

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**

Otoni Alves de Oliveira Melo Júnior

**PROVA DE CONCEITO E APRIMORAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE  
ALVOS ANTIGÊNICOS PARA COMPOR UMA VACINA CONTRA O  
CARRAPATO DE CÃES *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE,  
1806) (ACARI: IXODIDAE)**

Belo Horizonte

2019

Otoni Alves de Oliveira Melo Junior

**PROVA DE CONCEITO E APRIMORAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE  
ALVOS ANTIGÊNICOS PARA COMPOR UMA VACINA CONTRA O  
CARRAPATO DE CÃES *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE,  
1806) (ACARI: IXODIDAE)**

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro  
Giunchetti

Coorientador: Dr. Ricardo Nascimento  
Araújo

Belo Horizonte

2019

043

Melo Júnior, Otoni Alves de Oliveira.

Prova de conceito e aprimoramento biotecnológico de alvos antigênicos para compor uma vacina contra o carrapato de cães *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) [manuscrito] / Otoni Alves de Oliveira Melo Júnior. – 2019.

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

Orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti. Coorientador: Dr. Ricardo Nascimento Araújo.

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

1. Biologia Celular. 2. *Rhipicephalus sanguineus*. 3. Controle de Ácaros e Carrapatos. 4. Vacinas. I. Giunchetti, Rodolfo Cordeiro. II. Araújo, Ricardo Nascimento. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**

**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE OTONI ALVES DE OLIVEIRA MELO JÚNIOR**

**214/2019\_ ENTRADA 2º/2015**

Às **treze horas** do dia **19 de agosto de 2019**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**PROVA DE CONCEITO E APRIMORAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE ALVOS ANTIGÊNICOS PARA COMPOR UMA VACINA CONTRA O CARRAPATO DE CÃES RHIPICEPHALUS SANGUINEUS (LATREILLE, 1806) (ACARI:IXODIDAE)**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

<b>Prof./Pesq.</b>	<b>Instituição</b>	<b>Indicação</b>
Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti	UFMG	Aprovado
Dra. Beatriz Rossetti Ferreira	USP	Aprovado
Dra. Daniel Sobreira Rodrigues	EPAMIG	Aprovado
Dr. Otto Domenici Mozzer	CEVA	Aprovado
Dra. Julia Angelica Gonçalves da Silveira	UFMG	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 19 de agosto de 2019.**

Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti (Orientador)

Dr<sup>a</sup>. Beatriz Rossetti Ferreira

Dr<sup>a</sup>. Daniel Sobreira Rodrigues

Dr. Otto Domenici Mozzer

Dr<sup>a</sup>. Julia Angelica Gonçalves da Silveira

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Professor do Magistério Superior**, em 27/06/2022, às 16:41, 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 **Julia Angelica Goncalves da Silveira, Professora do Magistério Superior**, em 28/06/2022, às 12:13, 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 **Daniel Sobreira Rodrigues, Usuário Externo**, em 29/06/2022, às 10:55, 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 **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 03/07/2022, 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 **Beatriz Rossetti Ferreira, Usuário Externo**, em 04/07/2022, às 14:52, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1547502** e o código CRC **2E1B83C6**.

Pelo momento em que a ciência de nossa Pátria amada passa, dedico essa Tese a todos os brasileiros que contribuíram para o nosso desenvolvimento científico e tecnológico, que de alguma forma me permitiu passar por esse momento. Dedico a quem sonha em fazer parte desse grupo, que os percalços do presente não interrompam ou mudem seu sonho. Dedico a um futuro brilhante, com a importância de “nossa profissão e paixão” devidamente reconhecida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos inúmeros camundongos BALB/c que carinhosamente chamei de John Paul Jones. Aos cães Lobo, Pongo, Branco, Dona, Mãezinha, Marrom e Baixinha. A todos incontáveis *R. sanguineus*. Sem esses mais que importantes seres nada desta linha para baixo existiria. Meu eterno respeito e agradecimento.

A toda a minha família, principalmente aos meus pais, por todo amor, dedicação integral e eterna paixão. Meus heróis e espelhos, tudo que eu faço é para vocês, e por vocês. Palavras não são o suficiente para descrever todo o sentimento.

