentares de larvas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados	56
5.1.7	Parâmetros alimentares de ninfas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados	58
5.1.8	Parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de <i>A. sculptum</i> alimentadas em camundongos imunizados	61
5.1.9	Eficácia vacinal das diferentes formulações vacinais	62
5.2	Construção e potencial vacinal da rAsQuimeraII.....	64
5.2.1	Identificação das regiões antigênicas das proteínas AsKunitz, As8.9kDa, AsBasicTail e AsQuimera	64
5.2.2	Produção e purificação da AsQuimeraII	68
5.2.3	Imunização vacinal com a rAsQuimeraII.....	69

6	DISCUSSÃO	75
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
	REFERÊNCIAS	88
	ANEXO I.....	98
	ANEXO II.....	99
	ANEXO III.....	100
	ANEXO IV	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Amblyomma sculptum*

1.1.1 Taxonomia e classificação

Carrapatos são artrópodes da classe Arachnida pertencentes à ordem Ixodida, que contém três famílias: Argasidae, conhecidos como carrapatos de corpo mole; Ixodidae, conhecidos como carrapatos de corpo duro; e Nuttalliellidae, representada somente pela espécie *Nuttalliella namaqua*. Esses artrópodes são considerados cosmopolitas e formam um grupo bem-sucedido de organismos hematófagos obrigatórios (KEIRANS; DURDEN, 2005).

A espécie *Amblyomma sculptum* (BERLESE, 1888), pertencente à família Ixodidae, foi denominada *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) durante muitos anos. Em 2014, estudos baseados em análises morfológicas e ferramentas moleculares mostraram que *A. cajennense* é um complexo de seis espécies distintas, sendo elas: *Amblyomma cajennense sensu stricto*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma interandinum*, *Amblyomma pattinoi* e *Amblyomma tonelliae*. Esse complexo é denominado *Amblyomma cajennense sensu lato* (BEATI et al., 2013; ESTRADA-PEÑA et al., 2014; NAVA et al., 2014).

1.1.2 Ciclo biológico

Amblyomma sculptum apresenta quatro estágios de desenvolvimento em seu ciclo biológico, sendo eles os ovos, larvas, ninfas e adultos macho e fêmea (Figura 1).

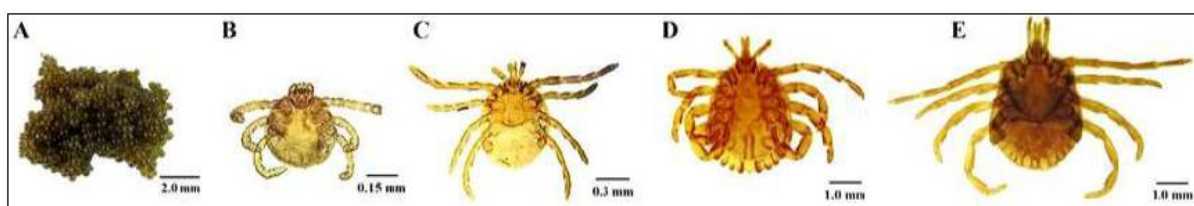


Figura 1: Estágios de desenvolvimento de *Amblyomma sculptum*: Ovos (A); larva (B); ninfa (C) e adultos: macho (D) e fêmea (E) (ARAÚJO; COSTA; BOTELHO, 2016).

Os adultos são vulgarmente chamados de “carrapato estrela” ou “rodoleiro” e suas formas mais jovens, larvas e ninfas, são conhecidas como “vermelhinho” e “micuim”, respectivamente. O ciclo de vida é trioxeno, necessitando de três hospedeiros para desenvolvimento completo (Figura 2), e tem o seu início quando a fêmea ingurgitada se desprende do animal e cai no solo para realizar a oviposição, que ocorre em um período de aproximadamente 20 dias. Uma fêmea ingurgitada ovipõe cerca de cinco a vinte mil ovos e a incubação dos ovos no solo dura aproximadamente 30 dias. As larvas eclodem e se fixam a um hospedeiro suscetível para iniciarem o ingurgitamento. Esse período dura de 3 a 6 dias e, quando ingurgitadas, caem ao solo e realizam a muda para o estágio de ninfa. As ninfas se fixam a outro hospedeiro para se alimentarem e, após um período de 5 a 7 dias, se desprendem e caem ao solo para realizar uma nova muda, agora para adultos, se diferenciando em macho e fêmea. No hospedeiro, macho e fêmea realizam a cópula e, após completarem o repasto sanguíneo, as fêmeas ingurgitadas caem ao solo após 7 a 10 dias, ovipõem e morrem (PEREIRA; LABRUNA, 1998).

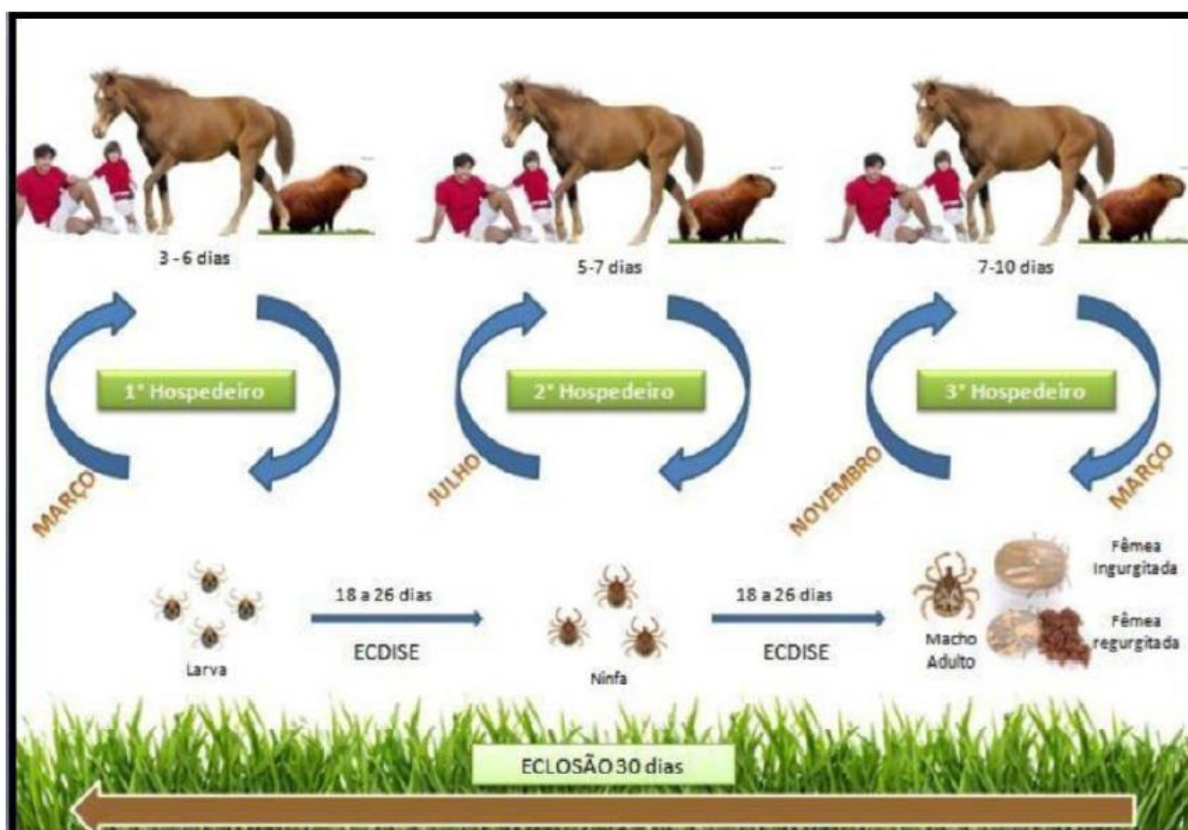


Figura 2: Ciclo Biológico de *Amblyomma sculptum* (ABREU, 2018).

O ciclo apresenta sazonalidade e necessita de um ano para o desenvolvimento de uma geração em condições naturais. Cada fase do ciclo de vida do carrapato-estrela ocorre com mais frequência em uma época específica do ano. Os adultos são mais frequentes nos meses mais quentes e úmidos (outubro a março). Já as larvas ocorrem no período seco e frio do ano (abril a setembro), sendo que o pico principal é de abril a julho. As ninfas são mais frequentes principalmente nos meses de junho a outubro (DE PAULA et al., 2022). Além disso, as larvas apresentam um comportamento denominado de diapausa comportamental, que corresponde ao tempo em que essas larvas permanecem no solo em "repouso" sem apresentarem comportamento de busca por hospedeiros aumentando, consequentemente, o período sem alimentação dos carrapatos (CABRERA, 2008; LABRUNA et al., 2003).

O carrapato-estrela tem os equinos como hospedeiros preferenciais dentre os animais domésticos e as antas (*Tapirus terrestris*) e as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) como hospedeiros preferenciais dentre os silvestres (LABRUNA et al., 2001). As formas imaturas também podem ser encontradas parasitando outros animais silvestres, aves, cães, suínos, bovinos, humanos e outros mamíferos, devido a sua baixa especificidade, porém, essas espécies são consideradas hospedeiros acidentais e apenas em situações muito raras foram observadas como mantenedoras do ciclo de *A. sculptum* no ambiente (LOPES et al., 1998; ROJAS; MARINI; COUTINHO, 1999).

1.1.3 Distribuição e epidemiologia

O complexo *A. cajennense* é encontrado na região Neotropical, tendo sido primeiramente descrito a partir de espécimes coletados na cidade de Caiena na Guiana Francesa, e pode ser encontrado a partir do sul dos EUA (estados do Texas e Flórida) ao norte da Argentina (BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006). No território brasileiro, Martins (2014) demonstrou a existência de duas espécies, sendo elas *A. cajennense* s. s., encontrada nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, e a espécie *A. sculptum*, a única do complexo descrita no sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo), sendo encontrada também no centro-oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Nordeste (Pernambuco e Piauí) e sul do estado do Paraná (NAVA et al., 2014) (Figura 3), associado ao clima tropical e presente em áreas de Pantanal, Mata Atlântica e Cerrado (MARTINS et al., 2016). *A. sculptum* têm sua

dispersão através de pequenos hospedeiros devido a sua larga distribuição horizontal em áreas de Cerrado (PAJUABA NETO et al., 2018).

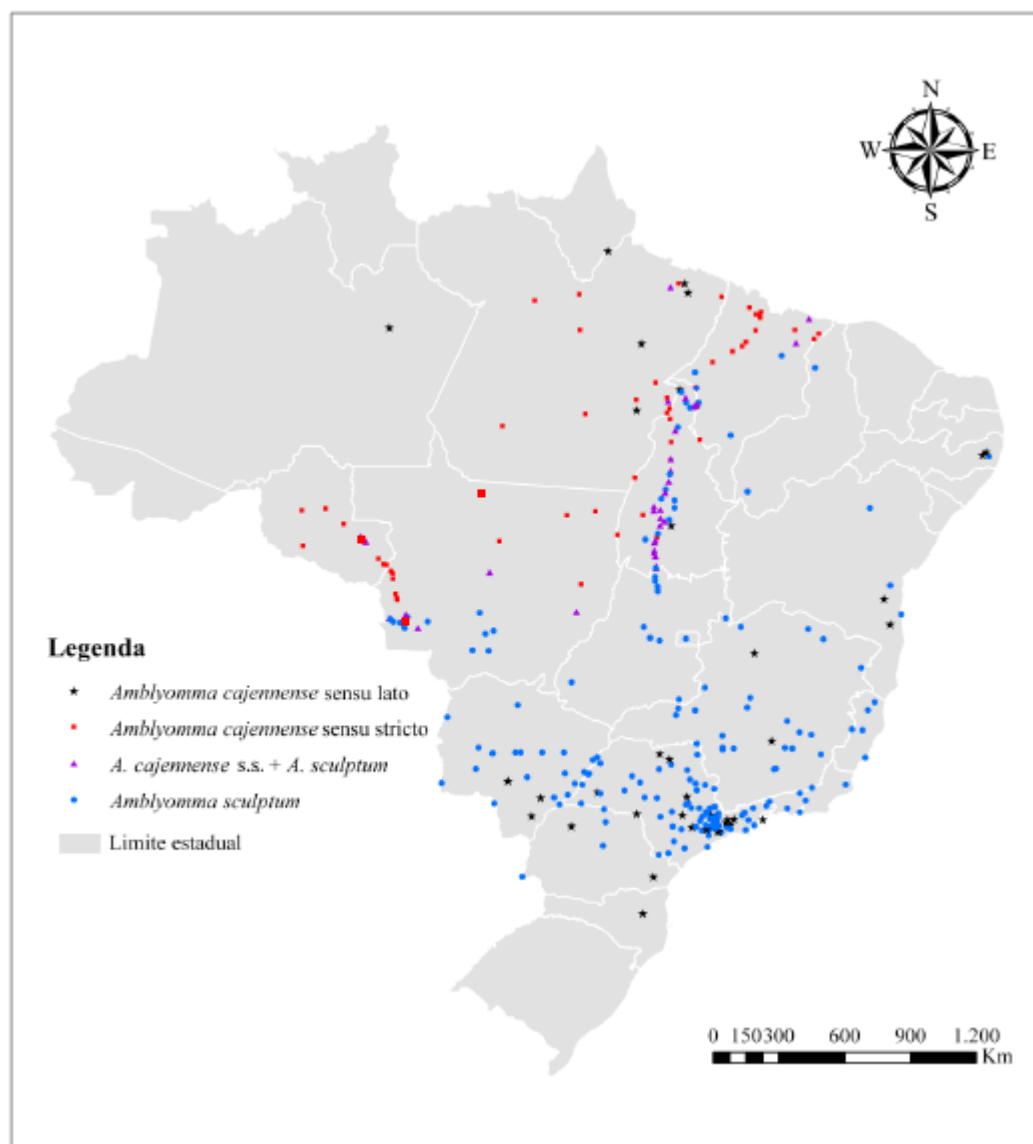


Figura 3: Mapa do Brasil demonstrando a distribuição geográfica do complexo *Amblyomma cajennense sensu lato* no país (MARTINS, 2014).

A alta prevalência de *A. sculptum* em áreas verdes e sombreadas de regiões urbanas e periurbanas faz com que essa espécie tenha uma grande associação com humanos. Essa alta prevalência se deve, principalmente, à disponibilidade de hospedeiros, como as capivaras, já que esses hospedeiros preferenciais são eficazes na manutenção do ciclo do carrapato (QUEIROGAS et al., 2012). O comportamento que mistura busca ativa, acesso ao hospedeiro

por “emboscada”, e a alta capacidade de deslocamento parecem ser as principais características da espécie que contribuem para o alto índice de parasitismo observado em pessoas (NATIVIDADE et al., 2021; RAMOS et al., 2017). Espécies como o *Amblyomma dubitatum*, por exemplo, que é um carrapato adaptado às capivaras, possui um valor consideravelmente menor no índice de parasitismo observado em pessoas (PAJUABA NETO et al., 2018; RAMOS et al., 2017).

1.2 Importância médica e veterinária

Amblyomma sculptum possui importância médica por ser a espécie de carrapato mais associada às infestações em humanos, principalmente ninfas, e por ser o principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira (FMB). Essa é a riquetsiose de maior ocorrência e gravidade no país, com mais de 3.500 casos confirmados e mais de 1.000 mortes entre 2007 e 2025 (BRASIL, 2025). Adicionalmente, o carrapato-estrela pode estar envolvido na transmissão de outras bactérias potencialmente patogênicas do gênero *Rickettsia*, tais como *R. amblyommatis*, *R. felis*, *R. bellii* e *R. parkeri*, (NASCIMENTO et al., 2016; BITENCOURTH et al., 2017; SEBASTIAN et al., 2017).

Esse carrapato também possui importância na medicina veterinária por causar prejuízos econômicos na pecuária devido à espoliação sanguínea que compromete a capacidade produtiva, desvaloriza o couro, predispõe a infecções secundárias e faz com que se tenham gastos com carrapaticidas que podem eventualmente contaminar a carne, o leite e o ambiente (SERRA-FREIRE, 1982a; SERRA-FREIRE, 1982b). Além disso, são potenciais vetores de patógenos como algumas espécies de borrelíias, bactérias do gênero *Rickettsia* e diferentes arbovírus (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

1.3 Controle de carrapatos

Atualmente, o principal método de controle para as infestações por carrapatos são os acaricidas sintéticos, como os organofosforados, formamidinas, piretróides, fenilpirazólicos, lactonas macrocíclicas, benzoilfeniluréias e izoxazolinás (KLAFKE et al., 2024). Apesar do controle baseado em acaricidas apresentar resultados eficazes no controle de carrapatos, seu

uso pode trazer alguns problemas como: a seleção de populações de carrapatos resistentes às bases usadas (FURLONG; PRATA, 2000) e a contaminação do solo, das fontes de água, da carne, do leite e do ambiente (KUNZ; KEMP, 1994; WELSH et al., 2019). Populações de *A. sculptum* resistentes a acaricidas tem sido descritas na literatura (CARDOSO et al., 2023; SOUZA FREITAS; ZAPATA; FERNANDES, 2011). Diante desse cenário, o uso de acaricidas é indicado sempre em associação a outras formas de controle, utilizando um modelo integrado de controle que envolve o manejo das áreas de pastagem com a diminuição da cobertura vegetal (corte e aragem), vacância da pastagem por período superior à sobrevivência dos carrapatos ou introdução de espécies resistentes ao parasito, dentre outros (DE CASTRO, 1997; RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018; WEZYK; BAJER; DWUZNICK-SZAREK, 2025).

Além dessas medidas já utilizadas no controle em campo, estudos vêm sendo feitos para desenvolver medidas alternativas. O controle biológico é uma alternativa em desenvolvimento. O uso de fungos patogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* apresenta eficácia na eliminação dos parasitos, chegando a levar à mortalidade 100% de ninfas de *A. sculptum* em condições de laboratório (LOPES et al., 2007).

A imunização de animais também é uma medida de controle que poderia ser integrada a outros métodos a fim de otimizar os resultados do controle. Atualmente, encontram-se disponíveis comercialmente apenas duas vacinas sob os nomes Gavac® e Ixovac®, sendo que ambas têm como base o antígeno oculto BM86, uma glicoproteína intestinal de *Rhipicephalus microplus* (CANALES et al., 1997; WILLADSEN et al., 1989). Entretanto, ainda não existem vacinas comerciais destinadas ao controle de *A. sculptum*.

1.4 Hematofagia e o sistema complemento

Os carrapatos ixodídeos são ectoparasitas hematófagos e permanecem no hospedeiro durante longos períodos, podendo chegar a várias semanas (SONENSHINE, 1991). A hematofagia é uma das fases mais arriscadas para o carrapato, pois é o momento em que, para a obtenção de sangue, eles precisam localizar a fonte alimentar e penetrar suas peças bucais na pele sem serem percebidos, já que a percepção do hospedeiro à picada poderia provocar uma interrupção precoce do repasto sanguíneo ou levar a uma reação mecânica que poderia levar à

morte do parasito (ROSSIGNOL et al., 1985). Essa ameaça é contornada por diferentes adaptações que fazem com que o processo alimentar cause o mínimo de distúrbio no hospedeiro. Dentre estas, destacam-se as adaptações das peças bucais para a hematofagia, além da produção de um coquetel de moléculas bioativas nas glândulas salivares e no intestino, que contrapõem as reações imunes e hemostáticas desencadeadas no local da picada (FRANCISCHETTI, 2009; KOTÁL et al., 2015) e no sangue ingerido (BLACK IV; KONDRATIEFF, 2005). O sistema complemento e a coagulação são dois exemplos de importantes mecanismos da resposta imune e hemostática, respectivamente, exercidos pelos hospedeiros vertebrados ante a espoliação sanguínea e contrapostos por moléculas ativas produzidas pelos carrapatos.

O sistema do complemento é um dos mecanismos de defesa do sistema imune inato de vertebrados, ao qual os carrapatos devem se contrapor durante o processo alimentar. Trata-se de um sistema com moléculas ativadas em cascata e que conta com mais de 30 glicoproteínas (DUNKELBERGER; SONG, 2010). Sua principal função é reconhecer e opsonizar ou lisar elementos estranhos como micro-organismos patógenos ou células alteradas e apoptóticas do próprio hospedeiro (SIM; LAICH, 2000). A ativação do sistema complemento pode ocorrer através de três vias: a via clássica, a via das lectinas e a via alternativa (SIM; DODDS, 1997).

Moléculas capazes de desempenhar atividade anticomplemento já foram identificadas e caracterizadas em uma série de parasitos hematófagos como barbeiros, flebotomíneos e carrapatos (CAVALCANTE; PEREIRA; GONTIJO, 2003; COSTA et al., 2021; FRANCO et al., 2016; SANT'ANNA et al., 2024, 2024; SILVA et al., 2016). A principal função dos inibidores secretados na saliva ou no lúmen intestinal é realizar a proteção das células do trato digestivo, que entrarão em contato direto com o sangue ingerido. Este, por sua vez, carrega os componentes do complemento que, caso ativado no ambiente intestinal, culminam em morte celular e, conseqüentemente, lesão tecidual (BARROS et al., 2009). Estudos já comprovaram a importância do sistema do complemento e sua inibição no processo alimentar de carrapatos (KEMP et al., 1989; SOARES et al., 2005).

Vários inibidores do sistema complemento produzidos por carrapatos foram identificados e caracterizados (JORE et al., 2016; SCHUIJT et al., 2011; TYSON; ELKINS; DE SILVA, 2008; VALENZUELA et al., 2000). Adicionalmente, em um trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa, foi observada a capacidade da saliva de *R. microplus* em inibir a ativação do complemento tanto pela via clássica, quanto pela alternativa (SILVA et al., 2016). Franco et al. (2016), em mais um estudo conduzido pelo nosso grupo, demonstraram que a

saliva e o extrato de glândulas salivares (EGS) de fêmeas de *A. sculptum* também possuem atividade anticomplemento, inibindo a via clássica. Por fim, Costa et al. (2021), em outro projeto conduzido pelo nosso grupo, demonstraram através de ensaios hemolíticos que as proteínas salivares rAsKunitz, rAs8.9kDa e rAsBasicTail são capazes de opor a ativação do sistema do complemento humano tanto na via clássica quanto na alternativa.

1.5 Vacinas contra carrapatos

Estudos em busca de antígenos que possam ser utilizados em uma vacina contra os carrapatos vêm sendo realizados há mais de cinquenta anos (ROBERTS, 1968). Uma série de antígenos já foram testados em estudos envolvendo diferentes espécies de carrapato, dentre eles, proteínas relacionadas à detoxificação de heme, proteínas presentes e/ou transportadas para o ovo, proteínas envolvidas na expressão gênica, proteínas salivares e intestinais (GUERRERO; MILLER; PÉREZ DE LEÓN, 2012; MERINO et al., 2013; PARIZI et al., 2009, 2012). Apesar de todos estes estudos, apenas as vacinas Gavac® e Ixovac® são encontradas comercialmente e usadas para o controle de *R. microplus*. Em ambas as vacinas, observa-se que os anticorpos do tipo IgG gerados pelo hospedeiro contra o antígeno seriam ingeridos pelo carrapato junto ao sangue e, no lúmen intestinal, se ligariam às Bm86 presentes na membrana, ativando a via clássica do sistema do complemento e culminando em lesão tecidual (JACKSON; OPDEBEECK, 1990; KEMP et al., 1989). Dessa forma, foi possível observar a diminuição do número de fêmeas ingurgitadas, do ganho de peso e da oviposição, contribuindo assim, para o controle dos níveis de parasitismo (RODRÍGUEZ-VALLE et al., 1995, 2012). Apesar de ter sido inovadora, essa vacina apresenta algumas desvantagens, como o fato do seu efeito ser tardio, uma vez que sua ação é observada na redução da infestação larval em uma geração subsequente, o que faz com que a vacina perca competitividade com os acaricidas, capazes de realizar um efeito *knock-down*, mais eficaz a curto prazo (DE LA FUENTE et al., 2007). Um segundo ponto importante é a variação de eficiência em diferentes regiões e países. Estudos mostraram que esta eficiência pode variar de 51 a 91% (revisado por Parizi et al., 2009), provavelmente devido ao polimorfismo apresentado pela Bm86 de carrapatos de cada região (GARCÍA-GARCÍA et al., 2000). Até o momento, os antígenos vacinais comercialmente disponíveis ainda não asseguram um grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas (DE LA FUENTE et al., 2007).