Ao Rodolfo pelos seis anos de convívio e orientação. Pela oportunidade de participar de uma aventura de quatro anos que gerou muito conhecimento e aprendizado. O aprendizado que obtive durante esse tempo poucas pessoas conseguem, e parte se deve às abordagens propostas pelo Rodolfo, no início da vontade de pular na Lagoa da Pampulha, mas no fim agradece muito, pois vejo a diferença que fez em minha formação.

Ao Ricardo pela orientação que também foi fundamental para o início, desenvolvimento e fim do projeto, os conhecimentos que me passou sobre os carrapatos foram fundamentais.

À Marina, pela cumplicidade e carinho incondicional. Pela dedicação ao meu projeto como se fosse o seu. Nossa relação é uma verdadeira benção. Em sua companhia, até as horas intermináveis de análises se tornaram mais leves e agradáveis. Obrigado pela parceria de vida e de trabalho. Como já disse na minha dissertação e em nosso casamento “If the sun refused to shine, I would still be loving you, When mountains crumble to the sea, There'll still be you and me”, Thank you.

Ao Pedro, pelo futuro que teremos juntos, espero te dar todo o amor e carinho.

Aos alunos de iniciação científica Vinícius e Victória, por toda a dedicação ao projeto, sem os dois tudo teria sido mais difícil, não apenas pela ajuda, mas também pela amizade que desenvolvemos ao longo do tempo.

À Marcia, Jéssica, Paula e Gabriel do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos que muito me ajudaram a iniciar a colônia, identificação e dissecação de *R. sanguineus*.

A todos do Rodolfetes pela amizade e pela contribuição ao projeto.

À professora Beatriz e à Andressa por ensinar a instalar as câmaras de alimentação em cães, ajuda que foi fundamental para aumentar a colônia e dar continuidade ao projeto.

Aos meus eternos amigos Pedro, Felipe, Leonardo, Gustavo e Rafael, pelas inúmeras horas de descontração, paciência e compreensão, amizade sincera, meus irmãos de outros pais.

Ao Led Zeppelin, Pink Floyd, Queen, Beatles, Guns N' Roses, Elvis Presley, Frank Sinatra, Dean Martin, David Bowie, Elton John, Skank, Nelson Gonsalves, Toca Raul entre inúmeros outros, que mesmo de modo involuntário contribuíram nos momentos de tensão e descontração.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a Deus, fonte de vida, amor e esperança.

Se eu tivesse que escolher um entre todos os sentimentos, certamente escolheria a gratidão. Não há nada mais bonito do que uma pessoa grata. Eu considero como uma virtude das mais nobres. Para mim, a gratidão é o amor que reconhece a importância de atos e palavras proferidas por pessoas especiais. É o delicado conforto de ter sido auxiliado. É o meu eterno e sincero “obrigado”.



“If you got a job to do you got to do it well”

(Live and Let Die, McCartney & McCartney – 1973)

## RESUMO

Os carrapatos constituem um dos grupos mais importantes entre os vetores do Filo Arthropoda, sendo comparados apenas aos mosquitos. Esses artrópodes podem afetar o hospedeiro por meio da espoliação sanguínea ou pela transmissão de diversos patógenos, incluindo vírus, bactérias, helmintos e protozoários. Na medicina veterinária, o *Rhipicephalus sanguineus*, altamente específico para cães, tem grande relevância, considerando a diversidade de patógenos transmitidos, especialmente *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* e *Anaplasma platys*. Além disto, este carrapato tem ampla distribuição geográfica, com casos registrados nas Américas, Ásia, África, Oceania e Europa. Tradicionalmente, os métodos usados para controlar os carrapatos consistem na aplicação de produtos químicos, mas com eficácia reduzida no controle da população. O aumento da resistência a estes compostos é um grande problema para a indústria veterinária, uma vez que o custo para o desenvolvimento de novas formulações é muito alto, tornando complexo o desenvolvimento contínuo de novos compostos químicos. Esses fatos demonstram a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para o controle de populações de carrapatos. Nesse sentido, o presente estudo foi elaborado com o intuito de identificar e avaliar alvos antigênicos específicos de *R. sanguineus* com potencial de interferir no seu ciclo biológico, para que possam ser usados como uma estratégia alternativa de controle do carrapato. Foi realizado inicialmente (Capítulo I) o estudo de prova de conceito empregando imunização com antígenos de *R. sanguineus* (RsSap) em camundongos BALB/c e cães sem raça definida. Nesta etapa foi observado que a formulação foi considerada segura e reduziu a sobrevivência em todos os estádios evolutivos do carrapato (larva, ninfa e adultos), além de reduzir a quantidade de ovos gerados pelas teleóginas, indicando o potencial dos antígenos avaliados. Na etapa seguinte deste estudo (Capítulo II), foram utilizados anticorpos anti-RsSap para identificar novos alvos vacinais por *phage display*. Deste modo, foram identificadas seis sequências (S1-6) antigênicas diferentes. Na etapa final deste estudo (Capítulo III), essas sequências compuseram separadamente diferentes formulações vacinais que foram avaliadas em um novo ensaio pré-clínico. Os resultados evidenciaram que todas as formulações vacinais foram consideradas seguras e inócuas. Além disto, verificou-se que as formulações avaliadas apresentaram elevada antigenicidade e, alto potencial de interferência no ciclo biológico de *R. sanguineus*, chegando a eficácia de 99.57%. Este estudo demonstrou