A maior parte dos trabalhos produzidos até o momento sobre o desenvolvimento de vacinas contra carrapatos foi focada em *R. microplus*, carrapato de bovinos, o que é justificado pelo grande prejuízo econômico no setor agropecuário causado por seu parasitismo (DE LA FUENTE; CONTRERAS, 2015; PARIZI et al., 2023).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando no desenvolvimento de vacinas contra *A. sculptum*, buscando selecionar antígenos que possam auxiliar no controle de doenças e parasitoses de interesse médico e veterinário. Costa et al. (2021) identificou proteínas salivares inibidoras de proteases, e observou que essas proteínas salivares são expressas durante os estágios evolutivos de larva, ninfa e adultos de *A. sculptum*, além de apresentarem regulação gênica positiva durante o processo hematofágico. Essas proteínas são: As8.9kDa – uma proteína de 13 kDa que apresenta um domínio do tipo fator de von Willebrand (vWF) tipo C; AsBasicTail – uma proteína de 18,9 kDa que apresenta vários resíduos de lisina da região carboxi-terminal; e AsKunitz – uma proteína de 10,9 kDa que apresenta um domínio do tipo Kunitz_BPTI. Adicionalmente a essas proteínas recombinantes salivares, foi montada uma recombinante quimérica, denominada AsQuimera, uma proteína de 48,5 kDa que contém 22 regiões antigênicas encontradas em sete proteínas transmembrana intestinais de *A. Sculptum* (COSTA et al., 2024).

Nos trabalhos realizados com essas proteínas observou-se que a maior taxa de mortalidade foi em fêmeas alimentadas em camundongos tratados com rAs8.9kDa e rAsKunitz (58,3% e 41,6%, respectivamente), enquanto a mortalidade de ninfas alimentadas em camundongos imunizados com rAs8.9kDa, rAsBasicTail e rAsQuimera foi de 100%. A eficácia dos antígenos rAs8.9kDa e rAsKunitz foi de 92,89% e 85,32%, respectivamente. Já a rAsQuimera obteve taxa de eficácia de 80,84%. Entretanto, não se sabe quais regiões antigênicas contribuíram para essa eficácia.

Simultaneamente, essas proteínas se revelaram como alvos promissores para o desenvolvimento de uma formulação vacinal a ser utilizada no controle do carrapato. Natividade et al. (2025) realizaram ensaios vacinais com cinco formulações que possuíam combinações dos antígenos recombinantes identificados por Costa et al. (2021, 2024) seguidos pelo desafio com *A. sculptum*. Foram montadas formulações contendo combinações binárias entre um antígeno salivar e a AsQuimera e combinações múltiplas com 3 e 4 antígenos, adicionadas do adjuvante Hidróxido de Alumínio, que foram usadas na imunização de camundongos. Os desafios parasitários com larvas e ninfas de *A. sculptum* mostraram que os

carrapatos alimentados em camundongos imunizados com combinações binárias tiveram uma porcentagem de muda baixa em comparação aos outros grupos. Outro parâmetro afetado pela vacinação foi a fertilidade dos ovos postos pelas fêmeas dos grupos vacinados com as formulações. A eficácia das formulações vacinais variou de 81,6 a 99,9%.

Todos os ensaios vacinais realizados até o presente momento com as proteínas recombinantes identificadas e caracterizadas por Costa et al. (2021, 2024) foram realizados utilizando Hidróxido de Alumínio como adjuvante. É possível que a mudança de adjuvante reduza o número de doses necessárias da vacina, ou até mesmo aumente a mortalidade dos carrapatos durante a alimentação.

1.6 Adjuvantes vacinais

1.6.1 Função dos adjuvantes

Vários obstáculos foram superados para alcançar as formulações de vacinas produzidas atualmente contra patógenos. As primeiras formulações vacinais não eram puras e frequentemente continham antígenos não relacionados, o que reduzia sua eficácia. No entanto, com o avanço da tecnologia do DNA recombinante e da química sintética, agora é possível produzir antígenos altamente purificados que induzem respostas imunes mais específicas (HE; ZOU; HU, 2015). Uma desvantagem significativa do uso de formulações feitas a partir de antígenos puros é que elas tendem a ser menos imunogênicas. Portanto, essas preparações antigênicas requerem a adição de um adjuvante para alcançar a imunidade protetora (WARREN; CHEDID, 1988).

Os adjuvantes são substâncias potencializadoras da resposta imune capazes de serem utilizadas em combinação com um antígeno específico e produzirem uma resposta imune mais intensa do que o antígeno isoladamente. A palavra adjuvante vem do latim “*adjuvare*”, que significa ajuda (RAMON, 1926).

Tem sido descrito que a inclusão de um adjuvante em formulações vacinais apresenta vários benefícios, tais como o aumento da imunogenicidade de antígenos altamente purificados ou recombinantes, a redução na quantidade de antígenos ou de número de imunizações necessárias para imunidade protetora e a melhora na eficácia das vacinas em recém-nascidos,

idosos ou pessoas imunocomprometidas (MARX et al., 1993; MCEL RATH, 1995). Os adjuvantes também possuem outras vantagens, como mostra a Figura 4.

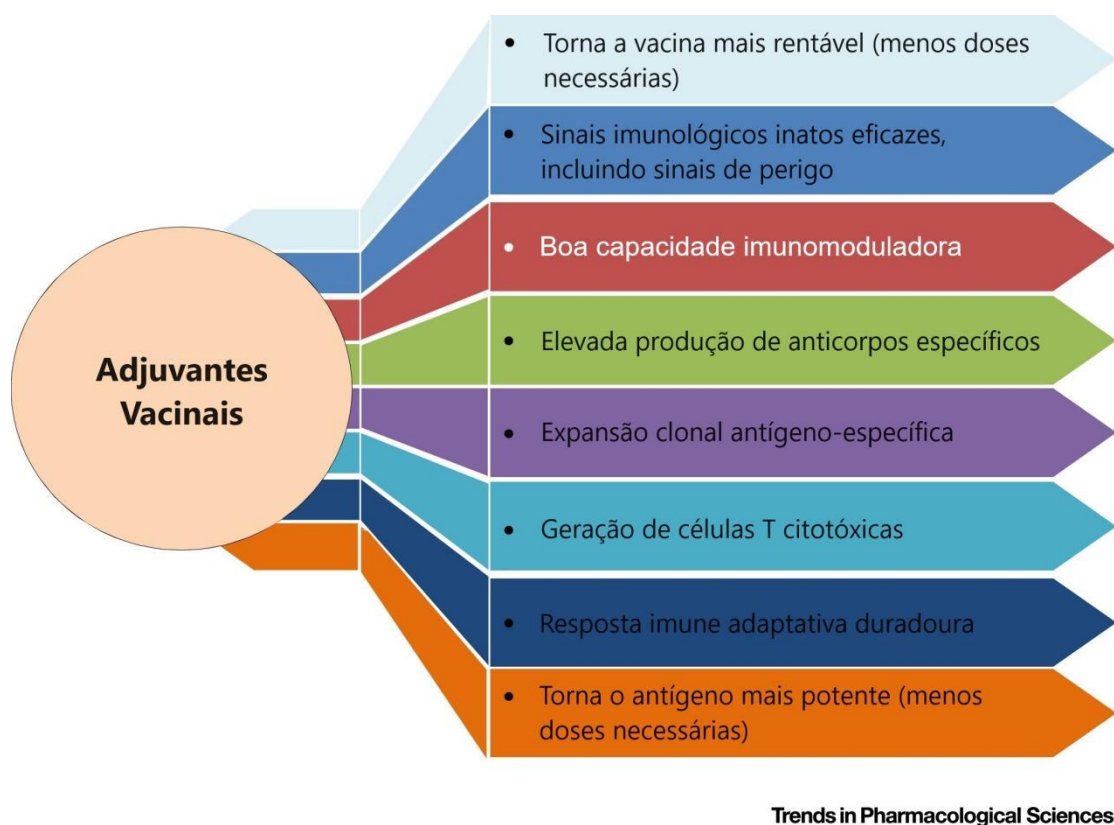


Figura 4: Propriedades características de adjuvantes vacinais. Adaptado de Bonam et al. (2017).

1.6.2 Mecanismo de ação

Os adjuvantes podem operar de diversas maneiras, seja como um veículo de entrega específico ou uma molécula de direcionamento, agindo como um depósito no local da injeção. Eles também podem representar um sinal de perigo específico, induzindo uma resposta imune de tipo específica (AWATE; BABIUK; MUTWIRI, 2013; LAMBRECHT et al., 2009).

Em geral, os adjuvantes provocam algum tipo de dano tecidual, o que, por sua vez, desencadeia o recrutamento de células imunológicas e a ativação do sistema imunológico. Isso envolve mecanismos complexos que resultam na estimulação e ativação tanto da imunidade inata quanto da adaptativa (CALABRO et al., 2011).

1.6.3 Classificação

Os adjuvantes podem ser classificados de acordo com sua origem, mecanismo de ação ou propriedades físico-químicas (VOGEL, 1998). Edelman (1992) categorizou os adjuvantes em três grupos distintos: (i) imunoestimulantes ativos, que são substâncias que amplificam a resposta imune ao antígeno; (ii) transportadores, que são proteínas imunogênicas que auxiliam as células T; e (iii) adjuvantes veiculares, que são emulsões oleosas ou lipossomas que funcionam como uma matriz para os antígenos, além de estimular a resposta imune.

O hidróxido de alumínio é o adjuvante mais utilizado em humanos (LINDBLAD, 1995). Ele é um adjuvante veicular que funciona formando um depósito de antígeno no local de inoculação da vacina, onde o antígeno é liberado lentamente. Esse mecanismo de imunoestimulação é conhecido como efeito repositório (ou efeito depósito). Após a administração da vacina no organismo, o antígeno adsorvido no alumínio interage com as células apresentadoras de antígenos (APCs), desencadeando principalmente uma resposta imune. Com a decomposição do hidróxido de alumínio, os antígenos são liberados gradualmente, o que retarda seu consumo e prolonga a duração da estimulação do sistema imunológico. Se o intervalo de interação entre APCs e antígeno for prolongado, resultará em uma resposta imunitária mais eficaz (HE; ZOU; HU, 2015).

Um exemplo de adjuvantes imunoestimulantes são as saponinas. Saponinas são compostos glicosídicos obtidos da casca de árvores da espécie *Quillaja saponaria* (Luebert, F.), constituídos por uma porção oligossacarídica (hidrofílica) ligada através de um grupo hidroxila, carbonila ou ambos, a uma estrutura triterpênica ou esteroidal denominada aglicona (hidrofóbica) (OLESZEK, 2002). Elas são indutoras de uma intensa resposta imune Th1 (citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8⁺ e produção de IgG2a em camundongos) bem como, concomitante resposta Th2 (LIU et al., 2002). Dentro do grupo das saponinas, as mais estudadas são a Quil A e seus derivados QS-21, que foram utilizadas em ensaios vacinais em humanos contra o HIV e câncer, e em macacos e camundongos contra a malária (EVANS et al., 2001; LIVINGSTON et al., 1994; MORENO et al., 1999). Quil A e QS-21 estimulam a resposta imune Th1 e a produção de linfócitos T citotóxicos (LTCs) contra antígenos exógenos, o que os torna adjuvantes ideais para uso em vacinas de subunidades e vacinas dirigidas contra patógenos intracelulares, assim como vacinas terapêuticas contra o câncer (SOLTYSIK et al.,

1995). No entanto, o extrato bruto de *Quillaja saponaria* (como o Quil-A®) apresenta sérias desvantagens, como alta toxicidade, efeito hemolítico indesejável e instabilidade na fase aquosa, o que limita seu uso como adjuvante (MARCIANI et al., 2003; WAITE et al., 2001).

1.6.4 O adjuvante ideal

O adjuvante ideal deve ser biodegradável, econômico e de fabricação simples, além de minimizar reações tóxicas locais e sistêmicas. As reações locais geralmente se caracterizam por dor, inflamação local, edemas, necrose, linfadenopatia, granuloma, úlcera e a geração de abscessos estéreis. Já nas reações sistêmicas, podem ocorrer náuseas, febre, artrite, uveíte, eosinofilia, alergia, anafilaxia, toxicidade em órgãos específicos (fígado e pulmão) e imunotoxicidade (liberação de citocinas imunossupressoras ou doenças autoimunes) (ALLISON; BYARS, 1991; KURODA et al., 2004; VOGEL, 2000; WATERS; TERRELL; JONES, 1986; WOODWARD, 2005).

O desenvolvimento dos adjuvantes modernos, apesar de enfrentar muitos obstáculos, está em progresso e baseia-se na melhoria e aprimoramento das respostas imunes induzidas por vacinas, sem comprometer a segurança. Isso é feito por meio da adição seletiva de moléculas bem definidas, formulações ou ambas. Não existe um adjuvante universal e ideal para todas as vacinas. A escolha apropriada do adjuvante a ser combinado ao antígeno é de extrema importância para a formulação de vacinas eficazes (REED; ORR; FOX, 2013).

A escolha do adjuvante ideal é fundamentada principalmente na sua capacidade de induzir o tipo de resposta imune desejada, aquela que se supõe ser a mais eficaz para conferir proteção contra o agente em estudo. No entanto, é importante destacar que, embora essa seleção seja orientada por critérios imunológicos e experimentais prévios, os resultados reais de proteção só podem ser devidamente avaliados por meio de testes *in vivo*. Diante disso, a continuidade dos experimentos com diferentes adjuvantes se faz necessária, visando identificar aquele que proporcione a resposta imune mais protetora e eficaz.

2 JUSTIFICATIVA

Amblyomma sculptum é motivo de grande preocupação na medicina humana e veterinária, pela ação espoliante, transmissão de patógenos e contaminação do ambiente causado pelo uso indiscriminado de produtos carrapaticidas.

A utilização de uma vacina contra o carrapato estrela poderia reforçar o combate às infestações minimizando os problemas causados pelo controle baseado em acaricidas. Além disso, poderia reduzir a mão de obra necessária, uma vez que necessitaria de menos intervenções, viabilizando sua aplicação em animais de difícil manejo. No entanto, ainda não existem produtos vacinais disponíveis para o controle do *A. sculptum*.

Costa et al. (2021, 2024) e Natividade et al. (2025) alcançaram eficácias vacinais promissoras com as proteínas rAsKunitz, rAs8.9kDa, rAsBasicTail e rAsQuimera, seja utilizando-as separadamente ou em diferentes formulações vacinais. Contudo, esses trabalhos avaliaram somente o hidróxido de alumínio como adjuvante. A mudança do adjuvante ou o desenvolvimento de novos antígenos vacinais poderiam proporcionar uma ação direta na mortalidade dos carrapatos durante a alimentação, ou até mesmo manter as eficácias obtidas e eventualmente nos permitir, em ensaios futuros, reduzir a quantidade de imunizações necessárias sem comprometer a eficácia vacinal.

A indução de mortalidade nos carrapatos é um atributo altamente desejável, sendo um dos critérios mais valorizados no desenvolvimento de produtos comerciais carrapaticidas. Adicionalmente, a redução no número de imunizações apresenta grande relevância em cenários comerciais, por facilitar o manejo dos animais e reduzir os custos operacionais.

Diante disso, este estudo tem por objetivo desenvolver novas formulações vacinais utilizando a saponina como adjuvante, bem como propor a construção de um novo antígeno vacinal com base em moléculas promissoras previamente identificadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia de diferentes formulações vacinais contendo a saponina como adjuvante e desenvolver um novo antígeno vacinal baseado nas regiões antigênicas das proteínas AsKunitz, As8.9kDa, AsBasicTail e AsQuimera.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a inocuidade das formulações vacinais contendo saponina;
- Avaliar os parâmetros hematológicos, parâmetros bioquímicos, fenótipo dos leucócitos e a resposta imune humoral de camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais contendo saponina;
- Avaliar os parâmetros alimentares, de desenvolvimento e reprodutivos de larvas, ninfas e fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais contendo saponina;
- Avaliar a eficácia vacinal das diferentes formulações vacinais contendo saponina;
- Identificar as sequências de peptídeos mais antigênicas contidas nas proteínas rAsKunitz, rAs8.9kDa, rAsBasicTail e rAsQuimera e produzir uma proteína recombinante quimérica contendo essas regiões;
- Realizar um ensaio pré-clínico vacinal com a proteína quimérica produzida (rAsQuimeraII) e o adjuvante hidróxido de alumínio;
- Avaliar a inocuidade da vacina e a resposta imune humoral de camundongos imunizados com a rAsQuimeraII;
- Avaliar os parâmetros alimentares e de desenvolvimento de ninfas de *A. sculptum*, oriundas da colônia do laboratório (LAH) e provenientes de campo (Itabirito-MG), alimentadas em camundongos imunizados com a rAsQuimeraII;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos envolvendo imunização de camundongos e coleta de material biológico foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG), sob os protocolos de número 103/2017 (Anexo I), 94/2023 (Anexo II) e 32/2024 (Anexo III). O protocolo de manutenção da colônia foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG) sob o protocolo de número 60/2020 (Anexo IV).

4.2 Manutenção da colônia de origem de *Amblyomma sculptum* em laboratório

Para a manutenção da colônia de *A. sculptum*, os carrapatos foram mantidos em estufa BOD em condições de temperatura ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade controladas ($80 \pm 5\%$). A manutenção do ciclo ocorreu através da alimentação das larvas, ninfas e adultos em camundongos da linhagem Swiss, de acordo com a metodologia de Bouchard & Wikel (2005), em que os carrapatos foram colocados em câmaras de alimentação fixadas com cola atóxica (Kamar Adhesive - Kamar Products Inc) na região dorsal dos hospedeiros, onde completam o repasto sanguíneo. Larvas e ninfas foram alimentadas nas câmaras em grupos de aproximadamente, 50 e 10 espécimes, respectivamente, por camundongo. Um casal de adultos, por sua vez, foi colocado em cada câmara de alimentação. As fêmeas ingurgitadas foram, em seguida, colocadas em placas de cultura com 6 poços, onde realizaram a oviposição e os ovos produzidos foram armazenados em seringas que tiveram as extremidades removidas e fechadas com algodão para impedir a saída das larvas após a eclosão. Ninfas e adultos foram mantidos em frascos de 80 mL fechados na superfície com tecido voal.

4.3 Formulações vacinais

Foram utilizadas as mesmas formulações vacinais criadas por Natividade et al. (2025) com os antígenos identificados e caracterizados por Costa et al. (2021, 2024). Essas

formulações foram aplicadas em camundongos da linhagem Swiss, cada injeção contendo 5 µg de cada antígeno e 50 µg do adjuvante Saponina dissolvidos em um volume final de 100 µL de PBS estéril (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4). As imunizações foram realizadas da mesma forma em todos os animais, isto é, por via subcutânea na região dorsal.

Quadro 1: Formulações vacinais contendo o adjuvante saponina.

Grupos	Nome	Composição
Controle 1 (C1)	PBS	PBS
Controle 2 (C2)	PBS + adj	PBS + adj
Vacina 1 (V1)	KQui + adj	rAsKunitz + rAsQuimera +adj
Vacina 2 (V2)	BtQui + adj	rAsBasicTail + rAsQuimera + adj
Vacina 3 (V3)	8.9Qui + adj	rAs8.9kDa + rAsQuimera + adj
Vacina 4 (V4)	K8.9Qui + adj	rAsKunitz + rAs8.9kDa + rAsQuimera +adj
Vacina 5 (V5)	K8.9BtQui + adj	rAsKunitz + rAs8.9kDa + rAsBasicTail + rAsQuimera +adj

4.4 Produção *in vitro* das proteínas recombinantes

4.4.1 Transformação e expressão

As sequências dos genes selecionados foram clonadas no plasmídeo pET28a-TEV e transformadas em bactéria termocompetente *Escherichia coli* BL21 (COSTA, 2019) e as colônias com as construções foram mantidas em freezer a -80°C. Para a produção das recombinantes, as colônias foram descongeladas e 1 µL dos estoques foram adicionados a 5 mL de meio LB (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%) com 12,5 µL (100 mg/mL) de antibiótico Kanamicina e mantido sob agitação a 160 rpm a 37°C por 14 horas. O volume de 1 mL da cultura crescida foi adicionado em 24 mL de meio LB com Kanamicina e mantido sob agitação a 37°C até sua densidade óptica a 600 nm se estabelecer entre 0,4 e 0,6. Em seguida foi feita a indução da expressão das proteínas recombinantes utilizando 1 mM de isopropilo-β-D-1- galactopiranosídeo (IPTG) e mantidos a 37°C por 16 horas, em agitação a 160 rpm. Como controle negativo foram utilizados os mesmos clones, mantidos nas condições já descritas acima, mas sem adição de IPTG.

4.4.2 Purificação das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada utilizando colunas de afinidade por íons metálicos (HisTrap®Hp, GE Healthcare) e soluções desnaturantes conforme indicado pelo fabricante. Após a indução realizada pelo IPTG, todo material foi centrifugado em rotação de 10.000 g por 5 minutos sob a temperatura de 4°C. Os sedimentos contendo determinada proteína recombinante foram lisados por ultrassonografia em tampão de lise (20 mM de fosfato de sódio, 30 mM Imidazol e 8 M de ureia) contendo lisozima (5 mg/mL), após congelamento e descongelamento por três vezes. Logo após, foram centrifugados a 12.000 g a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,22 µm (Millipore). As purificações foram realizadas por cromatografia em fase líquida preparativa AKTA-prime plus® (GE Healthcare Life Sciences) e software PrimeView usando colunas de afinidade His Trap® Hp (GE Helthcare) com capacidade para 5 mL de resina. As proteínas recombinantes foram eluídas em tampão desnaturante com uréia a um fluxo de 1,3 mL/min. A absorbância das frações obtidas foi monitorada a 280 nm e as que indicavam a presença de proteínas foram submetidas ao SDS-PAGE 12,5% para verificação da sua massa e pureza (Tabela 1). As frações contendo cada um dos recombinantes foram dialisadas em membranas de diálise (Sigma-aldrich®) em um volume 200 x maior de tampão fosfato pH 7,4 a 4°C. Para a renaturação das proteínas produzidas, ditiotretitol (DTT) na concentração final de 10 mM foi adicionado aos tubos contendo cada recombinante e o processo de diálise repetido novamente overnight a 4°C. As diferentes proteínas recombinantes foram dosadas (Bradford, 1976), aliquotadas e estocadas a -20°C.

Tabela 1: Peso molecular e ponto isoelétrico das proteínas maduras (sem peptídeo sinal) e suas recombinantes produzidas em *E. coli* BL21.

	AsKunitz	rAsKunitz	As8.9kDa	rAs8.9kDa	AsBasicTail	rAsBasicTail	rAsQuimera
PM (kDa)	8,7	10,9	9,8	13	16,8	18,9	48,5
pI	8,2	7,64	5,45	6,44	9,6	9,68	5,08

PM = peso molecular; pI = ponto isoelétrico.

As proteínas recombinantes foram nomeadas colocando “r” em frente ao nome dado à nativa.

4.5 Avaliação da eficácia das formulações vacinais utilizando a saponina

4.5.1 Imunização dos grupos experimentais

Para avaliar a eficácia das formulações construídas, foi realizado ensaio pré-clínico vacinal com os sete grupos experimentais, cada um contendo cinco camundongos da linhagem Swiss, fêmeas, de quatro semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBio) do ICB. Os grupos experimentais foram mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia com ciclo claro-escuro de 12:12 horas, alimentados com ração para roedores (Nuvilab) e água filtrada. O delineamento experimental foi o mesmo dos estudos anteriores. Em cada animal, foram aplicadas três doses de cada formulação em intervalos de 15 dias. O sangue dos camundongos foi coletado através da veia lateral caudal em diferentes tempos durante o experimento para análise de diversos parâmetros (Figura 5).