pela primeira vez que é possível ter uma vacina contra o carrapato de cães *R. sanguineus*, com características biotecnológicas que favorecem sua produção em larga escala.

Palavras-chave: *Rhipicephalus sanguineus*. Vacina. Antígeno. Phage display. Cão.

## ABSTRACT

Ticks are one of the most important groups among the vectors of Phylum Arthropoda, compared only to mosquitoes. These arthropods can affect the host through blood spoliation or transmission of various pathogens, including viruses, bacteria, helminths and protozoa. In veterinary medicine the *Rhipicephalus sanguineus*, highly specific dog, is of great relevance given the diversity of transmitted pathogens, especially *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* and *Anaplasma platys*. In addition, this tick has a wide geographic distribution, with cases reported in the South, Central and North America, Asia, Africa, Oceania and Europe. Traditionally, the methods used to control ticks consist of the application of chemicals, but with reduced effectiveness in controlling the population. Increasing resistance to these compounds is a major problem for the veterinary industry as the cost of developing new formulations is very high, making the continued development of new chemical compounds complex. This demonstrates the need for the development of new strategies for sustainable control of tick populations. In this sense, the present study was designed to identify and evaluate specific *R. sanguineus* antigenic targets with potential to interfere with their biological cycle, so that they can be used as an alternative tick control strategy. Initially (Chapter I) the proof-of-concept study employing immunization with *R. sanguineus* antigens (RsSap) in BALB/c mice and mongrel dogs. At this stage it was observed that the formulation was considered safe and reduced survival in all evolutionary stages of the tick (larva, nymph and adult), besides reducing the amount of eggs generated by the teleogins, indicating the potential of the evaluated antigens. In the next step of this study (Chapter II), anti-RsSap antibodies were used to identify new *phage display* vaccine targets. Thus, six different antigenic sequences (S1-6) were identified. In the final step of this study (Chapter III), these sequences separately composed different vaccine formulations that were evaluated in a new preclinical trial. The results showed that all vaccine formulations were considered safe and harmless. In addition, it was found that the formulations evaluated presented high antigenicity and high potential for interference in the *R. sanguineus* biological cycle, reaching 99.57% efficacy. This study demonstrated for the first time that it is possible to have a tick vaccine against *R. sanguineus*, with biotechnological characteristics that favor its large-scale production.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus*. Vaccine. Antigen. Phage display. Dog.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica do <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . .....	21
Figura 2. Diferentes tipos de câmaras de alimentação utilizadas para manutenção de carrapatos <i>R. sanguineus</i> .....	31
Figura 3. Esquema de desafio em cães com formas larvais, ninfas e adultos. Cães do grupo Controle (CT) e grupo RsSap (RS) foram desafiados com larvas 21 dias após a terceira imunização (primeiro desafio).....	39
Figura 4. Perfil imunofenotípico de diferentes subpopulações de Linfócitos após imunização com RsSap.....	43
Figura 5. Produção de IgG específico para antígenos relacionados a formulação vacinal com RsSap.....	44
Figura 6. Efeito da imunização com RsSap no ciclo biológico de <i>R. sanguineus</i> alimentados em camundongos BALB/c.....	46
Figura 7. Produção de IgG específico para antígenos bruto induzido pela imunização com RsSap em cães .....	49
Figura 8. Efeito da imunização com RsSap no ciclo biológico de <i>R. sanguineus</i> alimentados em cães.....	52
Figura 9. Larvas secas em cão do grupo RsSap.....	53
Figura 10. Reatividade dos fagos após os ciclos de <i>biopanning</i> 1, 2 e 3 .....	66
Figura 11. Reatividade dos clones selecionados após o terceiro ciclo de <i>biopanning</i> agrupados de acordo com a sequência de aminoácidos.....	69
Figura 12. Camundongo BALB/c com dorso tricotomizado e câmara de alimentação utilizada no desafio com adultos de <i>R. sanguineus</i> .....	79
Figura 13. Perfil imunofenotípico de linfócitos T CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> e CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , linfócitos B CD19 <sup>+</sup> e monócitos CD14 <sup>+</sup> após imunização com as sequências 1-6.....	83
Figura 14. Avaliação da resposta imune humoral em camundongos BALB/c imunizados com as sequências 1-6.....	84
Figura 15. Impacto geral das sequências 1-6 em fêmeas e ovos de <i>R. sanguineus</i> após repasto sanguíneo em camundongos BALB/c.....	87
Figura 16. Fêmeas e machos secos após iniciarem o repasto sanguíneo.....	88
Figura 17. Variação de tamanho das teleóginas que realizaram a soltura.....	88
Figura 18. Representação de fêmeas durante o oitavo dia após início do desafio... ..	89
Figura 19. Eficácia vacinas das sequências 1-6.....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais para imunização de camundongos BALB/c com a formulação RsSap.....	32
Tabela 2. Grupos experimentais para imunização de cães SRD com a formulação RsSap.....	33
Tabela 3. Hemograma de camundongos BALB/c imunizados.....	41
Tabela 4. Leucograma de camundongos BALB/c imunizados .....	42
Tabela 5. Hemograma de cães .....	47
Tabela 6. Leucograma de cães .....	47
Tabela 7. Exame bioquímico de cães SRD .....	48
Tabela 8. Dosagem e sequenciamento do DNA (ng/ $\mu$ L) dos clones de fagos selecionados após o terceiro ciclo de <i>Biopanning</i> .....	70
Tabela 9. Grupos experimentais.....	76
Tabela 10. Hemograma de camundongos BALB/c imunizados com sequências 1 a 6 .....	80
Tabela 11. Função hepática e renal de camundongos BALB/c imunizados com sequências 1 a 6 .....	81
Tabela 12. Leucograma de camundongos BALB/c imunizados com sequências 1 a 6 .....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

4D8	Antígeno protetor 4D8
ALA	<i>Atlas of Living Australia</i>
BCA	Ácido Bicinconínico
BM86	Proteína de 86Kda da membrana de células intestinais de <i>Rhipicephalus microplus</i>
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CD3/ 4/ 8/ 14/ 19	<i>Cluster of Differentiation 3/ 4/ 8/ 14/ 19</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CT	Grupo Controle
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Fêmeas CT	Fêmeas originadas de ninfas alimentadas em cão do grupo Controle
Fêmeas RS	Fêmeas originadas de ninfas alimentadas em cão do grupo RsSap
FOB	<i>Free On Board</i>
FS	Fago selvagem
GBIF	<i>Global Biodiversity Information Facility</i>
HALUM	Hidróxido de alumínio
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HGB	Hemoglobina
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IER	Índice de Eficiência Reprodutiva
IgG	Imunoglobulina G
IN	Índice Nutricional
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
LB	Meio de Luria-Bertani
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaOH	Peróxido de hidrogênio
Ninfa CT	Ninfas originadas de larvas alimentadas em cão do grupo Controle
Ninfa RS	Ninfas originadas de larvas alimentadas em cão do grupo RsSap
NPs	Domínios C-terminais das Nucleoproteínas <i>o-Phenylenediamine (1,2-Benzenediamine)</i>
OPD	<i>Dihydrochloride</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-BSA	<i>Phosphate Buffered Saline + bovine serum albumin</i>
PEG	Polietilenoglicol

PIB	Produto Interno Bruto
RBC	<i>Red blood cels</i>
RsSap	Grupo antígeno de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> associado à saponina
S 1-6	Sequência de 1 a 6
SAP	Grupo Saponina
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
Seq 1-6	Grupos imunizados com as sequências de 1 a 6
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
SRD	Sem raça definida
T0	Tempo 0
T1	Tempo 1
T2	Tempo 2
T3	Tempo 3
T4	Tempo 4
TF	Tempo final
TU	Unidade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
um	Micrometro
VCM	Volume corpuscular médio