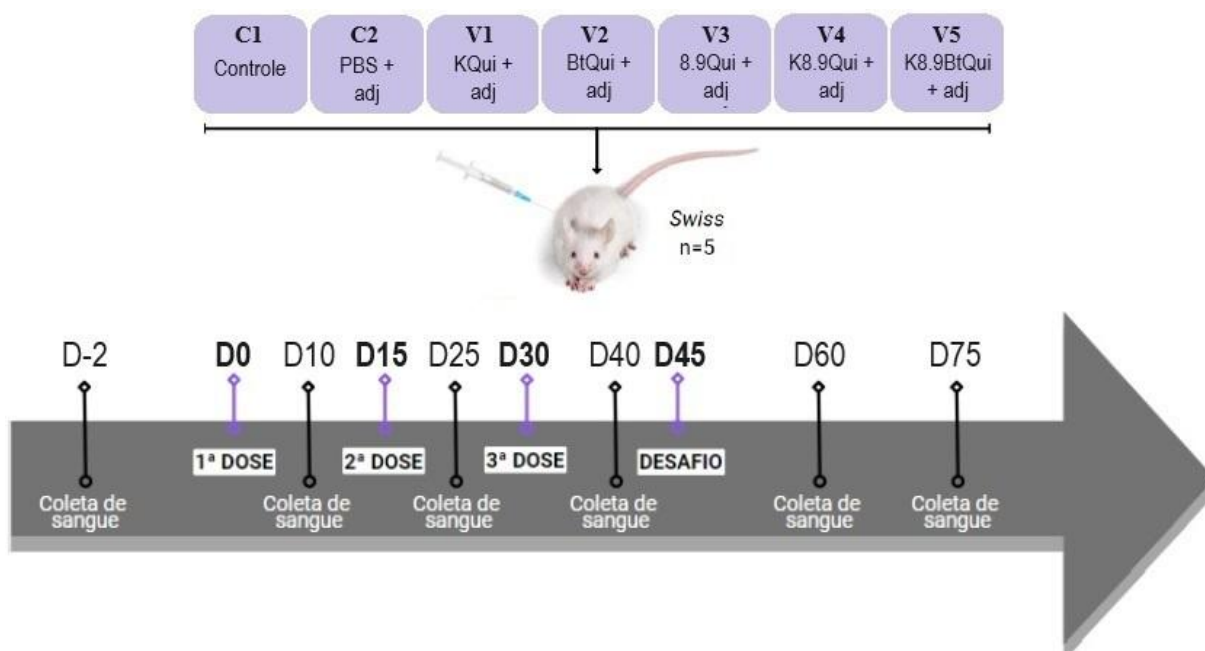


Figura 5: Esquema de imunização vacinal. D = Dia; D-2 = Dois dias antes da primeira dose vacinal e primeira coleta de sangue; D0 = Início do protocolo vacinal; D10 = Segunda coleta de sangue; D15 = Aplicação da segunda dose; D25 = Terceira coleta de sangue; D30 = Aplicação da terceira dose; D40 = Quarta coleta de sangue; D45 = Desafio; D60 = Quinta coleta de sangue; D75 = Sexta coleta de sangue.

4.5.2 Análise de inocuidade e resposta imune pós imunização

4.5.2.1 Análise comportamental e aspecto macroscópico do local da injeção

A inocuidade do imunobiológico foi avaliada clinicamente pela análise macroscópica do local do inóculo para verificar a presença de nódulos, pápulas ou feridas nas 72 horas subsequentes a cada dose de imunização, além da realização de observações diárias do comportamento dos animais. Adicionalmente, todos os camundongos foram pesados antes e após as imunizações a fim de atestar que não houve grandes danos à saúde do animal.

4.5.2.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

A análise de inocuidade contou com a avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos a fim de atestar sobre a saúde dos animais utilizados antes e após o protocolo vacinal. Nos tempos D-2 e D40, foram realizadas coletas de aproximadamente 50 µL de sangue pela veia lateral da cauda dos camundongos, sendo transferidas para microtubos de 0,5 mL (Modelo 3266NR de polipropileno, Vacuplast) contendo anticoagulante EDTA (Dole Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda) para posterior avaliação em Analisador Hematológico Veterinário Abacus (São Paulo, São Paulo, Brasil) pelo método de impedância, que fornece a contagem automática de leucócitos totais, hemácias, plaquetas, concentração de hemoglobina e valores de VCM, CHCM, HCM. Contagens plaquetárias automáticas que não se encontraram no valor de normalidade foram conferidas a partir da observação em lâmina contando-se a média em dez campos de 100X, com posterior multiplicação por 20000.

Para a avaliação do perfil bioquímico (Uréia, Creatinina, Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT)), o sangue coletado foi centrifugado a 600 g por 10 min em temperatura ambiente e todo o volume de plasma foi transferido com auxílio de uma micropipeta para um microtubo. Em seguida, kits comerciais da Synermed foram usados para as análises de creatinina, mensuradas pelo método cinético, e ureia, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), mensuradas pelo método enzimático. Os valores de referência seguem Kaneko, Harvey e Bruss (1997), e Meyer, Coles e Rich (1995). As análises da função hepática e renal foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica da Escola de

Veterinária da UFMG, utilizando o equipamento Cobas Mira Plus (BioTécnica Ind e Com. Ltda, Varginha, Brasil).

4.5.2.3 Avaliação do perfil fenotípico das populações de leucócitos

O perfil fenotípico dos linfócitos dos animais imunizados foi avaliado por citometria de fluxo utilizando sangue coletado de cinco animais de cada grupo. Aliquotas contendo 50 µL de sangue de camundongo foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL (tubos de fundo arredondado BD Falcon) contendo 20 µL dos anticorpos anti-CD3-Percep-Cy5 (clone 145-2C11, eBioscience, Thermo Fisher Scientific), anti-CD4-FITC (clone RM4-5, eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e anti-CD8-APC (clone 53-6.7, eBioscience, Thermo Fisher Scientific). Um volume adicional de 50 µL foi transferido para um tubo de poliestireno contendo o anticorpo anti-CD19-FITC (clone MB19-1, eBioscience, Thermo Fisher Scientific), e mais 50 µL foram transferidos para outro tubo contendo o anticorpo anti-CD14-APC (clone Sa2-8, eBioscience, Thermo Fisher Scientific). Os tubos foram homogeneizados por vortex e incubados por 30 minutos no escuro. Após a incubação, foram adicionados 2 mL (1 mL por vez) da solução Billing Dog (solução de lise FACS, Becton Dickinson) ao vortex, seguida de nova incubação por 10 minutos no escuro. A reação de lise foi então interrompida com a adição de 1 mL de solução de lavagem PBS (PBS contendo 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) e 0,1% de azida sódica, pH 7,2), e as amostras foram centrifugadas a 600 g por 7 minutos a 18 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi lavado com 2 mL da solução PBS-wash. O pellet foi então ressuspense em 200 µL da solução fixadora Macs FACS Fix (10,0 g/L de paraformaldeído, 10,2 g/L de cacodilato de sódio e 6,65 g/L de cloreto de sódio) para leitura em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson), com aquisição de 30.000 eventos por tubo. O software FlowJo 10.4 (Tree Star) foi utilizado para a análise da imunofenotipagem celular. Os linfócitos totais foram identificados por meio do gráfico FSC versus SSC. As células T CD4⁺ e CD8⁺ foram selecionadas com base na coexpressão com o marcador de células T CD3 (CD4⁺CD3⁺ e CD8⁺CD3⁺, respectivamente), dentro do *gate* de linfócitos totais, enquanto as células B foram identificadas como CD19⁺. Os resultados para CD4⁺CD3⁺, CD8⁺CD3⁺ e CD19⁺ foram expressos como porcentagens de células positivas dentro do *gate* de linfócitos totais. Os monócitos foram caracterizados pela expressão de CD14⁺ e granulação intermediária.

4.5.2.4 Avaliação da resposta humoral nos animais imunizados

Amostras individuais de sangue foram colhidas por punção da veia lateral caudal dos camundongos antes e após os eventos de imunização e desafio. As amostras foram centrifugadas a 4.000 g por 10 min para a obtenção do soro. Os níveis de IgG antígeno-específicos para cada um dos alvos vacinais foram determinados individualmente no soro dos hospedeiros através de ensaios imunológicos (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”-ELISA) utilizando 0,5 µg de cada antígeno recombinante purificado em 50 µL de tampão carbonato/poço em placas de ELISA de 96 poços (COSTAR® 3590 high binding). Após incubação a 4°C em câmara úmida overnight, as placas foram lavadas, bloqueadas por 2 horas a 37°C sob agitação com solução de bloqueio (PBS com 2% de caseína). Após 3 lavagens, as placas foram incubadas por 1 hora em agitação a 37°C com os soros dos camundongos na diluição 1:320 e, após novas lavagens, incubadas com anticorpos anti-IgG de camundongos conjugados com peroxidase (Sigma-aldrich®) na diluição 1:10.000. A revelação foi feita com a adição do tampão fosfato-citrato 100 mM pH 5.0 contendo 0,025% H₂O₂ e 0,01% de OPD (O-Fenilenodiamina). A reação foi interrompida com a adição de 200 µL de H₂SO₄ 12,5% e a absorbância medida a 492 nm em leitor de ELISA modelo VERSAmax® com software SoftMax® (Molecular Devices).

4.5.3 Desafio parasitário e avaliação da eficácia vacinal

O desafio com carrapatos foi realizado 15 dias após a terceira e última dose vacinal. Nos desafios com larvas, cada camundongo foi infestado com 50 larvas de carrapatos *A. sculptum*. Nos desafios com ninfas, cada camundongo foi infestado com 10 ninfas. E nos desafios com adultos, cada camundongo foi infestado com um casal de *A. sculptum*.

Os seguintes parâmetros relacionados à alimentação de carrapatos em camundongos imunizados foram analisados: tempo de alimentação, peso final após alimentação, mortalidade e porcentagem de muda. Foram avaliados parâmetros reprodutivos das fêmeas, como a massa total de ovos produzida por fêmea e taxa de eclosão dos ovos, que foi calculada pela razão do número de larvas emergidas em relação ao número de ovos produzidos por cada fêmea (larvas

e ovos foram pesados e a massa foi convertida em número de indivíduos). A eficácia da imunização em cada um dos grupos foi avaliada através da seguinte fórmula: Eficácia (%E) = $100 * [1 - (RL * VL * RN * VN * RA * OA * FE)]$, em que RL é o efeito na recuperação de larvas ingurgitadas, VL é o efeito sobre a viabilidade de larvas ingurgitadas, RN é o efeito na recuperação de ninfas ingurgitadas, VN é o efeito sobre a viabilidade de ninfas ingurgitadas, RA é o efeito na recuperação de adultos ingurgitados, OA é o efeito na oviposição de fêmeas e FE é o efeito sobre a fertilidade do ovo (AGUIRRE et al., 2015).

4.6 Construção de um novo antígeno vacinal com regiões imunogênicas de proteínas salivares e intestinais

4.6.1 Proteínas usadas para seleção de regiões imunogênicas a serem avaliadas

A fim de identificar as regiões antigênicas das proteínas usadas nos experimentos de vacinação de Costa et al. (2021, 2024), a sequência das proteínas rAsKunitz, rAs8.9kDa, rAsBasicTail foram usadas, bem como 22 regiões imunogênicas contendo epítomos preditos para células B provenientes de sete proteínas de membrana do epitélio intestinal de *A. sculptum* selecionados através da sequência de aminoácidos pela ferramenta ABCpred por Costa (2019). Das 22 regiões, duas estão contidas na proteína AsMucin, quatro na AsAPP, duas na AsLAMP e as outras 14 de outras quatro proteínas expressas no intestino. Das quatro proteínas, três possuem sequências de nucleotídeos publicadas no GenBank e são ligadas à membrana, sendo duas delas possivelmente ancoradas (GBBK01001784.1 e GEEX01010907.1) por âncora de GPI e a outra (GEEX01003209.1) por uma região transmembrana. A última, identificada como “transmembrana” não obteve correspondência com nenhuma proteína de *A. sculptum* catalogada no GenBank.

4.6.2 Spot síntese

Para avaliar a antigenicidade das regiões selecionadas das proteínas, 175 peptídeos foram selecionados. Para as proteínas salivares, as sequências dos peptídeos foram montadas selecionando 16 aminoácidos de cada vez, iniciando na região amino-terminal das proteínas e

deslocando a cada 3 aminoácidos em direção à região carboxi-terminal. Dessa forma foram obtidos 32 peptídeos da proteína AsKunitz, 38 da As8.9kDa e 68 da AsBasicTail. Adicionalmente, foram incluídos 37 peptídeos derivados de proteínas intestinais previamente identificadas por Costa (2019), totalizando 175 peptídeos. Esses peptídeos foram sintetizados em uma membrana de celulose derivatizada (Intavis™) utilizando um sintetizador automático ResPep SL (Intavis™), conforme a técnica de SPOT-síntese descrita por Frank et al. (1992). Em resumo, a química baseada no grupo protetor fluorenilmetoxycarbonila (Fmoc) foi empregada para construir os peptídeos em locais específicos da membrana. O acoplamento dos aminoácidos ocorreu após a remoção do grupo Fmoc (etapa de desproteção), realizada com 25% (v/v) de 4-metilpiperidina (Sigma-Aldrich™) em dimetilformamida (DMF, Merck™), seguido da ativação do grupo carboxila com diisopropilcarbodiimida (DIC, Sigma-Aldrich™) e Oxyma Pure (Merck™), ambos a 1,1 M. Para cada aminoácido, foram realizados dois ciclos de acoplamento sem nova etapa de desproteção entre eles, a fim de garantir o crescimento correto da sequência. Em seguida, uma solução de anidrido acético a 3% (v/v) em DMF foi utilizada para promover a acetilação de possíveis resíduos de amina livres remanescentes. O grupo protetor Fmoc do aminoácido recém-acoplado foi então removido com 25% (v/v) de 4-metilpiperidina em DMF. Essas etapas foram repetidas até a adição completa de todos os aminoácidos. Ao final da síntese, a membrana foi submersa durante uma hora em uma solução de clivagem composta por 95% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA, Sigma-Aldrich™), 2,5% (v/v) de água e 2,5% (v/v) de triisopropilsilano (Merck™), com o objetivo de remover o último grupo Fmoc e também os grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos. Em seguida, a membrana foi lavada quatro vezes com diclorometano (DCM), quatro vezes com DMF e duas vezes com etanol. Após a secagem, os *spots* foram verificados sob luz ultravioleta.

4.6.3 Immunoblotting

Os experimentos de reatividade das membranas contendo os arranjos de peptídeos contra diferentes soros foram realizados como previamente descrito por Frank (2002), com modificações. Inicialmente, a membrana foi bloqueada com uma solução 5% BSA e 4% de sacarose em PBS pH 7,4 e incubada por 12 horas sob agitação. A membrana então foi lavada 3 vezes com 100 mL de solução de lavagem (PBS-Tween 20), sob agitação rápida durante 10 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada por duas horas sob agitação com anticorpo

primário (soro dos camundongos) diluído 1:500 em solução de lavagem. A membrana foi lavada novamente 3 vezes com solução de lavagem. Após a lavagem, a membrana foi incubada por uma hora sob agitação com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Imuny) e diluídos 1:10.000 na solução de lavagem. Novamente realizou-se a etapa de lavagem, seguindo a revelação da membrana. Para a revelação, a membrana foi transferida para a bandeja preta do ImageQuant™ LAS 4000, e em seguida foi adicionado aproximadamente 200 uL de Luminata Forte™ (o suficiente para cobrir toda a membrana). A membrana foi revelada, e após esse processo a mesma foi lavada com 100 mL de solução de lavagem por 1 minuto, sob agitação rápida. Em seguida foi realizada análise densitométrica de cada *spot* utilizando o software ImageJ e a extensão “Protein Array Analyzer”.

Após revelação, a membrana foi regenerada para retirar qualquer anticorpo ligado a ela. Inicialmente, a membrana foi lavada três vezes com 30 mL de DMF por 10 minutos, seguida de uma incubação com solução desnaturante (ureia 8M e SDS 1%) por 12 horas sob agitação moderada. Novamente realizou-se uma incubação com a solução desnaturante, dessa vez por 30 minutos sob agitação rápida. Em seguida, foi realizada uma lavagem com 150 mL de água Milli-Q® por 2 minutos sob agitação rápida. A membrana foi submetida a três lavagens com 100 mL de uma solução ácida de etanol 55% e ácido acético 10% por 10 minutos sob agitação rápida, seguida de uma última lavagem de 2 minutos com água Milli-Q®. A membrana foi colocada em etanol duas vezes, por 5 minutos cada, para retirar umidade e secar em ar frio. Após este protocolo de regeneração, a membrana está pronta para ser reutilizada.

Todo esse processo foi realizado cinco vezes. Na primeira vez utilizamos soro de camundongos que não foram imunizados com as proteínas recombinantes para ser nosso controle negativo. Nas outras quatro vezes, foi utilizado soro de camundongos que foram imunizados com as proteínas recombinantes AsBasicTail, AsQuimera, As8.9kDa e AsKunitz, respectivamente. Os soros utilizados nesse experimento foram coletados por Costa (2019) nos seus grupos vacinais de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes isoladamente. No controle negativo foi utilizado o soro de camundongos imunizados somente com PBS. Foram feitos *pools* de 50 µL com os soros (soros de 5 camundongos por grupo, 10 µL de cada) para a incubação do anticorpo primário.

4.6.4 Síntese da QuimeraII

A proteína quimérica recombinante foi desenhada a partir de uma sequência de nucleotídeos que continha diferentes regiões que codificavam as 22 regiões antigênicas selecionadas. As regiões antigênicas foram montadas em sequência, separadas por sequências de Glicina-Serina-Glicina-Serina-Glicina, além de nucleotídeos que codificavam duas caudas de histidina (no início e no final) e outros aminoácidos necessários para a clonagem em vetor de expressão. A sequência de nucleotídeos foi então otimizada para expressão em bactérias, produzida sinteticamente e clonada nos vetores pET-28a(+)-TEV e pET-29b(+)-TEV pela empresa FastBio (representante nacional da empresa GenScript). A transformação, expressão e purificação foi realizada de forma semelhante às outras recombinantes.

4.6.5 Ensaio vacinal com a rAsQuimeraII e desafio parasitário

Para avaliar o potencial vacinal da rAsQuimeraII, foi realizado ensaio pré-clínico vacinal com os oito grupos experimentais sendo dois controles (um apenas com PBS e outro com adjuvante), um grupo com a proteína rAsQuimeraII produzida, e o último com a proteína rAs8.9kDa já utilizada em ensaios anteriores (Quadro 2). Cada grupo continha cinco camundongos da linhagem Swiss, fêmeas, de quatro semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBio) do ICB. A manutenção desses grupos e o cronograma vacinal são os mesmos já descritos no item 4.5.1. A análise do comportamento e o aspecto macroscópico do local da injeção foi realizado de acordo com a metodologia do item 4.5.2.1, assim como a resposta humoral nos animais imunizados que foi avaliada de acordo com a metodologia do item 4.5.4.

As vacinas aplicadas nos camundongos Swiss continham 5 µg de antígeno e 0,1 mg do adjuvante Hidróxido de Alumínio dissolvidos em um volume final de 100 µL de PBS estéril (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4). As imunizações foram realizadas da mesma forma em todos os animais, isto é, por via subcutânea na região dorsal.

Quadro 2: Grupos experimentais rAsQuimeraII.

Grupos	Subgrupos	Composição
Ninfas do Laboratório (L)	Controle 1 (LC1)	PBS
	Controle 2 (LC2)	PBS + adj
	Vacina 1 (LV1)	rAs8.9kDa + adj
	Vacina 2 (LV2)	rAsQuimeraII + adj
Ninfas de Campo (I)	Controle 1 (IC1)	PBS
	Controle 2 (IC2)	PBS + adj
	Vacina 1 (IV1)	rAs8.9kDa + adj
	Vacina 2 (IV2)	rAsQuimeraII + adj

O desafio foi realizado com dois grupos distintos de ninfas de *A. sculptum*. As ninfas do grupo L foram obtidas da colônia mantida no laboratório (LAH), que originalmente foi formada a partir de carrapatos coletados em Pedro Leopoldo e vem sendo mantida em laboratório por mais de cinco anos. As ninfas do grupo I foram obtidas a partir de teleóginas coletadas de campo em Itabirito (MG), que foram mantidas em estufa até a postura de ovos e eclosão das larvas que, em seguida foram alimentadas em camundongos até gerar ninfas com 20 a 40 dias seguindo os métodos descritos no item 4.2. O desafio com as ninfas foi realizado 15 dias após a terceira e última dose vacinal, em que cada camundongo foi infestado com 10 ninfas.

Os seguintes parâmetros relacionados à alimentação das ninfas em camundongos imunizados foram analisados: tempo de alimentação, peso final após alimentação, mortalidade e porcentagem de muda.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do software GraphPad Prism 7.0 e representados pela média $\pm$ desvio padrão. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$). Para dados com distribuição normal, foi feita a comparação entre dois grupos pelo Teste T, enquanto utilizou-se o Teste de Mann-Whitney para grupos com distribuição não paramétrica. No caso de comparação entre mais de dois grupos, foi feito o ANOVA e o pós-teste de Tukey ou ANOVA-Dois fatores e pós teste de Bonferroni ou Sidak's.

Para dados que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn's. Utilizou-se o teste exato de Fisher para analisar dados categóricos. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Eficácia das formulações vacinais com a saponina

5.1.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes utilizadas nas formulações vacinais

A indução da expressão das proteínas recombinantes foi realizada e, após 3 horas de indução, uma fração foi coletada de cada cultura contendo os clones recombinantes. Como controle negativo, foram utilizados os mesmos clones cultivados nas mesmas condições, porém sem a adição de IPTG. As amostras foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), tendo sido observada a expressão bem-sucedida das proteínas recombinantes.

Após as etapas de purificação realizadas com o uso de colunas de afinidade His Trap® Hp, alíquotas das proteínas rAs8.9kDa, rAsBasicTail, rAsKunitz e rAsQuimera foram analisadas por SDS-PAGE a 12,5%. As imagens obtidas dos géis evidenciaram bandas correspondentes às proteínas recombinantes, indicando purificação eficiente (Figura 6). No gel, verificou-se que a banda correspondente à alíquota da rAsKunitz migrava próximo da faixa de 15 kDa, assim como a proteína rAs8.9kDa. A banda referente à rAsBasicTail, a maior entre as recombinantes analisadas, apresentou migração próxima à marca de 20 kDa no padrão.

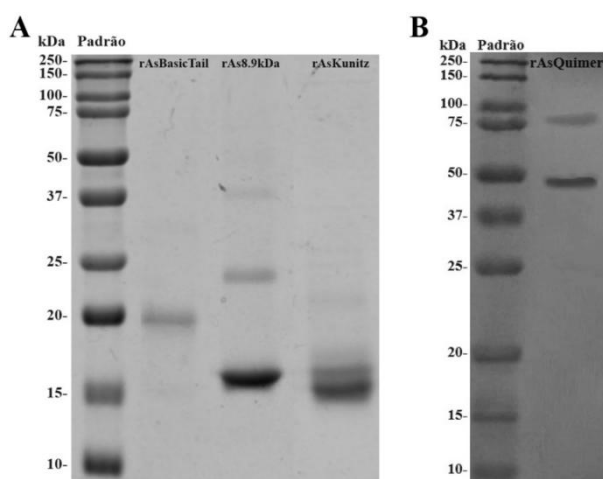


Figura 6: Avaliação das purificações das proteínas recombinantes utilizadas nas formulações vacinais. A- Visualização das proteínas recombinantes salivares por eletroforese em gel

poliacrilamida contendo SDS a 10%; B- Visualização da proteína recombinante quimérica por eletroforese em gel poliacrilamida contendo SDS a 10%.

5.1.2 Vacinação dos hospedeiros e avaliação da inocuidade das formulações vacinais

As proteínas recombinantes produzidas foram utilizadas na elaboração das formulações vacinais contendo saponina, sendo posteriormente empregadas nas imunizações de camundongos Swiss utilizados como modelo experimental. Durante o ensaio pré-clínico, não foram observadas reações adversas em nenhum dos grupos experimentais após a administração das formulações. Não foram identificadas evidências de nódulos, pápulas ou úlceras no local de aplicação, tampouco alterações comportamentais nos animais imunizados.