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Aspectos gerais do <i>Rhipicephalus sanguineus</i> : Distribuição geográfica e hospedeiro	20
1.2 Biologia do <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	21
1.3 Importância econômica do <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e métodos de controle .....	24
2. OBJETIVO.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
CAPÍTULO I: Ensaio pré-clínico vacinal com antígeno intestinal de fêmeas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> – prova de conceito.....	28
2.2 Objetivos Específicos .....	29
2.2.1 Avaliar inocuidade e imunogenicidade em camundongos BALB/c imunizados com antígenos intestinais de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> .....	29
2.2.2 Avaliar o efeito dos anticorpos induzidos pela imunização em fêmeas de <i>R. sanguineus</i> após repasto sanguíneo em camundongos BALB/c imunizados com antígenos intestinais.....	29
2.2.3 Avaliar inocuidade e imunogenicidade em cães imunizados com antígenos intestinais de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> : .....	29
2.2.4 Avaliar o efeito dos anticorpos induzidos pela imunização em larvas, ninfas e fêmeas de <i>R. sanguineus</i> após repasto sanguíneo em cães vacinados com extrato intestinal .....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
3.1 Obtenção e Manutenção da colônia de <i>R. sanguineus</i> .....	30
3.2 Coleta das amostras de intestino de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> e preparo da formulação vacinal RsSap .....	31
3.3 Ensaio pré-clínico vacinal com antígenos intestinais de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> em camundongos BALB/c .....	32
3.4 Ensaio pré-clínico vacinal com antígenos intestinais de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> em cães .....	33
3.5 Análise clínica da inocuidade do imunobiológico.....	34
3.6 Avaliação dos parâmetros hematológicos em camundongos BALB/c.....	34
3.7 Avaliação dos parâmetros hematológicos e função hepática e renal .....	34

3.8 Avaliação do perfil fenotípico das populações de linfócitos induzidos pela imunização com RsSap em camundongos BALB/c .....	35
3.9 Avaliação da presença de anticorpos induzidos pela vacinação em camundongos BALB/c e cães.....	35
3.10 Desafio com fêmeas de <i>R. sanguineus</i> em camundongos BALB/c vacinados .....	36
3.11 Desafio com larvas, ninfas, machos e fêmeas de <i>R. sanguineus</i> em cães imunizados .....	38
3.12 Análises estatísticas.....	39
4 RESULTADOS .....	40
4.1 A formulação vacinal RsSap foi considerada segura e inócua em camundongos BALB/c .....	40
4.2 A formulação RsSap induziu imunogenicidade marcada pelo aumento no percentual de Linfócitos B e pelos elevados níveis de IgG anti-RsSap.....	41
4.3 A imunização com RsSap em camundongos BALB/c induziu uma significativa interferência no ciclo biológico do <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	44
4.4 A formulação RsSap foi considerada segura e inócua em cães.....	47
4.5 A formulação RsSap induziu um perfil de imunogenicidade ao induzir altos níveis de IgG específicos para RsSap em cães.....	48
4.6 A imunização com RsSap em cães induziu interferência no ciclo biológico do <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	49
5. DISCUSSÃO.....	54
CAPÍTULO II: Identificação de novos alvos vacinais contra o carrapato de cães que possam ser produzidos em larga escala e com baixo custo .....	59
6. Objetivos Específicos .....	60
6.1 Purificação de anticorpos IgG anti-RsSap obtidos na etapa anterior.....	60
6.2 Seleção e identificação dos alvos de maior especificidade às IgGs anti-RsSap purificadas através da técnica de <i>phage display</i> .....	60
6.3 Extração e sequenciamento do DNA viral dos clones selecionados para identificação dos peptídeos alvo. ....	60
7. MATERIAL E MÉTODOS .....	61
7.1 Purificação de anticorpos IgG anti-RsSap.....	61