O peso dos camundongos foi monitorado antes (D-2) e após (D40) as vacinações com o objetivo de avaliar possíveis alterações relacionadas à administração das formulações vacinais (Figura 7).

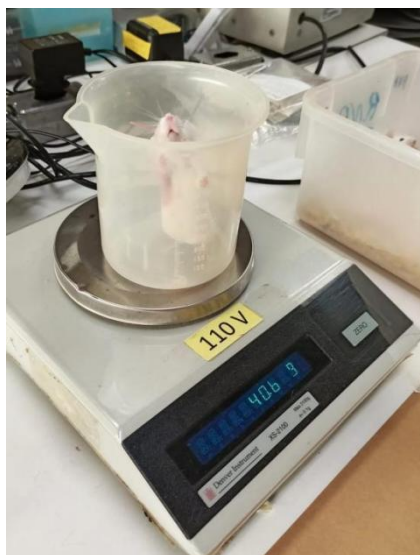


Figura 7: Camundongo tendo seu peso mensurado.

Observou-se que a média de peso dos camundongos após as imunizações (D40) foi superior à média registrada antes das imunizações (D-2) em todos os grupos experimentais ($p < 0,001$) (Figura 8). No entanto, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os grupos dentro de cada intervalo temporal.

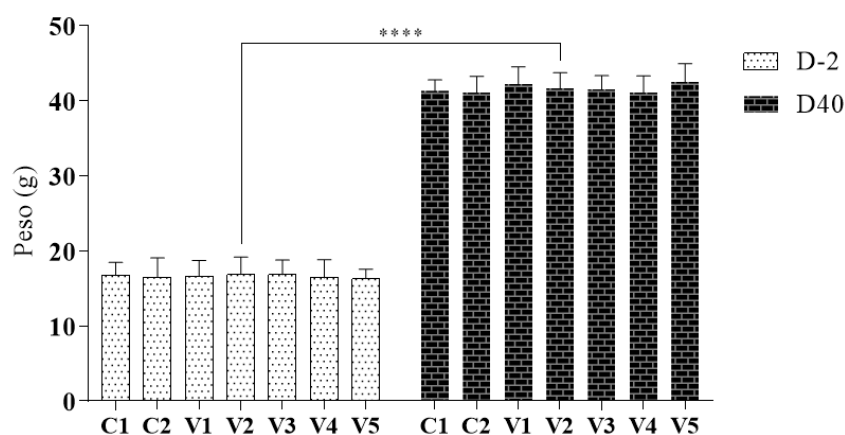


Figura 8: Média de peso dos camundongos em D-2 e D40 dos ensaios vacinais. C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-K8.9BtQui+adj. Dados representados por média $\pm$ DP. Análise estatística: ANOVA – dois fatores seguido do teste de comparação múltipla de Sidak's, ****indicam diferença estatística entre D-2 e D40 para cada grupo ($p < 0,001$).

5.1.3 Parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais dos grupos experimentais

Antes da primeira imunização (D-2) e 10 dias após a terceira dose (D40) coletou-se o sangue de todos os animais para avaliação dos parâmetros bioquímicos e as funções hepática e renal. Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre nenhum dos grupos comparados, tanto entre o D-2 e o D40 quanto entre os grupos no D40 ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2: Função renal e hepática dos camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais

Tempos	Grupos	Ureia mg/dL	Creatina mg/dL	ALT U/L	AST U/L
D-2		65,6 ± 11,9	0,5 ± 0,7	77,8 ± 7,9	127,3 ± 18,2
D40	C1	67,1 ± 1,3	0,5 ± 0,1	86,5 ± 29,6	123,7 ± 16,2
	C2	59,8 ± 16,1	0,2 ± 0,1	85,4 ± 9,3	136,4 ± 15
	V1	66,8 ± 10,1	0,2 ± 0,2	74,5 ± 12,8	108,6 ± 18,8
	V2	68,2 ± 15,5	0,6 ± 0,8	78 ± 12	115,4 ± 12,6
	V3	68 ± 12,3	0,5 ± 0,3	72,6 ± 12,4	99,5 ± 25,3
	V4	66,5 ± 9,4	0,5 ± 0,4	76,5 ± 16,2	125 ± 45,1
	V5	69,6 ± 11	0,3 ± 0,2	70,4 ± 4,8	110,8 ± 13,4

D-2 = Controle (2 dias antes da primeira dose); D40 = 10 dias após a terceira e última dose; ALT-alanina aminotransferase; AST-aspartato aminotransferase; C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-K8.9BtQui+adj. Dados representados por média ± DP. Análise estatística: Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's. Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre nenhum dos grupos comparados, tanto entre o D-2 e o D40 quanto entre os grupos no D40.

Da mesma forma, foram realizadas análises dos parâmetros hematológicos da série vermelha. Os resultados obtidos mostraram que apenas na avaliação da hemoglobina (HGB) o valor do grupo C2 (PBS+adj) foi significativamente maior que o valor do grupo V3 (8.9Qui+adj) ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros hematológicos dos camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.

Tempos	Grupos	Eritrocitos x 10 ⁶ /uL	Plaquetas x 10 ³ /uL	HGB g/dL	VCM fL	HCM pg	CHCM g/dL	Leucocitos x 10 ³ mm
D-2		7,8 ± 0,1 a	487 ± 71,0 a	14,6 ± 0,7 ab	61,8 ± 3,7 a	18,7 ± 1,0 a	30,4 ± 2,5 a	5,4 ± 0,7 a
	C1	8,0 ± 0,3 a	465,3 ± 41,8 a	15,7 ± 0,6 ab	60,8 ± 3,2 a	17,3 ± 0,3 a	29,3 ± 1,5 a	6,0 ± 0,3 a
	C2	8,4 ± 0,1 a	459,7 ± 26,1 a	16,7 ± 0,5 a	63,9 ± 1,5 a	17,9 ± 0,4 a	30,5 ± 2,0 a	6,6 ± 0,5 a
	V1	8,0 ± 0,4 a	505,7 ± 14,6 a	15,7 ± 0,9 ab	58,7 ± 3,7 a	17,9 ± 0,8 a	32,5 ± 2,7 a	6,4 ± 0,7 a
D40	V2	8,1 ± 0,6 a	460,3 ± 28,0 a	15,6 ± 1,6 ab	60,1 ± 3,9 a	19,0 ± 0,4 a	32,0 ± 2,8 a	6,8 ± 0,9 a
	V3	7,4 ± 0,3 a	531,3 ± 36,9 a	14 ± 0,7 b	62,7 ± 2,5 a	18,1 ± 0,4 a	30,5 ± 3,0 a	6,2 ± 1,5 a
	V4	7,6 ± 0,2 a	494 ± 40,0 a	15,0 ± 0,8 ab	62,5 ± 1,1 a	18,7 ± 0,9 a	31,5 ± 3,0 a	6,8 ± 1,2 a
	V5	7,6 ± 0,7 a	494,7 ± 32,6 a	14,5 ± 1 ab	59,5 ± 2,2 a	18,8 ± 0,6 a	31,6 ± 1,6 a	6,5 ± 0,7 a

D-2 = Controle (2 dias antes da primeira dose); D40 = 10 dias após a terceira e última dose; HGB-Hemoglobina; HCM-hemoglobina corpuscular média; VCM-Volume corpuscular médio; CHCM-Concentração de hemoglobina corpuscular média; C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-K8.9BtQui+adj. Dados representados por média ± DP. Análise estatística: ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Tukey. Valores em uma coluna seguidos por letras diferentes apresentam diferenças significativas (p<0,05).

5.1.4 Imunofenotipagem *ex vivo* de leucócitos circulantes em camundongos

Através da citometria de fluxo, realizou-se análises *ex vivo* dos isolados de células brancas do sangue dos animais. Foram identificadas as porcentagens de linfócitos T CD3⁺CD4⁺, linfócitos T CD3⁺CD8⁺, monócitos CD14⁺ e linfócitos B CD19⁺ a fim de avaliar mudanças nos perfis de subpopulações de linfócitos totais e de monócitos e comparar os grupos experimentais (Figura 9).

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nas porcentagens de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ (Figura 9A). Em relação aos linfócitos T CD3⁺CD8⁺, a única alteração significativa identificada foi uma redução ($p < 0,05$) nos níveis do grupo V4 (K8.9Qui+adj) no D40, em comparação ao D-2 e ao grupo controle C1 (PBS) no mesmo tempo experimental (Figura 9B).

Para os monócitos CD14⁺, verificou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis dos grupos V4 (K8.9Qui+adj) e V5 (K8.9BtQui+adj) no D40, quando comparados ao D-2 (Figura 9C). No caso dos linfócitos B CD19⁺, observou-se aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) nos grupos C2 (PBS+adj), V1 (KQui+adj), V2 (BtQui+adj) e V4 (K8.9Qui+adj) no D40, em relação aos grupos D-2 e C1 (PBS) no mesmo tempo experimental.

Adicionalmente, foi identificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os níveis do grupo C2 (PBS+adj) e os grupos V3 (8.9Qui+adj) e V5 (K8.9BtQui+adj), com valores mais baixos nestes dois últimos (Figura 9D).

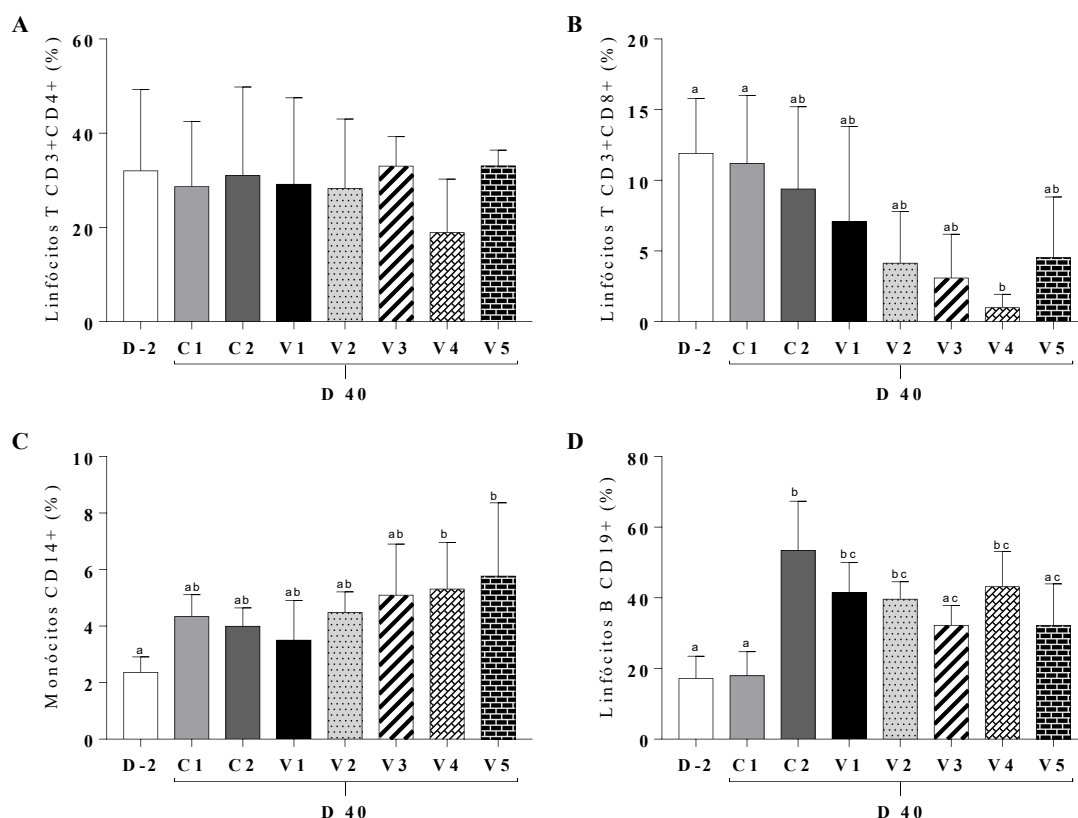


Figura 9: Avaliação percentual imunofenotípica de leucócitos dos camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais. A-Linfócitos T CD3+CD4, B-Linfócitos T CD3+CD8, C-Monócitos CD14+, e D-Linfócitos B C19+. Grupos experimentais: D-2 = Controle (2 dias antes do início das imunizações), D40 = 10 dias após o fim da imunização; C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-K8.9BtQui+adj. Dados representados por média $\pm$ DP. Análise estatística: ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os grupos que possuem letras diferentes apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.1.5 Produção de anticorpos antígeno-específicos no soro dos grupos experimentais imunizados

Através da quantificação dos níveis de IgG utilizando a técnica do ELISA indireto, realizou-se a avaliação da resposta humoral antígeno-específica dos hospedeiros imunizados. A análise mostrou que todos os antígenos testados provocaram uma indução da resposta

humoral com o aumento da produção de IgG antígeno-específico, porém em níveis diferentes em cada grupo (Figura 10).

Na Figura 10A, 10B e 10C onde as placas foram sensibilizadas com rAsKunitz, rAs8.9kDa e rAsBasicTail, respectivamente, observa-se o aumento significativo dos níveis de IgG antígeno-específicos nos grupos que contêm as formulações vacinais a partir do D40 ($p < 0,05$), 10 dias após a aplicação da terceira e última dose da vacina. Os níveis de anticorpos se mantêm altos até os 45 dias após a aplicação da última dose (D75). No gráfico da placa sensibilizado com a rAsQuimera também se constatou o aumento dos níveis de anticorpos nos grupos que contêm as formulações vacinais a partir do D40, 10 dias após a aplicação da terceira e última dose da vacina. Porém, após o D40 observa-se uma diminuição nos níveis de anticorpos nos dias seguintes, apesar dos mesmos continuarem significativamente ($p < 0,05$) acima do grupo controle (C1) (Figura 10D).

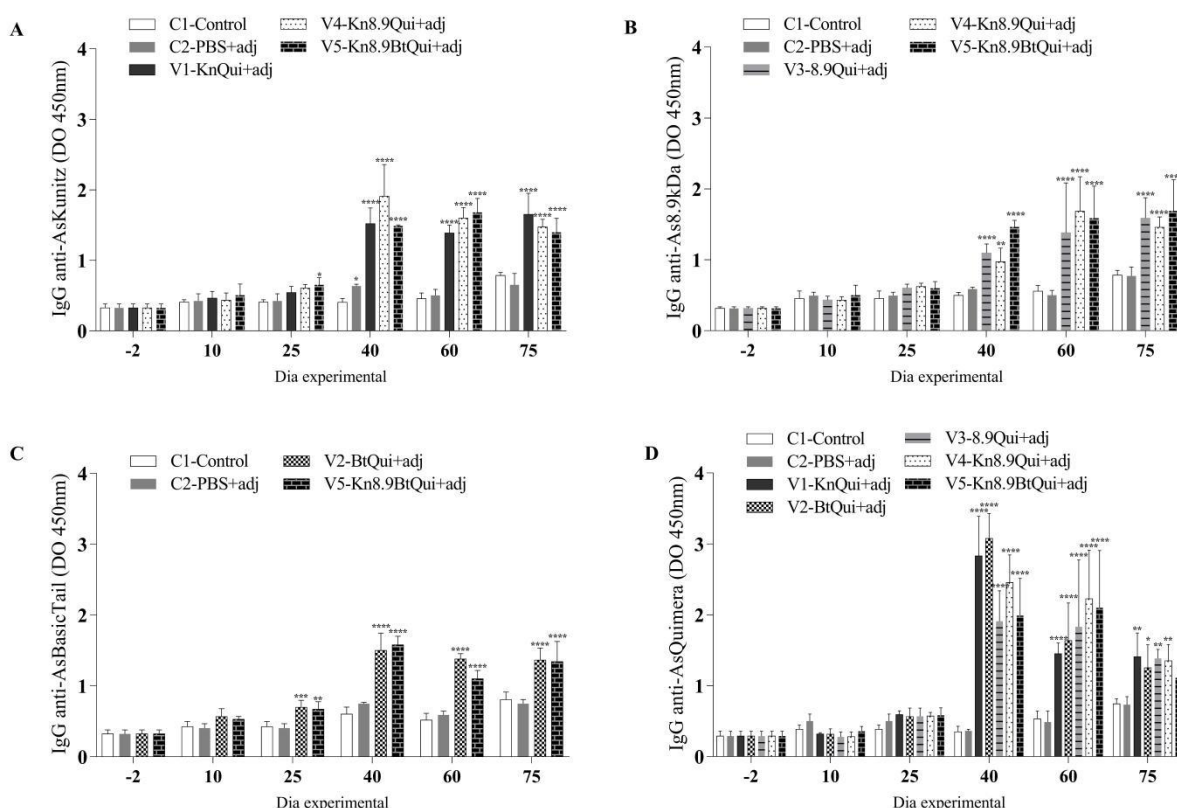


Figura 10: Avaliação da resposta antígeno-específica produzida a partir da vacinação de camundongos com as formulações vacinais. Os níveis de IgG totais no soro dos animais foram avaliados a partir da técnica de ELISA indireto e cada tempo foi comparado com seu respectivo do grupo controle (C1). Dias: D-2 = 2 dias antes da primeira dose; D10 = 10 dias após a primeira dose; D25 = 10 dias após a segunda dose; D40 = 10 dias após a terceira e última dose; D60 = 30 dias após a última dose; D75 = 45 dias após a última dose. As placas foram sensibilizadas

com cada antígeno separadamente sendo: A – rAsKunitz; B – rAs8.9kDa, C – rAsBasicTail; D – rAsQuimera. Dados representados por média $\pm$ DP. Análise estatística: ANOVA – dois fatores seguido do teste de comparação múltipla de Dunnett's; * $p < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ indicam diferença para D-2.

5.1.6 Parâmetros alimentares de larvas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados

Diferentes parâmetros biológicos das larvas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as formulações vacinais foram mensurados. A porcentagem de mortalidade das larvas alimentadas nesses camundongos variou de 48 a 74,4, sendo que as formulações vacinais não induziram mortalidade maior em relação aos controles (Tabela 4). A menor porcentagem de mortalidade foi a do grupo V4 (K8.9Qui+adj) com 48% de mortalidade. Já no grupo V1 (KQui+adj) foi onde tivemos a maior porcentagem de mortalidade (74,4%). A mortalidade do grupo controle (C1) foi a terceira mais alta, chegando a 64,4%.

Tabela 4: Porcentagem da mortalidade de larvas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.

	C1	C2	V1	V2	V3	V4	V5
n experimental	250	250	250	200	300	300	300
Larvas recuperadas	89	105	64	102	93	156	111
*Mortalidade (%)	64,4	58	74,4	49	69	48	63

C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-K8.9BtQui+adj. * A mortalidade foi avaliada do momento da adição das larvas na câmara de alimentação até o final do repasto sanguíneo.

O tempo de alimentação e o peso final das larvas foi avaliado (Figura 11). As larvas do grupo C1 (PBS) completaram a sua alimentação em um tempo menor que as larvas dos grupos C2 (PBS+adj) e V4 (K8.9Qui+adj). As larvas do grupo C2 (PBS+adj) e V4 (K8.9Qui+adj) tiveram um tempo de alimentação maior que as larvas do grupo V5

(K8.9BtQui+adj) ($p<0,05$) (Figura 11A). O peso final das larvas alimentadas não apresentou diferença estatística ($p>0,05$) (Figura 11B).

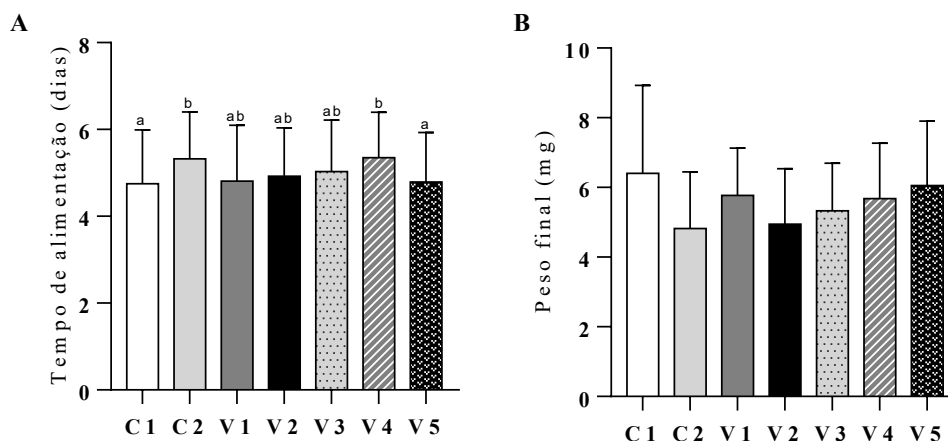


Figura 11: Tempo de alimentação e peso final de larvas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as formulações vacinais. A - Tempo médio de alimentação; B - Peso final médio após alimentação; C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-K8.9BtQui+adj. . Dados representados por média $\pm$ DP. Análise estatística: Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's, Os grupos que possuem letras diferentes apresentam diferenças significativas ($p<0,05$).

A porcentagem de muda de larvas para ninfas também foi avaliada. A porcentagem entre os grupos teve uma variação de 59% a 83,8% (Tabela 5). O grupo V5 (K8.9BtQui+adj) foi o grupo com a maior porcentagem de muda seguido pelo grupo V1 (KQui+adj) e pelo grupo controle (C1). A menor porcentagem de muda foi do grupo V4 (K8.9Qui+adj).

Tabela 5: Porcentagem de muda de larvas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.

	C1	C2	V1	V2	V3	V4	V5
Larvas recuperadas	89	105	64	102	93	156	111
Muda	72	71	53	79	60	92	93
Porcentagem (%)	80,9	67,6	82,8	77,5	64,5	59	83,8

C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-

K8.9BtQui+adj.

A Tabela 6 mostra os dados obtidos sobre a mortalidade ao longo de todo o desafio parasitário com as larvas. O grupo com a maior taxa de mortalidade total foi o grupo V3 (8.9Qui+adj) com 80% de mortalidade. Já o grupo com a menor taxa de mortalidade foi o grupo V2 (BtQui+adj) com 60,5% de mortalidade.

Tabela 6: Porcentagem da mortalidade de larvas de *A. sculptum* ao longo de todo o desafio parasitário.

	C1	C2	V1	V2	V3	V4	V5
n experimental	250	250	250	200	300	300	300
Muda	72	71	53	79	60	92	93
*Mortalidade (%)	71,2	71,6	78,8	60,5	80,0	69,3	69,0

C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-K8.9BtQui+adj. * A mortalidade foi avaliada da colocação das larvas na câmara de alimentação até o final da muda de larvas para ninfas.

5.1.7 Parâmetros alimentares de ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados

Diferentes parâmetros biológicos das ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as formulações vacinais foram mensurados. A porcentagem de mortalidade das ninfas alimentadas nesses camundongos variou de 12,5% a 40% (Tabela 7). A menor porcentagem de mortalidade foi a do grupo V2 (BtQui+adj) com 12,5% de mortalidade. Já no grupo C2 (PBS+adj) verifica-se a maior porcentagem de mortalidade (40%). A mortalidade do grupo controle (C1) foi a segunda mais alta, chegando a 32,5%.

Tabela 7: Porcentagem da mortalidade de ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.

	C1	C2	V1	V2	V3	V4	V5
n experimental	40	50	50	40	40	30	30
Ninfas recuperadas	27	30	34	35	28	26	22
*Mortalidade (%)	32,5	40	32	12,5	30	13,3	26,7

C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-K8.9BtQui+adj. * A mortalidade foi avaliada da colocação das ninfas na câmara de alimentação até o final do repasto sanguíneo.

O tempo de alimentação e o peso final das ninfas foi avaliado (Figura 12), porém em nenhum dos dois parâmetros observou-se diferenças significativas ($p>0,05$).

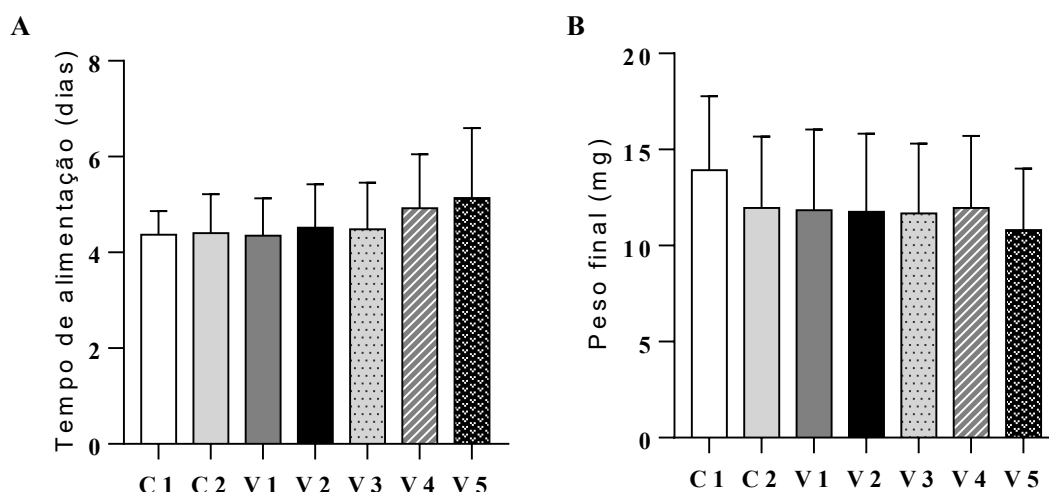


Figura 12: Tempo de alimentação e peso final de ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as formulações vacinais. A - Tempo médio de alimentação; B - Peso final médio após alimentação; C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-K8.9BtQui+adj. Dados representados por média $\pm$ DP. Análise estatística: Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's. Não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre C1 e nenhum dos outros grupos.

A porcentagem de muda de ninfas para adultos também foi avaliada. A porcentagem

entre os grupos teve uma variação de 81,8% a 100% (Tabela 8). Os grupos C1 (PBS), C2 (PBS+adj), V1 (KQui+adj), V2 (BtQui+adj) e V4 (K8.9Qui+adj) tiveram 100% de muda. A menor porcentagem de muda foi do grupo V5 (K8.9BtQui+adj).

Tabela 8: Porcentagem de muda de ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.

	C1	C2	V1	V2	V3	V4	V5
Ninfas recuperadas	27	30	34	35	28	26	22
Muda	27	30	34	33	25	26	18
Porcentagem (%)	100	100	100	94,3	89,3	100	81,8

C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-K8.9BtQui+adj.

A Tabela 9 mostra os dados obtidos sobre a mortalidade ao longo de todo o desafio parasitário com as ninfas. Os grupos com a maior taxa de mortalidade total foram os grupos C2 (PBS+adj) e V5 (K8.9BtQui+adj) com 40% de mortalidade cada. Já o grupo com a menor taxa de mortalidade foi o grupo V4 (K8.9Qui+adj) com 13,3% de mortalidade.

Tabela 9: Porcentagem da mortalidade de ninfas de *A. sculptum* ao longo de todo o desafio parasitário.

	C1	C2	V1	V2	V3	V4	V5
n experimental	40	50	50	40	40	30	30
Muda	27	30	34	33	25	26	18
*Mortalidade (%)	32,5	40,0	32,0	17,5	37,5	13,3	40,0

C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-K8.9BtQui+adj. * A mortalidade foi avaliada da colocação das ninfas na câmara de alimentação até o final da muda de ninfas para adultos.

5.1.8 Parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados

Diferentes parâmetros biológicos e reprodutivos das fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as formulações vacinais foram mensurados. A porcentagem de recuperação das fêmeas alimentadas nesses camundongos foi 100% na maioria dos grupos (Tabela 10). Apenas o grupo V1 (KQui+adj) e o grupo V5 (K8.9BtQui+adj) tiveram mortalidade.

Tabela 10: Porcentagem de recuperação de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.

	C1	C2	V1	V2	V3	V4	V5
n experimental	5	5	5	5	5	5	5
Fêmeas recuperadas	5	5	4	5	5	5	3
*Recuperação (%)	100	100	80	100	100	100	60

C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-K8.9BtQui+adj. * A recuperação foi avaliada da colocação das fêmeas na câmara de alimentação até o final do repasto sanguíneo.

Os dados relacionados ao tempo médio necessário para a realização do processo alimentar (Figura 13A), o peso final das fêmeas após o fim do processo (Figura 13B), o peso médio da massa de ovos gerada por cada uma delas (Figura 13C) e a porcentagem de eclosão dos ovos (Figura 13D) também foram obtidos. No entanto, as variações observadas dentre os diferentes grupos imunizados não foram significativas ($p>0,05$) em relação ao controle.

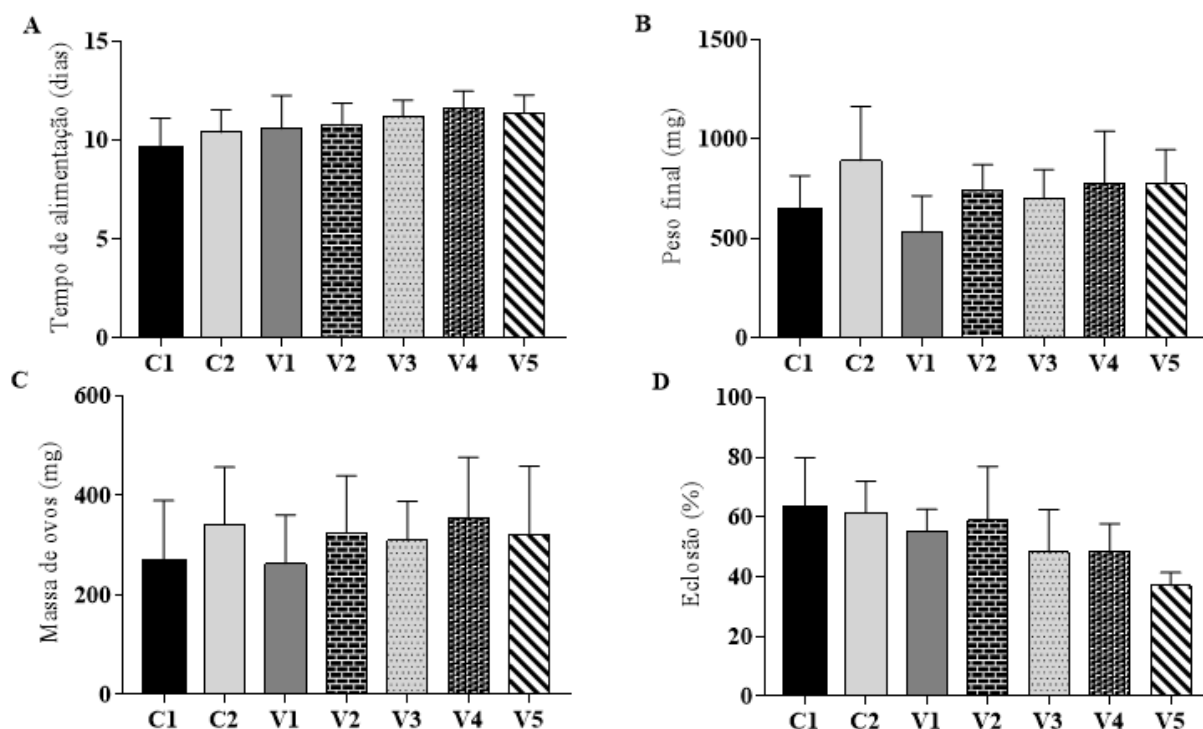


Figura 13: Parâmetros alimentares e reprodutivos de fêmeas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com os alvos vacinais. A - Tempo médio de alimentação; B - Peso final médio após alimentação; C - Peso médio da massa de ovos produzidos pelas fêmeas; D - Taxa de eclosão dos ovos; C1-PBS; C2-PBS+adj; V1-KQui+adj; V2-BtQui+adj; V3-8.9Qui+adj; V4-K8.9Qui+adj; V5-K8.9BtQui+adj. Dados representados por média $\pm$ DP. Análise estatística: Kruskal Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's. Não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre os grupos.

5.1.9 Eficácia vacinal das diferentes formulações vacinais

Considerando que *A. sculptum* é um carrapato trioxeno, a avaliação da eficácia vacinal das formulações foi feita a partir de cálculos que levaram em consideração os resultados obtidos com os três estágios de vida do carrapato conforme a fórmula usada por Aguirre et al. (2015) (Tabela 11).

Tabela 11: Valores para cálculo da eficácia vacinal baseado nos parâmetros obtidos nos desafios parasitários com os três estágios de desenvolvimento de *A. sculptum*.

Grupos	RL	VL	RN	VN	RA	OA	FE
C1 (PBS)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
C2 (PBS+adj)	1,18	0,99	1,11	1,11	1,00	1,27	0,97
V1 (KQui+adj)	0,72	0,74	1,26	1,26	0,80	0,98	0,87
V2 (BtQui+adj)	1,15	1,10	1,30	1,22	1,00	1,21	0,93
V3 (K8.9Qui+adj)	1,04	0,83	1,04	0,93	1,00	1,15	0,76
V4 (K8.9Qui+adj)	1,75	1,28	0,96	0,96	1,00	1,32	0,76
V5 (K8.9BtQui+adj)	1,25	1,29	0,81	0,67	0,60	1,20	0,59

RL é o efeito na recuperação de larvas ingurgitadas. Esta variável é calculada pela razão entre as larvas ingurgitadas recuperadas do grupo vacinado (**rlv**) em relação ao grupo controle C1 (**rlc**). $RL=(rlv/rlc)$.

VL é o efeito sobre a viabilidade de larvas ingurgitadas. Esta variável é calculada com base na razão entre o número total de larvas ingurgitadas recuperadas que mudaram para ninfas do grupo vacinado (**vlv**) em comparação com o grupo controle C1 (**vlc**). $VL=(vlv/vlc)$.

RN é o efeito na recuperação de ninfas ingurgitadas. Essa variável é calculada como a razão entre as ninfas ingurgitadas recuperadas do grupo vacinado (**rnv**) em relação ao grupo controle C1 (**rnc**). $RN=(rnv/rnc)$.

VN é o efeito sobre a viabilidade de ninfas ingurgitadas. Esta variável é calculada com base na razão entre o número total de ninfas ingurgitadas recuperadas que mudaram para adultos do grupo vacinado (**vnv**) em comparação com o grupo controle C1 (**vnc**). $VN=(vnv/vnc)$.

RA é o efeito na recuperação de adultos ingurgitados. Essa variável é calculada como a razão entre os adultos ingurgitados recuperados do grupo vacinado (**rav**) em comparação com o grupo controle C1 (**rac**). $RA=(rav/rac)$.

OA é o efeito na oviposição de fêmeas adultas. Esta variável é calculada com base no peso médio da massa de ovos postos por fêmeas ingurgitadas recuperadas do grupo vacinado (**oav**) em comparação com o grupo controle C1 (**oac**). $OA = (oav/oac)$.

FE é o efeito sobre a fertilidade do ovo. Essa variável é calculada com base na razão entre a eclodibilidade, em porcentagem, de larvas de ovos postos por adultos ingurgitados recuperados do grupo vacinado (**fev**) em comparação com o grupo controle C1 (**fec**). $FE=(fev/fec)$.

Os resultados dos grupos vacinados demonstraram valores da eficácia vacinal que variam de 0 a 61,0% (Tabela 12). Os grupos C2 (PBS+adj), V2 (BtQui+adj) e V4 (K8.9Qui+adj) não apresentam nenhuma eficácia vacinal. O grupo V5 (K8.9BtQui+adj) apresentou a maior eficácia vacinal chegando a 61,0%, enquanto V1 (KQui+adj) e V3 (8.9Qui+adj) tiveram eficácias entre 40 e 50%.

Tabela 12: Eficácia vacinal das formulações vacinais contra o carrapato *A. sculptum*.

Grupos	Eficácia Vacinal (%)[±]
C1 (PBS)	0
C2 (PBS+adj)	0
V1 (KQui+adj)	49,3
V2 (BtQui+adj)	0
V3 (8.9Qui+adj)	43,6
V4 (K8.9Qui+adj)	0
V5 (K8.9BtQui+adj)	61,0

*Eficácia vacinal (%) = $100*[1 - (RL*VL*RN*VN*RA*OA*FE)]$. Obs.: Para informações sobre os parâmetros usados no cálculo de E (%), consultar a legenda da Tabela 11.

5.2 Construção e potencial vacinal da rAsQuimeraII

5.2.1 Identificação das regiões antigênicas das proteínas AsKunitz, As8.9kDa, AsBasicTail e AsQuimera

Para identificar as regiões mais antigênicas de cada uma das proteínas usadas nos experimentos de vacinação, 175 peptídeos contendo as sequências de aminoácidos das proteínas salivares e da quimera foram sintetizados em uma membrana de nitrocelulose que foi hibridizada com os anticorpos de camundongos imunizados com as proteínas isoladamente.

O valor densitométrico de cada *spot* foi calculado utilizando o software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012) com o *plug-in* Protein Array Analyser

(<http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Protein-Array-Analyzer-for-ImageJ.html>). O *cut-off* mínimo de reatividade 17.672,72, baseado na média mais duas vezes o desvio padrão do valor de todos os *spots* na membrana avaliada com os camundongos que não foram imunizados com as proteínas recombinantes. Os peptídeos que tiveram valor acima do *cut-off* no ensaio com os soros de camundongos que foram imunizados com as proteínas recombinantes AsBasicTail, AsQuimera, As8.9kDa e AsKunitz foram considerados.

Cada ponto corresponde a um peptídeo sintetizado na membrana de nitrocelulose (Figura 14). A reatividade de cada um deles é medida em uma escala que vai de preto (baixa), laranja (média) e branco (alta). O círculo azul claro em volta dos *spots* indica os peptídeos cujo valor densitométrico está acima do *cut-off* (média dos negativos + 2* desvio padrão dos negativos). A imagem também se apresenta com um diagrama de Venn mostrando as interseções dos conjuntos de peptídeos que reagiram com os soros de cada proteína recombinante.

O antissoro contra a AsBasicTail foi reativo somente para 3 peptídeos, sendo que um deles também reagiu com o antissoro contra a AsQuimera. O antissoro contra a AsQuimera foi reativo para 27 peptídeos, sendo que 12 desses peptídeos também foram reativos para o antissoro contra outras proteínas. O antissoro contra a As8.9kDa foi reativo para 25 peptídeos, sendo que 8 desses também reagiram com o antissoro de outras proteínas. O antissoro contra a AsKunitz foi reativo para 21 peptídeos, sendo que dois deles também reagiram com As8.9kDa, 5 reagiram com AsQuimera e 5 reagiram com AsQuimera e As8.9kDa juntos.

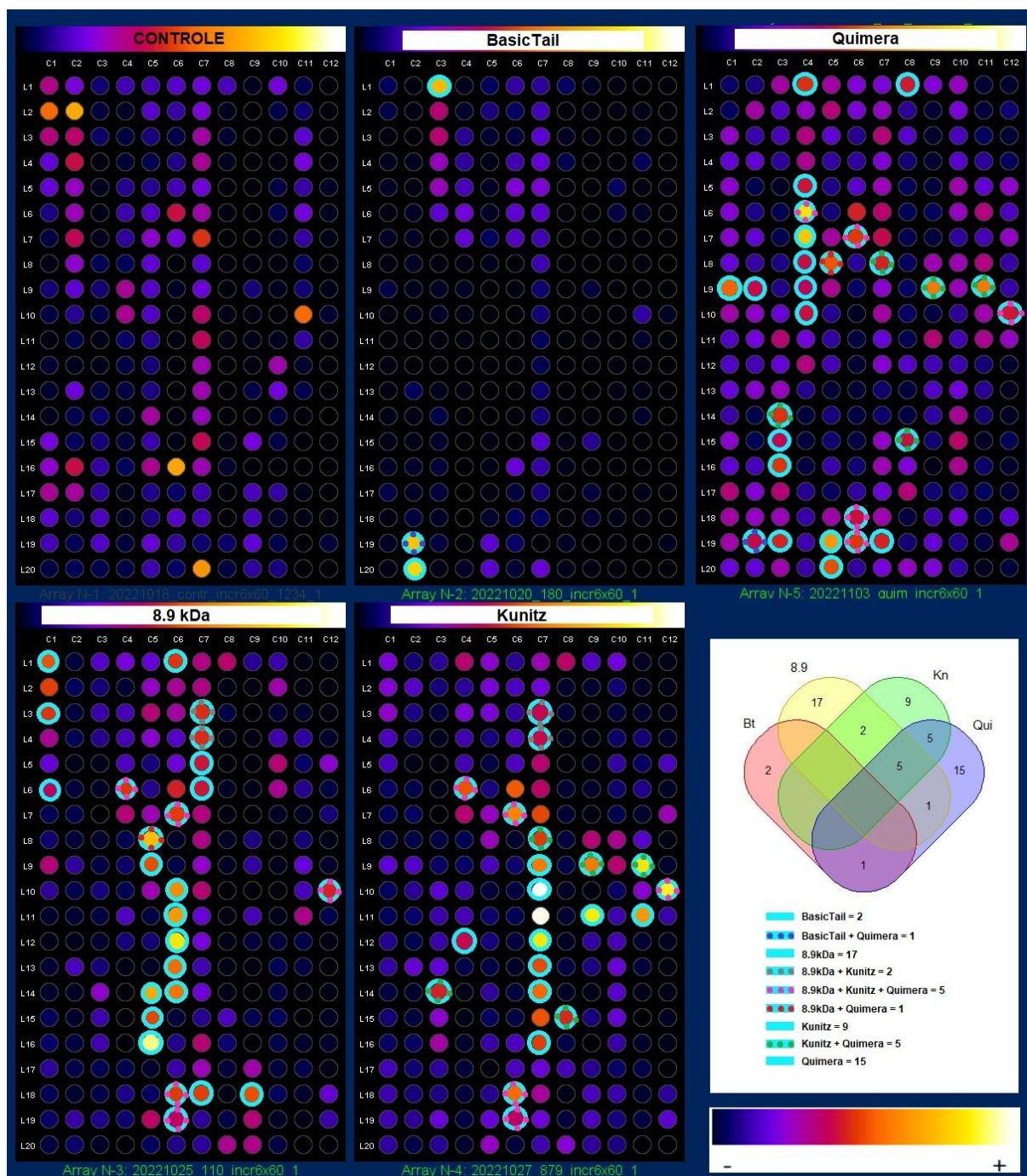


Figura 14: Histogramas e diagrama de Venn gerados de acordo com a reatividade de cada *spot* pelo software ImageJ utilizando a extensão “Protein Array Analyzer”. Reatividade medida em uma escala que vai de preto (baixa), laranja (média) e branco (alta). Os *spots* marcados em volta com a cor azul clara são os peptídeos que reconheceram os soros.

Dos 175 peptídeos analisados, 57 foram reativos com *pools* de soros de animais imunizados com pelo menos uma proteína recombinante. Os peptídeos reativos foram ranqueados em ordem decrescente dos que mais reagiram para os que menos reagiram, e então

foram selecionados os 22 peptídeos mais imunogênicos, que são mostrados na Tabela 13, assim como as proteínas recombinantes usadas na produção do antissoro e suas proteínas de origem. Alguns soros foram antígeno-específicos, porém outros reagiram com peptídeos de proteínas diferentes daquelas usadas na imunização dos animais. Observa-se que 16 dos 22 peptídeos selecionados foram reagentes a antissoros contra proteínas que não pertencem à sua proteína de origem. As proteínas AsBasicTail e AsQuimera foram as proteínas que tiveram mais peptídeos reagentes, enquanto as proteínas As8.9kDa e AsKunitz tiveram menos.

Tabela 13: Peptídeos imunogênicos selecionados a partir do *Immunoblotting*.

Antissoro	Sequência	Proteína de origem
8.9	TTGTQETKPTTVATT	AsBasicTail (Bt)
8.9 + Qui	GTRCKITHIPGVTEG	AsBasicTail (Bt)
8.9	RCKITHIPGVTEGVC	AsBasicTail (Bt)
Kn + 8.9 + Qui	SELEQHYEAMKARDPK	AsQuimera (Qui)
Kn	VVPPPAPATPDKRANM	AsQuimera (Qui)
Kn + Qui	PPLIEPTFAHDPRKAN	AsQuimera (Qui)
Kn + Qui	TTTLTLPPGPAKSVNP	AsQuimera (Qui)
Kn	IVRGCPPKDAQGSVV	AsBasicTail (Bt)
Qui	GHERPSIERWYFDAR	AsKunitz (Kn)
Qui	MTVCSDHSDPEGACR	AsKunitz (Kn)
Bt + Qui	VTVENGACIFERNLTPDGE	As8.9kDa (8.9)
8.9 + Qui	TEGVCIDLLGMEGCHPPNDTFARRFMKFW	AsBasicTail (Bt)
8.9 + Kn + Qui	KFWVKDNTTPTTGTQETKPTTVATTTTQ	AsBasicTail (Bt)
8.9	YKRPKFCYAKAKEGQCGHERPSIER	AsKunitz (Kn)
8.9 + Kn	TKRPKTSKKNKTKTSTKPTTEFSW	AsBasicTail (Bt)
8.9 + Kn + Qui	ATTTTQSSTTTKSKSTKKPKKTKKTK	AsBasicTail (Bt)
8.9 + Kn + Qui	KSTKKPKKTKKTKRPKTKRPKTSKKNKTK	AsBasicTail (Bt)
Kn + Qui	GKEQQSPSRPRPACTA	AsQuimera (Qui)
Kn + Qui	KRLIWEADHERKEAML	AsQuimera (Qui)
8.9 + Kn + Qui	RNFGVDPGCRVQWTPDGVYPQCCPRQV	As8.9kDa (8.9)
Kn + Qui	TCYAARREVNATLCRNFGVDPGCRV	As8.9kDa (8.9)
Qui	PDGVYPQCCPRQVCDGTN	As8.9kDa (8.9)

As 22 regiões antigênicas foram utilizadas para produzir uma proteína quimérica a ser usada como alvo vacinal. Para isto, foi montada uma sequência de nucleotídeos que continha

diferentes regiões que codificavam os 22 peptídeos selecionados, intercalados por nucleotídeos que codificavam a sequência GSGSG como espaçadores, além de nucleotídeos que codificavam duas caudas de histidina (no início e no final) e outros aminoácidos necessários para a clonagem em vetor de expressão (Figura 15). A proteína resultante foi denominada de AsQuimeraII e possui massa molecular de 57,3 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 9,73.

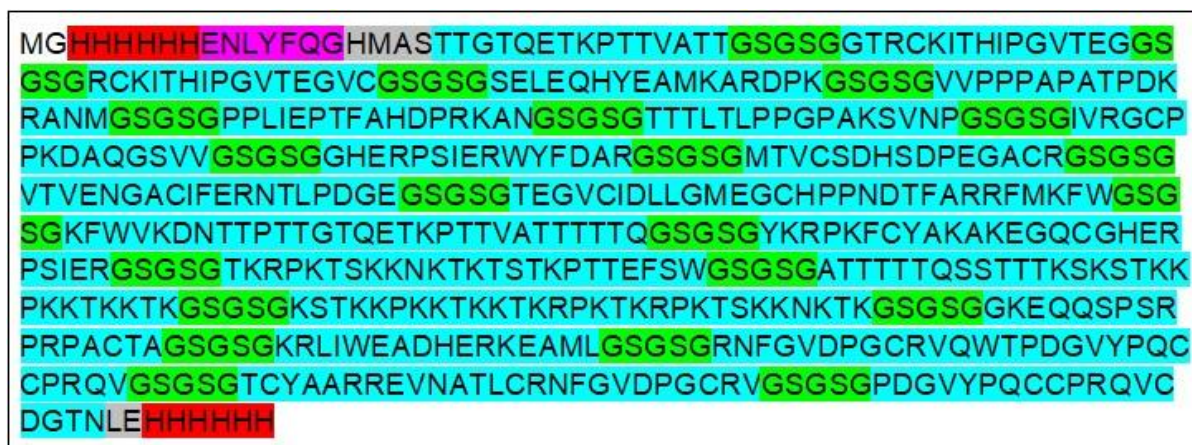


Figura 15: Sequência de aminoácidos da proteína AsQuimeraII. As regiões destacadas são: Vermelho = Caudas de polihistidina; Rosa = Sítio de clivagem para a enzima TEV; Cinza = Sítios de restrição utilizados para clonagem; Verde = Espaçadores; Azul = peptídeos selecionados.

5.2.2 Produção e purificação da AsQuimeraII

A indução da expressão da proteína recombinante rAsQuimeraII e sua purificação foi feita de forma semelhante às proteínas salivares e quimérica já descritas no item 4.4. Com 2 horas e 10 horas de indução por IPTG, uma alíquota foi avaliada em SDS-PAGE, assim como a proteína já purificada (Figura 16). É possível verificar na imagem que a banda relativa à proteína aparece no tempo 2 e 10 horas, assim como na purificada. Apesar do sucesso da purificação, observa-se a presença de duas bandas.

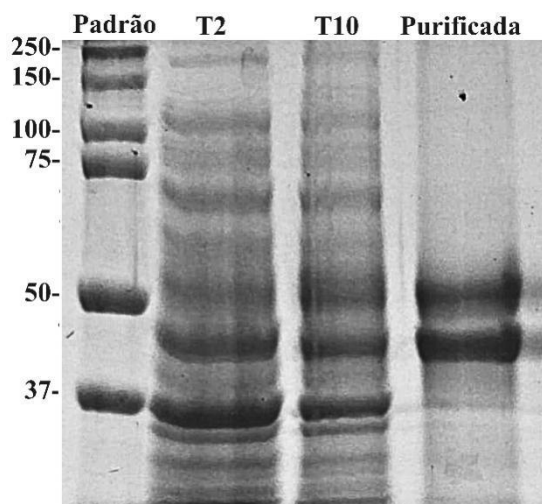


Figura 16: SDS-PAGE da proteína recombinante rAsQuimeraII após expressão em sistema heterólogo. T2 = 2 horas após a indução por IPTG; T10 = 10 horas após a indução por IPTG; Purificada = proteína purificada.

As proteínas purificadas foram submetidas a *Western Blot* utilizando um anticorpo anticauca de poli-histidina, e sua identidade foi confirmada através do reconhecimento das bandas observadas no SDS-PAGE com a protein purificada (Figura 17).

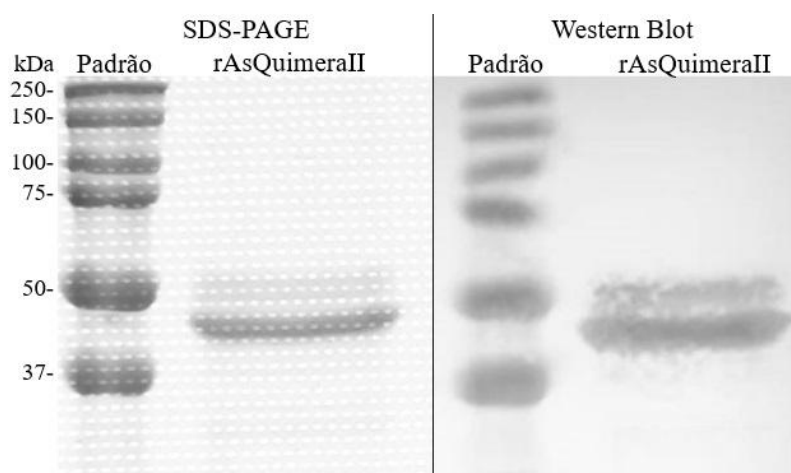


Figura 17: SDS-PAGE e *Western Blot* da proteína recombinante rAsQuimeraII.

5.2.3 Imunização vacinal com a rAsQuimeraII

Após a produção e confirmação da identidade da rAsQuimeraII, camundongos foram

submetidos ao ensaio pré-clínico vacinal, de acordo com o protocolo, sendo imunizados com a rAsQuimeraII e rAs8.9kDa, esta última para servir como comparativo com o trabalho de Costa et al. (2021) que também realizou imunização com a rAs8.9kDa e o hidróxido de alumínio. Durante o ensaio pré-clínico, não foram observadas reações adversas em nenhum dos grupos experimentais após a administração das formulações vacinais. Não houve evidência de nódulos, pápulas ou úlceras no local do inóculo, e não foram detectadas alterações comportamentais.

Através da quantificação dos níveis de IgG utilizando a técnica do ELISA indireto, foi realizada a avaliação da resposta humoral antígeno-específica dos hospedeiros imunizados. A análise mostrou que todos os antígenos testados provocaram uma indução da resposta humoral com o aumento da produção de IgG antígeno-específico ($p < 0,05$) (Figura 18).

Na Figura 18A, onde as placas foram sensibilizadas com rAs8.9kDa, pode-se observar o aumento significativo dos níveis de IgG antígeno-específicos nos grupos imunizados com antígenos (V1 e V2) a partir do D40 ($p < 0,05$), 10 dias após a aplicação da terceira e última dose da vacina. Os níveis de anticorpos se mantêm altos até os 45 dias após a aplicação da última dose (D75). No gráfico da placa sensibilizado com a rAsQuimeraII também se constatou o aumento dos níveis de anticorpos no V2 (QuiII+adj) a partir do D25 até o D75 (Figura 18B).

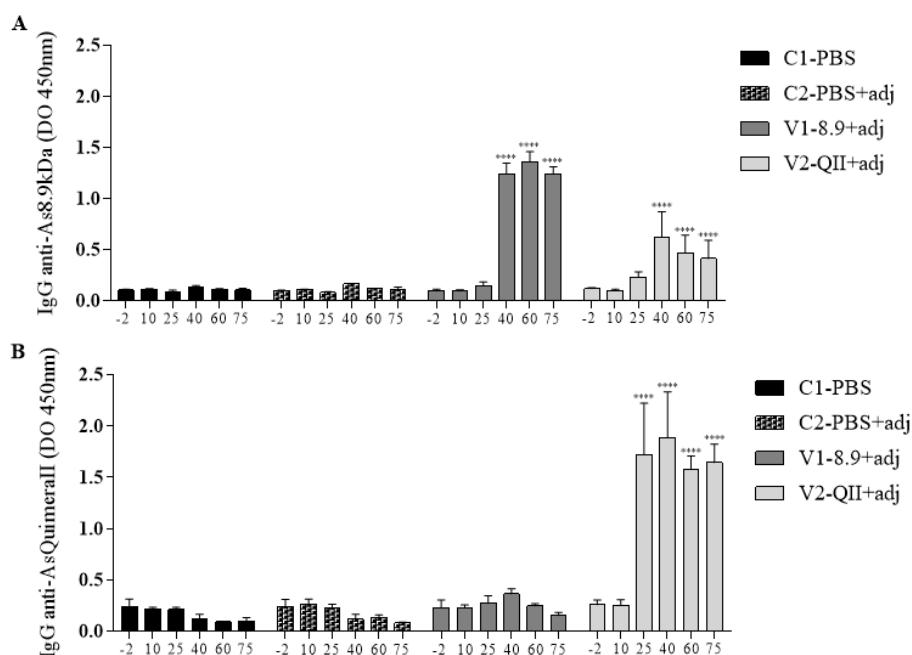


Figura 18: Avaliação da resposta antígeno-específica produzida a partir da imunização de camundongos com as proteínas rAs8.9kDa e rAsQuimeraII. Os níveis de IgG totais no soro dos animais foram avaliados a partir da técnica de ELISA indireto e cada tempo foi comparado com

seu respectivo do grupo controle (C1). Dias: D-2 = 2 dias antes da primeira dose; D10 = 10 dias após a primeira dose; D25 = 10 dias após a segunda dose; D40 = 10 dias após a terceira e última dose; D60 = 30 dias após a última dose; D75 = 45 dias após a última dose. As placas foram sensibilizadas com cada antígeno separadamente sendo: A – rAs8.9kDa; B – rAsQuimeraII. Dados representados por média $\pm$ DP. Análise estatística: ANOVA – dois fatores seguido do teste de comparação múltipla de Dunnett's; **** $p < 0,0001$ indica diferença para D-2.

Diferentes parâmetros biológicos das ninfas de *A. sculptum* do laboratório e de campo alimentadas em camundongos imunizados com as proteínas rAs8.9kDa e rAsQuimeraII foram mensurados.

A porcentagem de mortalidade das ninfas alimentadas nesses camundongos variou de 14 a 44% (Tabela 14). As menores porcentagens de mortalidade são dos grupos controles (C1 e C2) do laboratório e de campo. A maior mortalidade foi no grupo IV1 (8.9+adj), nos quais se encontram as ninfas de campo alimentadas em camundongos imunizados com a rAs8.9kDa.

Tabela 14: Porcentagem da mortalidade de ninfas de *A. sculptum* do laboratório e de campo alimentadas em camundongos imunizados com as proteínas rAs8.9kDa e rAsQuimeraII.

	Ninfas do Laboratório				Ninfas de Campo			
	LC1	LC2	LV1	LV2	IC1	IC2	IV1	IV2
n experimental	50	50	50	50	50	50	50	50
Ninfas recuperadas	37	36	30	32	43	40	28	33
*Mortalidade (%)	26	28	40	36	14	20	44	34

LC1-PBS; LC2-PBS+adj; LV1-8.9+adj; LV2-QuiII+adj; IC1-PBS; IC2-PBS+adj; IV1-8.9+adj; IV2-QuiII+adj. * A mortalidade foi avaliada da colocação das ninfas na câmara de alimentação até o final do repasto sanguíneo.

O tempo de alimentação e o peso final das ninfas foi avaliado (Figura 19), porém somente o peso final apresentou diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$). O peso médio final dos grupos LC2 (PBS+adj), LV1 (8.9+adj) e LV2 (QuiII+adj) foram estatisticamente menores ($p < 0,05$) que o peso médio dos grupos F-C2 e F-V1.

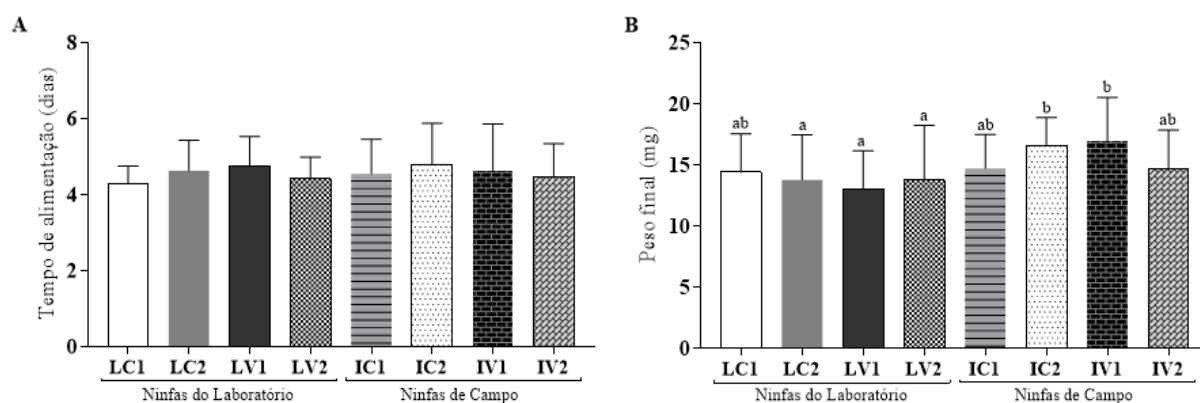


Figura 19: Tempo de alimentação e peso final de ninfas de *A. sculptum* alimentadas em camundongos imunizados com as proteínas rAs8.9kDa e rAsQuimeraII. A - Tempo médio de alimentação; B - Peso final médio após alimentação; LC1-PBS; LC2-PBS+adj; LV1-8.9+adj; LV2-QuiII+adj; IC1-PBS; IC2-PBS+adj; IV1-8.9+adj; IV2-QuiII+adj. Dados representados por média $\pm$ DP. Análise estatística: Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's. Os grupos que possuem letras diferentes apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

A porcentagem de muda de ninfas para adultos também foi avaliada. A porcentagem entre os grupos teve uma variação de 72,7 a 100% (Tabela 15). Todos os grupos onde as ninfas do laboratório foram utilizadas no desafio tiveram 100% de muda. A menor porcentagem de muda foi no grupo IV2, referente ao grupo dos carrapatos de campo alimentados em camundongos imunizados com a rAsQuimeraII.

Tabela 15: Porcentagem de muda de ninfas de *A. sculptum* de laboratório e de campo alimentadas em camundongos imunizados com rAs8.9kDa e rAsQuimeraII.

	Ninfas do Laboratório				Ninfas de Campo			
	LC1	LC2	LV1	LV2	IC1	IC2	IV1	IV2
Ninfas recuperadas	37	36	30	32	43	40	28	33
Muda	37	36	30	32	40	37	22	24
Porcentagem (%)	100	100	100	100	93	92,5	78,6	72,7

LC1-PBS; LC2-PBS+adj; LV1-8.9+adj; LV2-QuiII+adj; IC1-PBS; IC2-PBS+adj; IV1-

8.9+adj; IV2-QuiII+adj.

A Tabela 16 mostra os dados obtidos sobre a mortalidade ao longo de todo o desafio parasitário com as ninfas. Os grupos com as maiores taxas de mortalidade total foram os carrapatos de campo alimentados em camundongos imunizados com rAs8.9kDa (IV1) e rAsQuimeraII (IV2), com 56 e 52% respectivamente. As menores taxas de mortalidade são as dos grupos controles de laboratório e de campo.

Tabela 16: Porcentagem da mortalidade de ninfas de *A. sculptum* de laboratório e de campo ao longo de todo o desafio parasitário.

	Ninfas do Laboratório				Ninfas de Campo			
	LC1	LC2	LV1	LV2	IC1	IC2	IV1	IV2
n experimental	50	50	50	50	50	50	50	50
Muda	37	36	30	32	40	37	22	24
*Mortalidade (%)	26	28	40	36	20	26	56	52

LC1-PBS; LC2-PBS+adj; LV1-8.9+adj; LV2-QuiII+adj; IC1-PBS; IC2-PBS+adj; IV1-8.9+adj; IV2-QuiII+adj. * A mortalidade foi avaliada da colocação das ninfas na câmara de alimentação até o final da muda de ninfas para adultos.

Com os dados acima, foi possível realizar o cálculo de eficácia vacinal com a fórmula de Abbott (1987) modificada:

$$\text{Eficácia (\%)} = \left(1 - \frac{\text{número de ninfas recuperadas no grupo tratado}}{\text{número no grupo controle}} \right) \times 100$$

Dessa forma foi possível mensurar a eficácia vacinal nos grupos, considerando os grupos LC1 e IC1 como controles, como mostra a Tabela 17. A eficácia vacinal dos imunizantes rAs8.9kDa e rAsQuimeraII foram de 45% e 40%, respectivamente, quando utilizados contra ninfas de campo. A eficácia diminui quando as recombinantes são utilizadas contra ninfas que são mantidas na colônia do laboratório há cinco gerações, ficando abaixo de 20% para ambos os antígenos. Um dado que chamou a atenção foi que a eficácia do antígeno rAs8.9kDa foi maior que a eficácia da rAsQuimeraII contra as ninfas de laboratório e de campo.

Tabela 17: Eficácia vacinal das proteínas rAs8.9kDa e rAsQuimeraII contra ninfas de laboratório e ninfas de campo.

	Ninfas do Laboratório				Ninfas de Campo			
	LC1	LC2	LV1	LV2	IC1	IC2	IV1	IV2
n experimental	50	50	50	50	50	50	50	50
Recuperação total	37	36	30	32	40	37	22	24
Eficácia (%)	0	2,7	18,9	13,5	0	7,5	45	40

LC1-PBS; LC2-PBS+adj; LV1-8.9+adj; LV2-QuiII+adj; IC1-PBS; IC2-PBS+adj; IV1-8.9+adj; IV2-QuiII+adj.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a eficácia de diferentes formulações vacinais contendo antígenos salivares e intestinais contra *A. sculptum*, utilizando a saponina como adjuvante, além de propor um novo antígeno quimérico construído a partir das regiões antigênicas das proteínas identificadas e caracterizadas por Costa et al. (2021, 2024). Tais objetivos fundamentam-se na necessidade de obtenção de uma vacina que tenha um impacto maior na mortalidade dos carrapatos durante o repasto sanguíneo, ou ainda que possibilite a redução do número de doses necessárias, facilitando o manejo dos animais a serem imunizados e, conseqüentemente, diminuir o custo total da vacinação.

O primeiro passo deste trabalho consistiu na expressão e purificação das proteínas recombinantes rAs8.9kDa, rAsKunitz, rAsBasicTail e rAsQuimera, previamente caracterizadas em estudos funcionais e vacinais por Costa et al. (2021, 2024) e Natividade et al. (2025). Esses autores demonstraram que tais antígenos, isoladamente ou em formulações combinadas, foram capazes de induzir respostas imunes específicas e níveis satisfatórios de eficácia vacinal contra *A. sculptum* com formulações atingindo eficácias superiores a 95%.

A proteína rAsKunitz, pertencente à família de inibidores do tipo Kunitz_BPTI, apresentou forte capacidade de inibição da via clássica do sistema complemento, atingindo até 85% de inibição a 2 μ M, embora tenha mostrado menor eficácia na via alternativa (38% de inibição na mesma concentração). A rAs8.9kDa, por sua vez, integra uma superfamília restrita a ixodídeos e contém domínio von Willebrand tipo C, relacionado à regulação do complemento em vertebrados. Essa proteína demonstrou ação expressiva nas duas vias do sistema complemento, com 94% de inibição na via clássica e 57% na alternativa, ambas a 4 μ M. Já a rAsBasicTail, composta por uma cauda carboxi-terminal rica em resíduos básicos e blocos YY, apresentou desempenho na via clássica, com efeito inibitório significativo apenas em concentrações mais elevadas (≥ 4 μ M), mas se destacou na via alternativa, atingindo quase 89% de inibição a 2 μ M. Esse achado constitui o primeiro relato de um inibidor eficaz da via alternativa do complemento para a espécie *A. sculptum*, sugerindo que sua ação pode complementar dos demais antígenos.

A rAsQuimera foi desenvolvida como um antígeno composto por 22 epítomos preditos para células B provenientes de sete proteínas de membrana do epitélio intestinal de *A. sculptum*, separados por sequências flexíveis GSGSG e flanqueados por caudas de histidina. Sua elevada antigenicidade foi evidenciada pelos níveis de IgG detectados até 60 dias após o desafio vacinal,

indicando capacidade de indução de resposta humoral duradoura e potencialmente protetora (COSTA et al., 2024). A estratégia de utilização de antígenos intestinais em vacinas anti-carrapatos fundamenta-se na hipótese de que os anticorpos anti-rAsQuimera poderiam ativar a via clássica do sistema complemento sanguíneo do hospedeiro ao se ligarem a epítomos de proteínas presentes na superfície do epitélio intestinal, enquanto os anticorpos contra essas proteínas salivares impediriam a inibição do complemento promovida por essas moléculas. Essas características dos anticorpos induziriam um ataque intenso do complemento ao epitélio intestinal do carrapato. Em insetos, a inibição do complemento na região intestinal é importante para evitar danos ao epitélio (BARROS et al., 2009; KHATTAB et al., 2015), e um fenômeno semelhante pode ocorrer em carrapatos. Dessa forma, todas as formulações vacinais continham a rAsQuimera associada a um, dois ou três antígenos salivares. Essa combinação de antígenos — intestinais que ativam diretamente o complemento e salivares que removem defesas complementares naturais — configura uma estratégia sinérgica, com potencial para maximizar as lesões ao epitélio, reduzir a eficiência de alimentação e comprometer a sobrevivência do carrapato.

A adição de saponina como adjuvante teve por objetivo potencializar os efeitos dos antígenos, considerando sua reconhecida capacidade de estimular respostas imunes humorais e celulares levou à sua inclusão em diversas vacinas licenciadas e em estudos clínicos em andamento (EVANS et al., 2001; LIVINGSTON et al., 1994; MORENO et al., 1999). A fração purificada QS-21, derivada da *Quillaja saponaria*, tem sido estudada por induzir resposta imune balanceada do tipo Th1/Th2, sendo um dos principais componentes de adjuvantes como o AS01, presente nas vacinas Shingrix® e Mosquirix™ (WANG, 2021). Além disso, estudos demonstraram que a associação entre saponinas e antígenos pode melhorar significativamente a eficácia vacinal. Por exemplo, a combinação do antígeno LaAg com saponina (SAP) em camundongos resultou em proteção parcial contra *Leishmania amazonensis*, com redução no tamanho das lesões e controle parcial da carga parasitária. Tal formulação induziu resposta imune predominantemente Th1, com aumento de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ (DE MELLO et al., 2025).

As vacinas comerciais contra carrapatos baseadas no antígeno Bm86 diferem quanto ao sistema de expressão do antígeno e ao adjuvante utilizado em suas formulações. A vacina TickGARD®, desenvolvida na Austrália, utiliza o Bm86 recombinante expresso em *E. coli* e formulado com adjuvante oleoso da linha Montanide™, o que confere boa resposta imune (BISHOP; STUTZER; MARITZ-OLIVIER, 2023). A versão aprimorada, TickGARD® PLUS,

passou a empregar o Bm86 expresso em levedura do gênero *Pichia*, com mudanças na formulação do adjuvante, não divulgadas publicamente, que resultaram em aumento dos títulos de anticorpos no rebanho (TABOR, 2021). Já a vacina GAVAC®, desenvolvida em Cuba, também utiliza o Bm86 expresso em *Pichia pastoris*, mas é formulada com o adjuvante Montanide ISA 50 V2, uma emulsão óleo-em-água amplamente utilizada em vacinas veterinárias, sendo eficaz na indução de proteção contra infestações por *Rhipicephalus microplus*, a depender da região onde foi avaliada (CANALES et al., 1997).

No contexto da vacinação contra *A. sculptum*, esta foi a primeira vez que a saponina foi testada como adjuvante, uma vez que ensaios anteriores utilizaram exclusivamente o hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$). Diferente das saponinas, o $\text{Al}(\text{OH})_3$ tende a induzir respostas predominantemente do tipo Th2, o que pode impactar de forma distinta a eficácia da imunização contra carrapatos.

O ensaio pré-clínico com as formulações construídas (Quadro 1) transcorreu sem intercorrências. Realizou-se uma análise de inocuidade em camundongos, com o objetivo de verificar a ausência de efeitos adversos sistêmicos ou locais. Em modelos experimentais como os camundongos Swiss, essa análise é fundamental para validar a segurança de candidatos vacinais antes do avanço para estudos clínicos ou aplicações em larga escala. Entre os principais parâmetros avaliados estavam: ganho ou perda de peso corporal, aspecto geral dos animais (postura, pelagem, resposta a estímulos), monitoramento de mortalidade e alterações no local da aplicação (como edema, eritema ou necrose). Durante o ensaio, não foram observadas mortalidades e nem reações adversas relevantes, como nódulos e úlceras no local da aplicação. O peso dos camundongos foi avaliado antes da vacinação no D-2 (com quatro semanas de idade) e depois da terceira dose no D40 (nona semanas de vida) (Figura 8). Observou-se que o peso médio antes da vacinação foi de aproximadamente 16g, valor compatível com o peso esperado ao desmame (10-15 g aos 21 dias) (NEVES, 2013). Após as imunizações, o peso médio foi de cerca de 43 g, valor compatível com fêmeas adultas da linhagem. Não foram detectadas diferenças significativas de peso entre os grupos vacinados e os controles (C1 e C2), indicando que as formulações testadas apresentaram perfil de segurança adequado para administração em camundongos.

A análise dos parâmetros hematológicos demonstrou apenas um achado estatisticamente significativo ($p < 0,05$) entre os grupos C2 (PBS+adj) e V3 (8.9Qui+adj), relativo à concentração de hemoglobina (HGB), sem, contudo, apresentar relevância clínica aparente.

A imunofenotipagem *ex vivo* revelou alterações relevantes nas subpopulações leucocitárias circulantes dos camundongos vacinados. Em relação aos linfócitos T CD3⁺CD8⁺, foi observada uma redução no grupo vacinado V4 (K8.9Qui+adj) quando comparado ao grupo D-2 e ao controle C1 (PBS), atingindo significância estatística (Figura 9B). Resultados semelhantes foram descritos por Natividade et al. (2025), que também relatou diminuição da frequência de linfócitos T citotóxicos nos animais imunizados. Quanto aos monócitos CD14⁺, verificou-se que o grupo D-2 apresentou as menores proporções relativas, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) apenas em comparação aos grupos V4 (K8.9Qui+adj) e V5 (K8.9BtQui+adj) (Figura 9C). Essa diferença também foi descrita no controle de Natividade et al. (2025), indicando que a ativação de monócitos pode ser promovida por componentes específicos das formulações vacinais. Por fim, os linfócitos B CD19⁺ apresentaram aumento significativo ($p > 0,05$) nos grupos C2 (PBS+adj), V1 (KQui+adj), V2 (BtQui+adj) e V4 (K8.9Qui+adj), em comparação aos grupos D-2 e C1 (PBS) (Figura 10D). Esses dados reforçam os achados de Natividade et al. (2025) e Ribeiro (2022), que também observaram maiores proporções de linfócitos B em grupos imunizados.

A análise da resposta humoral demonstrou que todos os antígenos utilizados foram capazes de induzir a produção de anticorpos IgG, ainda que com níveis distintos entre os grupos experimentais ($p < 0,05$), conforme ilustrado na Figura 10. Notavelmente, os títulos de IgG permaneceram elevados até 45 dias após a última dose vacinal (D75), indicando persistência da resposta imune ao longo do tempo. Esses achados reforçam os resultados previamente descritos por Costa et al. (2021, 2024) e Natividade et al. (2025), que observaram níveis aumentados de anticorpos tanto em imunizações com antígenos isolados quanto em formulações combinadas. Tais evidências sugerem que todas as formulações testadas foram eficazes na indução de resposta imune humoral, promovendo a produção de anticorpos contra os antígenos vacinais. Essa resposta é um indicativo importante do potencial das vacinas em interferir no ciclo biológico do *A. sculptum*, possivelmente comprometendo sua alimentação e reprodução.

Diversos parâmetros biológicos e reprodutivos de *A. sculptum* foram analisados após o desafio parasitário, subsequente ao ensaio vacinal. Em relação as larvas, a maioria dos grupos imunizados apresentaram mortalidade durante o repasto sanguíneo acima de 50%, inclusive os controles C1 (PBS) e C2 (PBS+adj) (Tabela 4). Esse achado contrasta fortemente com os dados obtidos por Natividade et al. (2025), em que o grupo controle apresentou apenas 2% de mortalidade, e o grupo com maior taxa (8.9+Qui) alcançou 33,6%. No presente estudo, a maior mortalidade foi registrada no grupo Kn+Qui (74,4%), enquanto no trabalho anterior esse mesmo

grupo apresentou apenas 6,2% de mortalidade. Castagnolli et al. (2003) mostraram que em cavalos, em condições de campo, a porcentagem de recuperação de larvas de *A. sculptum* é de 19,9% (80,9% de mortalidade). Em condições laboratoriais, Prata, Faccini e Daemon (1998) obtiveram uma porcentagem de recuperação de larvas ingurgitadas de *A. sculptum* de 57,9% em coelhos (42,1% de mortalidade). Tais dados reforçam que os resultados observados neste estudo se aproximam mais dos valores reportados na literatura. Em relação à muda (Tabela 5), as taxas variaram de 59% a 83,8%, sem diferenças entre os grupos vacinados e os controles. Em contrapartida, Natividade et al. (2025) reportaram uma taxa de muda bastante reduzida (13,3%) para o grupo 8.9+Qui, com aumento nos grupos contendo três e quatro antígenos (50% e 59,9%, respectivamente), valores que se aproximam daqueles observados no presente estudo. Na análise da mortalidade total ao longo do desafio (Tabela 6), o grupo 8.9+Qui apresentou a maior taxa (80%), embora os controles também tenham apresentado mortalidade elevada (~70%), o que contrasta com os achados de Natividade et al. (2025), onde a mortalidade do grupo controle foi de apenas 6,9% e a dos vacinados atingiu até 91,9%.

Em relação às ninfas, a mortalidade durante o repasto sanguíneo variou entre 12,5% e 32% nos grupos vacinados, sendo que os controles C1 e C2 apresentaram as maiores taxas de mortalidade (32,5% e 40%) (Tabela 7). Tal resultado diverge dos dados de Natividade et al. (2025), que relataram mortalidade nula no grupo controle e, no máximo, 15,4% no grupo vacinado com a combinação 8.9+Qui. Por outro lado, os trabalhos de Costa et al. (2021, 2024) reportaram taxas de mortalidade muito superiores, chegando a 100% nos grupos vacinados com proteínas isoladas (Bt, 8.9 e Qui), 70% com Kn, e 32% no grupo controle. Quanto à muda, a taxa observada neste trabalho foi próxima de 100% em todos os grupos (Tabela 8), diferindo consideravelmente dos dados de Natividade et al. (2025), que observaram valores entre 9,1% e 17,8% para combinações binárias. A mortalidade acumulada durante todo o desafio parasitário (Tabela 9) variou de 13,3% a 40%, sendo mais elevada nos grupos C2 (PBS+adj) e V5 (K8.9BtQui+adj), e mais baixa nos grupos V4 (K8.9Qui+adj) e V2 (BtQui+adj). Natividade et al. (2025) observaram mortalidades mais acentuadas nas combinações binárias, e as menores nos grupos controle (0%), Kn+8.9+Qui (15%) e Kn+8.9+Bt+Qui (5,6%).

Na avaliação dos parâmetros alimentares e reprodutivos das fêmeas de *A. sculptum*, foi observada mortalidade durante o repasto sanguíneo apenas nos grupos vacinados V1 (KQui+adj) e V5 (K8.9BtQui+adj), com taxas de 20 e 40%, respectivamente (Tabela 10). Tais valores estão dentro da faixa descrita por Natividade et al. (2025), que relataram mortalidade entre 10 e 33,3% nos grupos vacinados, sendo 0% no grupo controle e a maior taxa observada

no grupo imunizado com 8.9+Qui. Já nos estudos de Costa et al. (2021, 2024), as mortalidades observadas entre as fêmeas variaram entre 30 e 58,3%, tanto nos grupos vacinados com antígenos isolados quanto no grupo controle, sendo a proteína 8.9 a mais eficaz nesse parâmetro. No presente estudo, assim como em Natividade et al. (2025), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) na taxa de eclosão dos ovos (Figura 13).

A avaliação da eficácia vacinal das formulações contendo saponina como adjuvante mostrou que apenas três dos cinco grupos vacinais apresentaram eficácia. O grupo com a menor eficácia vacinal foi o V3 (8.9Qui+adj), com 43,6% de eficácia. O grupo V1 (KQui+adj) apresentou uma eficácia de 49,3%. A maior eficácia vacinal foi de 61% do grupo V5 (K8.9BtQui+adj). Em comparação com trabalhos anteriores, os valores de eficácia observados neste estudo foram inferiores. Nos estudos conduzidos por Costa et al. (2021, 2024) onde foram utilizados antígenos individualmente junto com o adjuvante hidróxido de alumínio, a maior eficácia foi de 92,8% no grupo vacinado com a proteína 8.9, enquanto a menor eficácia foi de 59,4% no grupo vacinado com a proteína Bt. Já no trabalho de Natividade et al. (2025) utilizando as mesmas combinações de antígenos do nosso trabalho, porém com o hidróxido de alumínio como adjuvante, alcançou eficácias nos grupos vacinados que variaram de 81,6% a 99,9%, resultados substancialmente superiores aos obtidos neste ensaio. Apesar das menores eficácias vacinais observadas, as formulações contendo os antígenos recombinantes rAs8.9kDa e rAsKunitz apresentaram os resultados mais promissores, corroborando os achados anteriores de Costa et al. (2021) e Natividade et al. (2025). Esses dados sugerem que tais antígenos mantêm alto potencial imunoprotetor frente a *A. sculptum*, mesmo quando combinados com adjuvantes distintos, posicionando-os como candidatos vacinais promissores.

Diversos estudos têm evidenciado o potencial das vacinas experimentais no controle de carrapatos, utilizando antígenos recombinantes, proteínas ocultas, peptídeos sintéticos e formulações multicomponentes. Em *Amblyomma mixtum*, Rodríguez-Mallon et al. (2020) avaliaram um peptídeo derivado da proteína ribossomal P0, conjugado à proteína carreadora KLH, obtendo 54% de eficácia vacinal e induzindo uma resposta imune duradoura em coelhos. Sabadin et al. (2017) investigaram o uso da glutathione S-transferase recombinante de *Haemaphysalis longicornis* (rGST-HI) como imunógeno contra *Rhipicephalus appendiculatus* e *R. sanguineus* em modelo experimental com coelhos. A vacinação com rGST-HI promoveu reduções significativas no número, peso e fertilidade de fêmeas ingurgitadas de *R. appendiculatus*, alcançando eficácia global de aproximadamente 67%. No entanto, essa formulação não apresentou efeito sobre ninfas de *R. appendiculatus* e foi ineficaz contra ninfas

e adultos de *R. sanguineus*. Em estudo mais recente, Zeb et al. (2024) testaram vacinas baseadas em antígenos recombinantes — subolesina (SUB) de *Rhipicephalus microplus*, ferritina-2 (FER2) de *Hyalomma anatolicum* e a proteína ribossomal P0 de *R. microplus* —, observando elevadas taxas de eficácia contra *R. sanguineus* sensu lato. Em coelhos, as vacinas SUB, FER2 e a formulação combinada (SUB+FER2+P0) apresentaram eficácias de 86,3%, 95,9% e 90,9%, respectivamente. Esses achados reforçam o potencial das vacinas anti-carrapatos como estratégia promissora no controle integrado desses ectoparasitas, contribuindo para a redução da infestação e da transmissão de patógenos.

O primeiro trabalho utilizando os antígenos rAsKunitz, rAs8.9kDa, rAsBasicTail e rAsQuimera em ensaios vacinais foi o de Costa et al. (2021, 2024), com elevadas eficácias vacinais e impacto significativo na mortalidade de ninfas e na taxa de eclosão de ovos. Com base nesses achados, Natividade et al. (2025) testaram a hipótese de que a combinação de dois ou mais antígenos poderia atuar de forma sinérgica em diferentes aspectos da fisiologia do carrapato, amplificando os danos ao seu desenvolvimento e reprodução. Para isso, foram desenvolvidas formulações contendo antígenos de origem intestinal, no intuito de induzir lesões severas no epitélio intestinal do carrapato, associadas a antígenos salivares, com o objetivo de interferir em múltiplas vias imunológicas do hospedeiro. Como resultado, observaram-se eficácias próximas a 100%, principalmente nas formulações binárias. Entretanto, o maior efeito da vacina (responsável pela alta eficácia) foi na porcentagem de muda de larvas e ninfas que se alimentavam e completavam o repasto sanguíneo nos camundongos imunizados com as formulações.

A hipótese deste trabalho era de que a substituição do adjuvante — do hidróxido de alumínio para a saponina — pudesse intensificar os efeitos vacinais, particularmente na mortalidade durante o repasto sanguíneo em diferentes fases do carrapato, mantendo, ao mesmo tempo, os níveis de eficácia previamente descritos. Apesar das maiores taxas de mortalidade observadas durante o repasto de larvas e ninfas em comparação ao estudo de Natividade et al. (2025), as eficácias vacinais obtidas foram inferiores, sugerindo que a substituição do hidróxido de alumínio por saponina, embora promissora em termos de antigenicidade, não resultou em proteção efetiva equivalente.

A escolha do adjuvante em formulações vacinais é um fator determinante para o tipo de resposta imunológica induzida. Saponinas destacam-se por promover respostas imunes amplas, com predominância da via Th1, embora também sejam capazes de estimular a resposta Th2 de forma concomitante (CHEN et al., 2023). Esses adjuvantes facilitam a apresentação

cruzada de antígenos por células dendríticas, resultando em ativação robusta de linfócitos T CD8⁺ e na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2 e IFN- γ (HUIS IN'T VELD et al., 2025). Além disso, saponinas podem interagir com receptores do tipo Toll (TLRs), ativando vias de sinalização como NF- κ B e MAPK, fundamentais para a maturação de células apresentadoras de antígenos e subsequente ativação de células T (SHEN et al., 2023). Tais características justificam sua aplicação em vacinas cujo objetivo é a indução de resposta celular efetiva.

Em contraste, o hidróxido de alumínio, tradicionalmente utilizado em vacinas humanas, tende a induzir predominantemente respostas do tipo Th2, favorecendo a produção de anticorpos IgG1 e IgE (ZHAO et al., 2023). Seu mecanismo de ação envolve a formação de um depósito antigênico no local da injeção, o que prolonga a exposição ao antígeno e promovendo a ativação de células apresentadoras de antígenos. Adicionalmente, o hidróxido de alumínio pode ativar o inflamassoma NLRP3, levando à produção de IL-1 β e contribuindo para a resposta inflamatória local (HOGENESCH; O'HAGAN; FOX, 2018). No entanto, sua capacidade de induzir respostas celulares mediadas por linfócitos T CD8⁺ é limitada, o que restringe seu uso em vacinas voltadas à ativação imune citotóxica. Portanto, enquanto em alguns casos as saponinas demonstram eficácia superior na indução de resposta celular, o hidróxido de alumínio é mais adequado para induzir respostas humorais intensas, com destaque para produção de anticorpos. Essa diferença de perfis imunológicos deve ser considerada no desenho racional de vacinas, especialmente contra ectoparasitas como carrapatos, cujos mecanismos de evasão imunológica são complexos e multifatoriais.

Com base nas evidências imunológicas amplamente documentadas, esperava-se que a inclusão da saponina promovesse uma resposta celular robusta. Contudo, os dados obtidos neste estudo indicaram que a imunização com saponina não induziu de forma efetiva a resposta celular nas condições experimentais testadas. Por outro lado, foi observada ativação da resposta humoral, evidenciada pelo aumento na produção de anticorpos IgG específicos. Ainda assim, essa resposta, embora presente, não se traduziu em proteção vacinal satisfatória, indicando que a formulação, ou a interação adjuvante-antígeno, requer reavaliação para alcançar maior eficácia protetora.

Um dos objetivos deste estudo foi o desenvolvimento de um novo antígeno contendo regiões antigênicas selecionadas a partir das proteínas previamente testadas em ensaios vacinais por Costa et al. (2021, 2024). A hipótese subjacente baseou-se na premissa de que a construção de uma proteína quimérica, composta por epítomos reconhecidos por soros de camundongos

imunizados, seria capaz de induzir uma resposta imune ampla, direcionada contra múltiplos alvos funcionais do carrapato *A. sculptum*, facilitando o processo produtivo ao empregar um único antígeno. Para a seleção dos epítomos antigênicos, utilizou-se a técnica de SPOT-síntese seguida de immunoblotting, permitindo a identificação de 57 peptídeos com reatividade frente a *pools* de soros obtidos de animais imunizados com ao menos uma das proteínas recombinantes previamente estudadas (Figura 14). Essa abordagem metodológica é amplamente validada na literatura e já foi empregada no desenvolvimento da vacina quimérica ASCVac-1, composta por epítomos B e T derivados de *Ascaris suum*, por Gazzinelli-Guimarães et al. (2021). Nesse estudo, os epítomos foram incorporados em uma proteína quimérica expressa em sistema heterólogo, cuja imunogenicidade foi confirmada por *Western blot*, demonstrando proteção significativa em modelo murino. Metodologia similar foi adotada por Montero et al. (2020) no desenvolvimento de antígenos quiméricos com epítomos das proteínas OmpT, Cah e Hes de cepas de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), resultando em imunidade protetora duradoura em camundongos.

No presente trabalho, foram selecionadas 22 regiões antigênicas para a construção da nova proteína quimérica (Tabela 13). Curiosamente, verificou-se que alguns soros reagiram com proteínas diferentes daquelas utilizadas na imunização dos animais, sugerindo possível homologia estrutural ou conservação de peptídeos funcionais entre as proteínas testadas — aspecto que poderá ser mais bem explorado em estudos subsequentes. A proteína quimérica construída foi denominada AsQuimeraII, apresentando peso molecular teórico de 57,3 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 9,73 (Figura 15). Após a expressão heteróloga e subsequente purificação, a análise por SDS-PAGE revelou duas bandas abaixo de 50 kDa, sugerindo possível degradação parcial da proteína recombinante (Figura 16). A identidade da rAsQuimeraII foi confirmada por *Western blot*, utilizando anticorpo anti-His tag, o que corrobora a expressão bem-sucedida da proteína e sua aptidão para aplicação em ensaios vacinais subsequentes (Figura 17), corroborando a expressão bem-sucedida da proteína recombinante para utilização nos ensaios vacinais subsequentes.

O ensaio pré-clínico vacinal utilizando a rAsQuimeraII foi conduzido seguindo o mesmo protocolo adotado nos testes anteriores com saponina. Para validar a resposta imune e fornecer um parâmetro de eficácia, um grupo adicional de camundongos foi imunizado com a proteína rAs8.9kDa, previamente testada por Costa et al. (2021), atuando como controle positivo. Diferentemente dos ensaios anteriores, o adjuvante selecionado neste experimento foi o hidróxido de alumínio $\text{Al}(\text{OH})_3$.

O desafio parasitário foi conduzido apenas com ninfas de *A. sculptum*, provenientes de duas origens distintas: parte das ninfas era oriunda da colônia mantida há várias gerações no laboratório, onde os carrapatos são mantidos exclusivamente com alimentação em camundongos, enquanto outra parte foi obtida a partir da muda de larvas alimentadas em cavalos de campo mantidos em uma propriedade rural localizada no município de Itabirito. Tal estratégia experimental visou investigar possíveis diferenças na resposta ao desafio entre carrapatos de distintas origens, dado que o ambiente e o hospedeiro utilizados na criação podem modular características fenotípicas e imunológicas dos ectoparasitas, sobretudo a expressão de proteínas salivares. De acordo com Rodríguez-Durán et al. (2025), fatores ambientais e a interação com diferentes hospedeiros influenciam diretamente a composição do conjunto de proteínas expressas na saliva dos carrapatos, impactando funções imunomodulatórias e de evasão do sistema imune do hospedeiro. A aplicação de tecnologias ômicas revelou que essas variações podem afetar tanto o sucesso do parasitismo quanto a resposta imunológica do carrapato, evidenciando o papel central do ambiente e do hospedeiro na modulação fenotípica.

A quantificação dos níveis de IgG por ELISA indireto demonstrou que tanto a rAs8.9kDa quanto a rAsQuimeraII foram capazes de induzir resposta imune humoral robusta, com aumento significativo na produção de IgG antígeno-específica após a terceira dose vacinal, mantendo-se elevada até o dia 75 do experimento (Figura 18). Curiosamente, na placa sensibilizada com a proteína rAs8.9kDa, os soros dos camundongos imunizados com a rAsQuimeraII também apresentaram títulos elevados de IgG, embora em menor magnitude que o grupo imunizado diretamente com rAs8.9kDa. Tal achado está em consonância com o fato de que a rAsQuimeraII contém quatro epítopos derivados da rAs8.9kDa, justificando a reatividade cruzada observada. Por outro lado, a rAsQuimeraII não expõe bem os epítopos da rAs8.9kDa, visto que não houve um aumento nos títulos de IgG da rAs8.9kDa na placa sensibilizada com a rAsQuimeraII.

A análise dos parâmetros biológicos das ninfas de *A. sculptum* revelou diferenças marcantes entre os grupos controle e os grupos vacinados, assim como entre ninfas oriundas da colônia laboratorial e de campo. As menores taxas de mortalidade durante o repasto sanguíneo foram observadas nos grupos controle (LC1, LC2, IC1 e IC2), como era esperado (Tabela 14). Por outro lado, as maiores mortalidades ocorreram nos grupos imunizados com rAs8.9kDa, alcançando 40% nas ninfas do laboratório e 44% nas de campo. Apesar disso, esses valores foram inferiores aos reportados por Costa et al. (2021), que observaram mortalidade de 100% em ninfas alimentadas em camundongos Swiss imunizados com rAs8.9kDa + Al(OH)³. Tal

discrepância sugere a existência de fatores não controlados que possivelmente interferiram na eficácia vacinal, mesmo com a manutenção das mesmas variáveis experimentais principais (espécie, fase, adjuvante e hospedeiro). Adicionalmente, observou-se que o peso das ninfas de campo foi significativamente maior nos grupos IC2 (PBS+adj) e IV1 (8.9+adj) ($p < 0,05$) (Figura 19B), e que a porcentagem de muda foi menor nos grupos de campo vacinados com as proteínas (78,6% e 72,72%) em comparação aos controles (quase 100%) e todos os grupos de laboratório (100% em todos os grupos) (Tabela 15). A mortalidade total ao longo do desafio também reforçou esse padrão: enquanto os controles apresentaram as menores taxas, os grupos vacinados com rAs8.9kDa e rAsQuimeraII mostraram maiores percentuais de mortalidade nas ninfas de campo (56% e 52%, respectivamente) do que nas de laboratório (40% e 36%) (Tabela 16).

Com base nesses dados, a eficácia vacinal contra ninfas de campo variou de 40% a 45% para as proteínas rAsQuimeraII e rAs8.9kDa, enquanto para ninfas de laboratório os valores foram inferiores (13,5%–18,9%) (Tabela 17). Esses resultados sugerem que a nova proteína quimérica rAsQuimeraII induziu um efeito biológico mensurável, embora ainda abaixo do desejável, e que a eficácia vacinal pode variar de forma significativa entre diferentes populações de carrapatos.

A literatura oferece possíveis explicações para as variações observadas na eficácia vacinal entre diferentes populações de carrapatos. Tirloni et al. (2017) demonstraram que carrapatos da mesma espécie são capazes de modular a expressão de proteínas salivares em resposta ao tipo de hospedeiro ao qual são expostos — como coelhos, cães ou humanos. Tal plasticidade na expressão de antígenos pode impactar de forma significativa a interação com o sistema imune do hospedeiro, afetando diretamente a eficácia de vacinas desenvolvidas a partir de carrapatos mantidos sob condições específicas. Adicionalmente, considera-se que populações mantidas em condições laboratoriais por diversas gerações podem sofrer adaptação ao hospedeiro experimental, resultando em alterações fenotípicas e imunológicas que as diferenciam de populações de campo. Essa adaptação, embora muitas vezes sutil, pode influenciar a expressão de proteínas-alvo e, consequentemente, a efetividade das formulações vacinais testadas.

Essas observações reforçam a necessidade de considerar cuidadosamente o histórico da colônia e o tipo de hospedeiro utilizado na criação dos carrapatos nos estudos vacinais. O uso de antígenos expressos por carrapatos adaptados a hospedeiros laboratoriais pode não refletir adequadamente o perfil antigênico de populações selvagens, o que limita a extrapolação

dos resultados obtidos em modelos experimentais para contextos de campo. Dessa forma, os dados apresentados neste estudo, ainda que indiquem resposta imune humoral significativa e redução parcial da viabilidade dos carrapatos, apontam também para limitações importantes relacionadas à formulação, ao adjuvante utilizado e ao contexto experimental. A nova proteína quimérica rAsQuimeraII mostrou-se imunogênica e funcional, porém sua eficácia vacinal foi inferior àquela observada com os antígenos originais, especialmente quando associados ao adjuvante hidróxido de alumínio.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que, embora todas as formulações vacinais tenham sido capazes de induzir uma resposta humoral antígeno-específica, os níveis de eficácia alcançados foram inferiores aos reportados em estudos anteriores que utilizaram o hidróxido de alumínio como adjuvante (Costa et al., 2021, 2024; Natividade et al., 2025). Esse achado reforça o papel determinante do adjuvante na qualidade da resposta imune protetora, sugerindo que a substituição do hidróxido de alumínio pela saponina, nesta configuração experimental, não promoveu ganhos em termos de eficácia vacinal.

A nova proteína recombinante rAsQuimeraII, desenvolvida com base na seleção das regiões antigênicas identificados previamente, demonstrou potencial imunogênico ao induzir aumento na produção de IgG antígeno-específica. No entanto, essa resposta humoral não foi acompanhada por elevados índices de mortalidade nos desafios com ninfas de *A. sculptum*, o que sugere a necessidade de ajustes estruturais na proteína quimérica ou na seleção de epítomos com maior impacto funcional sobre a fisiologia do carrapato.

Adicionalmente, observou-se que a eficácia vacinal pode variar consideravelmente entre diferentes populações de carrapatos, como aquelas oriundas de colônias laboratoriais e de ambientes naturais. Esse achado destaca a importância de considerar a variabilidade biológica entre populações de ectoparasitas no processo de desenvolvimento e validação de vacinas, especialmente quando se objetiva aplicações em campo. Assim, futuras investigações deverão priorizar a otimização das formulações antigênicas e a seleção criteriosa de adjuvantes, além de considerar o histórico e a origem das populações de carrapatos utilizadas nos ensaios de desafio parasitário.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1987.
- ABREU, J. F. Identificação e caracterização funcional de um inibidor da via clássica do sistema complemento expresso na glândula salivar do carrapato *Amblyomma sculptum*. Mestrado em Parasitologia—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.
- ABREU, J. F. Avaliação da eficácia de formulações vacinais contendo epitopos de proteínas salivares e intestinais contra o carrapato *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae). Doutorado em Parasitologia—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2023.
- AGUIRRE, A. D. A. R. et al. Formula to evaluate efficacy of vaccines and systemic substances against three-host ticks. *International Journal for Parasitology*, v. 45, n. 6, p. 357–359, maio 2015.
- ALLISON, A. C.; BYARS, N. E. Immunological adjuvants: Desirable properties and side-effects. *Molecular Immunology*, v. 28, n. 3, p. 279–284, mar. 1991.
- ARAÚJO, R. N.; COSTA, J. O.; BOTELHO, J. R. Classe Arachnida. In: Neves, D. P. et al. *Parasitologia Humana*. 13a edição. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, p.479-489, 2016.
- AWATE, S.; BABIUK, L. A.; MUTWIRI, G. Mechanisms of Action of Adjuvants. *Frontiers in Immunology*, v. 4, 2013.
- BARROS, V. C. et al. The Role of Salivary and Intestinal Complement System Inhibitors in the Midgut Protection of Triatomines and Mosquitoes. *PLoS ONE*, v. 4, n. 6, p. e6047, 25 jun. 2009.
- BATTESTI, D. M. B.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. In: Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. p. xvi, 223-xvi, 223, 2006.
- BEATI, L. et al. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evolutionary Biology*, v. 13, n. 1, p. 267, 2013.
- BISHOP, L. J.; STUTZER, C.; MARITZ-OLIVIER, C. More than three decades of Bm86: what we know and where to go. *Pathogens*, v. 12, n. 9, p. 1071, 2023.
- BITENCOURTH, K. et al. *Amblyomma sculptum*: genetic diversity and rickettsias in the Brazilian Cerrado biome. *Medical and veterinary entomology*, v. 31, n. 4, p. 427-437, 2017.
- BLACK IV, W. C.; KONDRATIEFF, B. C. Evolution of arthropod disease vectors. *Biology of disease vectors.*, p. 9–23, 2005.

- BONAM, S. R. et al. An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 38, n. 9, p. 771–793, set. 2017.
- BOUCHARD, K. R.; WIKEL, S. K. Care, maintenance, and experimental infestation of ticks in the laboratory setting. *Biology of disease vectors.*, v. 2, p. 705–712, 2005.
- BRASIL, M. S. Febre maculosa - Situação epidemiológica. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-maculosa/situacao-epidemiologica>>. Acessado em 21 de maio de 2025.
- CABRERA, R. R. Influência do fotoperíodo e da temperatura na diapausa comportamental em larvas não-alimentadas de *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) provenientes de Pirassununga, São Paulo, Brasil. Doutorado em Medicina Preventiva e Saúde Animal—[s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.
- CALABRO, S. et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine*, v. 29, n. 9, p. 1812–1823, fev. 2011.
- CANALES, M. et al. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. *Vaccine*, v. 15, n. 4, p. 414–422, mar. 1997.
- CARDOSO, E. R. N. et al. Susceptibility of *Amblyomma sculptum*, Vector of *Rickettsia rickettsii*, Ticks from a National Park and an Experimental Farm to Different Synthetic Acaricides. *Pathogens*, v. 12, n. 11, p. 1304, 31 out. 2023.
- CASTAGNOLLI, K. C. et al. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. *Veterinary parasitology*, v. 117, n. 4, p. 271–283, 2003.
- CAVALCANTE, R. R.; PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology*, v. 127, n. 1, p. 87–93, jul. 2003.
- CHEN, K. et al. Potentials of saponins-based adjuvants for nasal vaccines. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1153042, 2023.
- COSTA, G. C. A. Identificação e avaliação de eficácia de antígenos vacinais contra o carrapato estrela (*Amblyomma sculptum*). Doutorado em Parasitologia—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.
- COSTA, G. C. A. et al. *Amblyomma sculptum* Salivary Protease Inhibitors as Potential Anti-Tick Vaccines. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 611104, 4 fev. 2021.
- COSTA, G. C. A. et al. Gut membrane proteins as candidate antigens for immunization of mice against the tick *Amblyomma sculptum*. *Vaccine*, v. 42, n. 21, p. 126141, 2024.
- DE CASTRO, J. J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary Parasitology*, v. 71, n. 2–3, p. 77–97, jul. 1997.
- DE LA FUENTE, J. D. L. et al. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews*, v. 8, n. 1, p. 23–28, jun. 2007.

- DE LA FUENTE, J. D. L.; CONTRERAS, M. Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Review of Vaccines*, v. 14, n. 10, p. 1367–1376, 3 out. 2015.
- DE MELLO, M. F. et al. Efficacy of LaAg Vaccine Associated with Saponin Against *Leishmania amazonensis* Infection. *Vaccines*, v. 13, n. 2, p. 129, 2025.
- DE PAULA, Luiza Gabriella Ferreira et al. Seasonal dynamics of *Amblyomma sculptum*: a review. *Parasites & Vectors*, v. 15, n. 1, p. 193, 2022.
- DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, v. 20, n. 1, p. 34–50, jan. 2010.
- EDELMAN, R. An Update on Vaccine Adjuvants in Clinical Trial. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 8, n. 8, p. 1409–1411, ago. 1992.
- ESTRADA-PENÑA, A. et al. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). *International Journal for Parasitology*, v. 44, n. 14, p. 1081–1089, dez. 2014.
- EVANS, T. G. et al. QS-21 promotes an adjuvant effect allowing for reduced antigen dose during HIV-1 envelope subunit immunization in humans. *Vaccine*, v. 19, n. 15–16, p. 2080–2091, fev. 2001.
- FRANCISCHETTI, I., M. B. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience*, v. Volume, n. 14, p. 2051, 2009.
- FRANCO, P. F. et al. Inhibition of the classical pathway of the complement system by saliva of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, v. 164, p. 91–96, maio 2016.
- FRANK, R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, v. 48, n. 42, p. 9217–9232, 1992.
- FURLONG, J.; PRATA, M. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. 2000.
- GARCÍA-GARCÍA, J. et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*, v. 18, n. 21, p. 2275–2287, 2000.
- GAZZINELLI-GUIMARÃES, A. C. et al. ASCVac-1, a multi-peptide chimeric vaccine, protects mice against *Ascaris suum* infection. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 788185, 2021.
- GUERRERO, F. D.; MILLER, R. J.; PÉREZ DE LEÓN, A. A. Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *International Journal for Parasitology*, v. 42, n. 5, p. 421–427, maio 2012.
- HE, P.; ZOU, Y.; HU, Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 11, n. 2, p. 477–488, fev. 2015.

- HOGENESCH, H.; O'HAGAN, D. T.; FOX, C. B. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. *npj Vaccines*, v. 3, n. 1, p. 51, 2018.
- HUIS IN'T VELD, L. G. M. et al. Saponin-based adjuvant uptake and induction of antigen cross-presentation by CD11b⁺ dendritic cells and macrophages. *npj Vaccines*, v. 10, n. 1, p. 15, 2025.
- JACKSON, L. A.; OPDEBEECK, J. P. Humoral immune responses of Hereford cattle vaccinated with midgut antigens of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Parasite Immunology*, v. 12, n. 2, p. 141–151, mar. 1990.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. *Parasitology*, v. 129, n. S1, p. S3–S14, out. 2004.
- JORE, M. M. et al. Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 23, n. 5, p. 378–386, maio 2016.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego Academy Press, p. 932, 1997.
- KEIRANS, J. E.; DURDEN, L. A. Tick systematics and identification. *Tick-borne Diseases of Humans*, p. 123–140, 2005.
- KEMP, D. H. et al. Vaccination against *Boophilus microplus*: Localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Experimental & Applied Acarology*, v. 7, n. 1, p. 43–58, jun. 1989.
- KHATTAB, A. et al. *Anopheles* midgut epithelium evades human complement activity by capturing factor H from the blood meal. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 9, n. 2, p. e0003513, 2015.
- KLAFKE, G. M. et al. Brazil's battle against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks: current strategies and future directions. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 33, n. 2, p. e001423, 2024.
- KOTÁL, J. et al. Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics*, v. 128, p. 58–68, out. 2015.
- KUNZ, S. E.; KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, v. 13, n. 4, p. 1249–1286, 1994.
- KURODA, Y. et al. Autoimmunity induced by adjuvant hydrocarbon oil components of vaccine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 58, n. 5, p. 325–337, jun. 2004.
- LABRUNA, M. B. et al. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 97, n. 1, p. 1–14, maio 2001.
- LABRUNA, M. B. et al. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 105, n. 1, p. 65–77, abr. 2002.

- LABRUNA, M. B. et al. Larval Behavioral Diapause Regulates Life Cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 40, n. 2, p. 170–178, 1 mar. 2003.
- LAMBRECHT, B. N. et al. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current Opinion in Immunology*, v. 21, n. 1, p. 23–29, fev. 2009.
- LINDBLAD, E. B. Aluminium Adjuvants. In: DES Stewart-Tull (ed. *The Theory and Practical Application of Adjuvants*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 21–35, 1995.
- LIU, G. et al. QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. *Vaccine*, v. 20, n. 21–22, p. 2808–2815, jun. 2002.
- LIVINGSTON, P. O. et al. Phase 1 trial of immunological adjuvant QS-21 with a GM2 ganglioside-keyhole limpet haemocyanin conjugate vaccine in patients with malignant melanoma. *Vaccine*, v. 12, n. 14, p. 1275–1280, jan. 1994.
- LOPES, C. M. L. et al. Host Specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with Comments on the Drop-off Rhythm. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, n. 3, p. 347–351, maio 1998.
- LOPES, R. B. et al. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n. 1, p. 27–31, 2007.
- LUEBERT, F. *Quillajaceae* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB606657>>. Acesso em: 03 abr. 2024
- MARCIANI, D. J. et al. Fractionation, structural studies, and immunological characterization of the semi-synthetic Quillaja saponins derivative GPI-0100. *Vaccine*, v. 21, n. 25–26, p. 3961–3971, set. 2003.
- MARTINS, T. F. Estudo do complexo *Amblyomma cajennense* no Brasil. Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses—São Paulo: Universidade de São Paulo, 11 abr. 2014.
- MARTINS, T. F. et al. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (*sensu lato*) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (*sensu stricto*). *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 186, dez. 2016.
- MARX, P. A. et al. Preston A. et al. Protection against vaginal SIV transmission with microencapsulated vaccine. *Science*, v. 260, n. 5112, p. 1323–1327, 1993.
- MCEL RATH, M. J. Selection of potent immunological adjuvants for vaccine construction. *Seminars in Cancer Biology*, v. 6, n. 6, p. 375–385, dez. 1995.
- MERINO, O. et al. Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, 2013.
- MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. *Medicina Veterinária de Laboratório: interpretação e diagnóstico*. São Paulo: Roca, p. 308, 1995.

- MONTERO, D. A. et al. Immunization of mice with chimeric antigens displaying selected epitopes confers protection against intestinal colonization and renal damage caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *npj Vaccines*, v. 5, n. 1, p. 20, 2020.
- MORENO, C. A. et al. Preclinical evaluation of a synthetic *Plasmodium falciparum* MAP malaria vaccine in Aotus monkeys and mice. *Vaccine*, v. 18, n. 1–2, p. 89–99, ago. 1999.
- NASCIMENTO, D. A. G. et al. Serosurvey of *Borrelia* in dogs, horses, and humans exposed to ticks in a rural settlement of southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 25, n. 4, p. 418–422, 8 dez. 2016.
- NATIVIDADE, U. A. *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae): avaliação da capacidade de locomoção e desenvolvimento de formulações vacinais para seu controle. Doutorado em Parasitologia—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2020.
- NATIVIDADE, U. A. et al. Locomotion activity and its effects on the survival of *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) nymphs under laboratory conditions. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 12, n. 1, p. 101562, jan. 2021.
- NATIVIDADE, U. A. et al. Immunoprotection Provided by Salivary and Intestinal Protein-Based Antigens Against the Ixodid Tick *Amblyomma sculptum*. *Vaccines*, v. 13, n. 2, p. 136, 2025.
- NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 5, n. 3, p. 252–276, abr. 2014.
- NEVES, S. M. P. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação. São Paulo: Universidade de São Paulo, p. 52, 2013.
- OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A*, v. 967, n. 1, p. 147–162, ago. 2002.
- PAJUABA NETO, A. A. et al. Influence of microhabitat use and behavior of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma dubitatum* nymphs (Acari: Ixodidae) on human risk for tick exposure, with notes on *Rickettsia* infection. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 9, n. 1, p. 67–71, jan. 2018.
- PARIZI, L. F. et al. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 01, p. 1–7, 2009.
- PARIZI, L. F. et al. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: A field evaluation. *Vaccine*, v. 30, n. 48, p. 6912–6917, nov. 2012.
- PARIZI, L. F. et al. Universal Tick Vaccines: Candidates and Remaining Challenges. *Animals*, v. 13, n. 12, p. 2031, 19 jun. 2023.
- PEREIRA, M. DE C.; LABRUNA, M. B. Febre maculosa: aspectos clínico-epidemiológicos. *Clínica Veterinária*, v. 3, n. 12, p. 19–23, 1998.

- PRATA, M. C. A.; FACCINI, J. L. H.; DAEMON, E. Relationship between weight and number of engorged *Amblyoma cajennense* larvae and nymphs (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae) in experimental infestation on rabbits. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 7, p. 107-112, 1998.
- QUEIROGAS, V. L. et al. Capybaras and ticks in the urban areas of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil: ecological aspects for the epidemiology of tick-borne diseases. *Experimental and Applied Acarology*, v. 57, n. 1, p. 75–82, maio 2012.
- RAMON, G. Procèdes pour acroître la production des antitoxins. *Ann Inst Pasteur*, v. 40, p. 1–10, 1926.
- RAMOS, V. D. N. et al. Ambush behavior of the tick *Amblyomma sculptum* (*Amblyomma cajennense* complex) (Acari: Ixodidae) in the Brazilian Pantanal. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 8, n. 4, p. 506–510, jun. 2017.
- REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*, v. 19, n. 12, p. 1597–1608, dez. 2013.
- RIBEIRO, H. S. Identificação e seleção de novos alvos vacinais contra o carrapato marrom de cães *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. Doutorado em Parasitologia—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2022.
- ROBERTS, J. A. Resistance of Cattle to the Tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. Stages of the Life Cycle of the Parasite against Which Resistance Is Manifest. *The Journal of Parasitology*, v. 54, n. 4, p. 667, ago. 1968.
- RODRÍGUEZ-DURÁN, A. et al. Multi-omics technologies applied to improve tick research. *Microorganisms*, v. 13, n. 4, p. 795, 2025.
- RODRÍGUEZ-MALLON, A. et al. A chemical conjugate of the tick P0 peptide is efficacious against *Amblyomma mixtum*. *Transboundary and emerging diseases*, v. 67, p. 175-177, 2020.
- RODRÍGUEZ-VALLE, M. et al. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Veterinary Parasitology*, v. 57, n. 4, p. 339–349, abr. 1995.
- RODRÍGUEZ-VALLE, M. et al. Efficacy of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* Bm86 against *Hyalomma dromedarii* and *Amblyomma cajennense* tick infestations in camels and cattle. *Vaccine*, v. 30, n. 23, p. 3453–3458, maio 2012.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology research*, v. 117, p. 3-29, 2018.
- ROJAS, R.; MARINI, M. Â.; COUTINHO, M. T. Z. Wild birds as hosts of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 3, p. 315–322, maio 1999.

- ROSSIGNOL, P. A. et al. Enhanced mosquito blood-finding success on parasitemic hosts: evidence for vector-parasite mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 82, n. 22, p. 7725–7727, nov. 1985.
- SABADIN, G. A. et al. Effect of recombinant glutathione S-transferase as vaccine antigen against *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus sanguineus* infestation. *Vaccine*, v. 35, n. 48, p. 6649–6656, 2017.
- SANT'ANNA, M. R. V. et al. Inhibition of vertebrate complement system by hematophagous arthropods: inhibitory molecules, mechanisms, physiological roles, and applications. *Insect Science*, p. 1744– 7917.13317, 21 jan. 2024.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, v. 9, n. 7, p. 671–675, jul. 2012.
- SCHUIJT, T. J. et al. A Tick Mannose-Binding Lectin Inhibitor Interferes with the Vertebrate Complement Cascade to Enhance Transmission of the Lyme Disease Agent. *Cell Host & Microbe*, v. 10, n. 2, p. 136–146, ago. 2011.
- SEBASTIAN, Patrick S. et al. Bacteria of the genera *Ehrlichia* and *Rickettsia* in ticks of the family Ixodidae with medical importance in Argentina. *Experimental and Applied Acarology*, v. 71, n. 1, p. 87–96, 2017.
- SERRA-FREIRE, N. M. Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*: ocorrência estacional e comportamento dos estádios não parasitários em pastagens do Estado do Rio de Janeiro. *Arq Univ Fed Rural Rio de Janeiro*, v. 5, n. 2, p. 187–193, 1982a.
- SERRA-FREIRE, N. M. Ixodídeos parasitas de bovinos leiteiros na zona fisiográfica de Resende, Estado do Rio de Janeiro. *Rev Bras Med Vet*, v. 5, p. 18–20, 1982b.
- SHEN, L. et al. Potential Immunoregulatory mechanism of Plant saponins: a review. *Molecules*, v. 29, n. 1, p. 113, 2023.
- SILVA, N. C. S. et al. Saliva of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 445, dez. 2016.
- SIM, R. B.; DODDS, A. W. The complement system: an introduction. Em: *The Practical Approach Series*. Oxford: Oxford University Press, 1997. p. 1–18.
- SIM, R. B.; LAICH, A. Serine proteases of the complement system. *Biochemical Society Transactions*, v. 28, 2000.
- SOARES, C. A. G. et al. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal Ixodes scapularis ticks. *Insect Molecular Biology*, v. 14, n. 4, p. 443–452, ago. 2005.
- SOLTYSIK, S. et al. Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. *Vaccine*, v. 13, n. 15, p. 1403–1410, jan. 1995.

- SONENSHINE, D. E. The mouthparts and foregut: Capitulum. Pharynx and Esophagus. Em: Biol. Ticks. New York: Oxford University Press, 1991. p. 119–140.
- SOUZA FREITAS, E. D. P. E.; ZAPATA, M. T. A. G.; FERNANDES, F. D. F. Monitoring of resistance or susceptibility of adults and larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) to synthetic acaricides in Goiás, Brazil. Experimental and Applied Acarology, v. 53, n. 2, p. 189–202, fev. 2011.
- TABOR, A. E. A review of Australian tick vaccine research. Vaccines, v. 9, n. 9, p. 1030, 2021.
- TIRLONI, L. et al. Tick-host range adaptation: changes in protein profiles in unfed adult *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* saliva stimulated to feed on different hosts. Frontiers in cellular and infection microbiology, v. 7, p. 517, 2017.
- TYSON, K. R.; ELKINS, C.; DE SILVA, A. M. A Novel Mechanism of Complement Inhibition Unmasked by a Tick Salivary Protein That Binds to Properdin. The Journal of Immunology, v. 180, n. 6, p. 3964–3968, 15 mar. 2008.
- VALENZUELA, J. G. et al. Purification, Cloning, and Expression of a Novel Salivary Anticomplement Protein from the Tick, *Ixodes scapularis*. Journal of Biological Chemistry, v. 275, n. 25, p. 18717–18723, jun. 2000.
- VOGEL, F. R. Adjuvants in perspective. Developments in biological standardization., v. 92, p. 241–248, 1998.
- VOGEL, F. R. Improving Vaccine Performance with Adjuvants. Clinical Infectious Diseases, v. 30, n. Supplement_3, p. S266–S270, 1 jun. 2000.
- WAITE, D. C. et al. Three double-blind, randomized trials evaluating the safety and tolerance of different formulations of the saponin adjuvant QS-21. Vaccine, v. 19, n. 28–29, p. 3957–3967, jul. 2001.
- WANG, P. Natural and synthetic saponins as vaccine adjuvants. Vaccines, v. 9, n. 3, p. 222, 2021.
- WARREN, H. S.; CHEDID, L. A. Future prospects for vaccine adjuvants. Critical reviews in immunology, v. 8, n. 2, p. 83–101, 1988.
- WATERS, R. V.; TERRELL, T. G.; JONES, G. H. Uveitis induction in the rabbit by muramyl dipeptides. Infection and Immunity, v. 51, n. 3, p. 816–825, mar. 1986.
- WEZYK, D.; BAJER, A.; DWUZNIAK-SZAREK, D. How to get rid of ticks-a mini-review on tick control strategies in parks, gardens, and other human-related environments. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, v. 32, 2025.
- WILLADSEN, P. et al. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. The Journal of Immunology, v. 143, n. 4, p. 1346–1351, 15 ago. 1989.
- WOODWARD, K. N. Veterinary pharmacovigilance. Part 3. Adverse effects of veterinary medicinal products in animals and on the environment. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, v. 28, n. 2, p. 171–184, abr. 2005.

- ZEB, I. et al. Cross-species immunoprotective antigens (subolesin, ferritin 2 and P0) provide protection against *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. *Parasites & Vectors*, v. 17, n. 1, p. 3, 2024.
- ZHAO, T. et al. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. *Signal transduction and targeted therapy*, v. 8, n. 1, p. 283, 2023.

ANEXO I



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 103/2017
Título do projeto: Identificação de moléculas imunogênicas expressas na glândula salivar e intestino do carrapato *Amblyomma sculptum* e avaliação de seu potencial como antígenos vacinais
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Ricardo Nascimento Araujo
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Parasitologia

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

Aprovado na reunião do dia 26/06/2017. Validade: 26/06/2017 à 25/06/2022
Belo Horizonte, 27/06/2017.

Atenciosamente,

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

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

ANEXO II



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 94/2023**Título do projeto:** Desenvolvimento de formulações vacinais contra o carrapato *Amblyomma sculptum* através da identificação de proteínas imunogênicas expressas nas glândulas salivares**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Ricardo Nascimento Araujo**Unidade:** Instituto de Ciencias Biologicas**Departamento:** Departamento de Parasitologia**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado no dia 23/05/2023. Validade: 23/05/2023 à 24/05/2028. Este protocolo foi aprovado condicionado a resposta à diligência na reunião de 08/05/2023.
Belo Horizonte, 23/05/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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

ANEXO III



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 32/2024**Título do projeto:** Avaliação da eficácia de diferentes formulações vacinais contendo antígenos salivares e intestinais contra o carrapato *Amblyomma sculptum***Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Ricardo Nascimento Araujo**Unidade:** Instituto de Ciencias Biologicas**Departamento:** Departamento de Parasitologia**Situação atual:** **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 22/04/2024. Validade: 22/04/2024 à 21/04/2029.
Belo Horizonte, 22/04/2024.

Atenciosamente,

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

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

ANEXO IV



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 60/2020

Título do projeto: Manutenção de uma colônia de *Amblyomma sculptum* em laboratório

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Ricardo Nascimento Araujo

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Parasitologia

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião "on line" do dia 11/05/2020. Validade: 11/05/2020 à 10/05/2025.
Belo Horizonte, 11/05/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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