7.2 <i>Phage display</i> - Ciclos de <i>biopanning</i> .....	62
7.2.1 Seleção.....	62
7.2.2. Amplificação.....	63
7.2.3 Titulação.....	63
7.3 Reatividade dos fagos após os ciclos de <i>biopanning</i> .....	64
7.4 Individualização dos clones de fagos ( <i>Screening</i> ).....	64
7.5 Extração e sequenciamento do DNA viral dos clones selecionados para identificação dos peptídeos alvo .....	65
8. RESULTADOS .....	65
8.1 Avaliação da reatividade dos fagos após os ciclos de <i>biopanning</i> .....	65
8.2 Avaliação da reatividade de cada um dos clones após o terceiro ciclo de <i>biopanning</i> .....	67
8.3 Extração e sequenciamento do DNA viral dos clones selecionados para identificação dos peptídeos alvo .....	67
9. DISCUSSÃO.....	71
CAPÍTULO III: Ensaio pré-clínico vacinal com alvos vacinais definidos identificados por <i>phage display</i> .....	74
10. Objetivos específicos.....	75
10.1 Avaliar em camundongos BALB/c imunizados com seis diferentes formulações vacinais provenientes da seleção por <i>phage display</i> , os seguintes parâmetros:.....	75
10.2 Avaliar o potencial de interferência de seis formulações vacinais (S1-6) no ciclo de vida de <i>R. sanguineus</i> mantidos em camundongos BALB/c. ....	75
11. MATERIAL E MÉTODOS .....	76
11.1 Ensaio pré-clínico vacinal com diferentes formulações vacinais identificadas por <i>phage display</i> .....	76
11.2 Avaliação da inocuidade do imunobiológico.....	77
11.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos .....	77
11.4 Avaliação do perfil imunofenotípico das populações de linfócitos e monócitos induzidos pela imunização com as sequências 1-6 em camundongos BALB/c.....	77
11.5 Avaliação da presença de anticorpos induzidos pela vacinação.....	77
11.6 Repasto sanguíneo de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> para análise da interferência no ciclo biológico em camundongos BALB/c.....	78

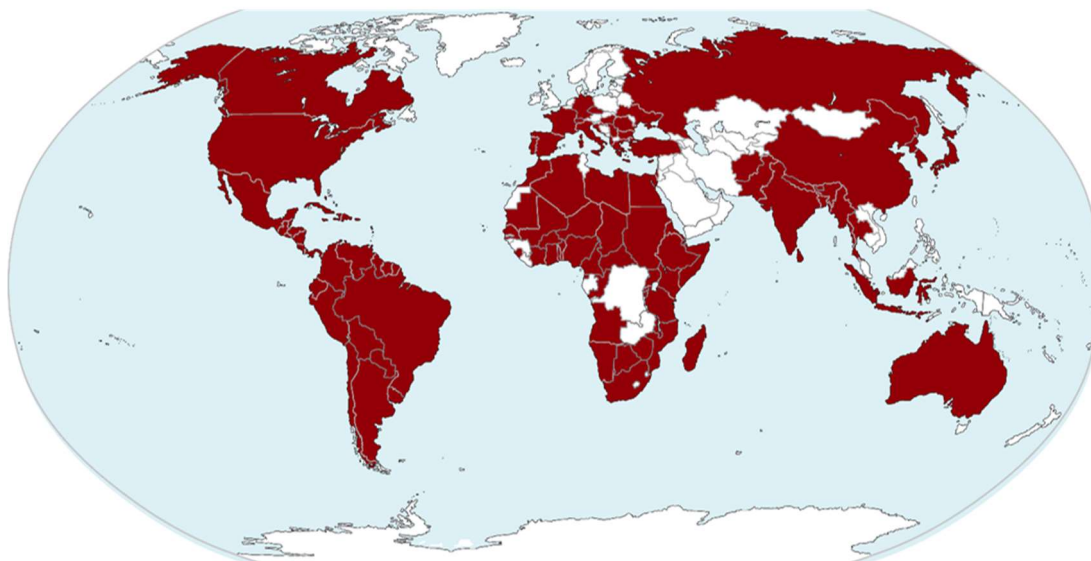
11.7 Cálculo da eficácia vacinal.....	79
11.8 Análises estatísticas.....	80
12. RESULTADOS.....	80
12.1. As formulações vacinais compostas pelas sequencias 1 a 6 foram consideradas seguras e inócuas em camundongos BALB/c.....	80
12.2 As formulações vacinais compostas pelas sequencias 2 a 6 induziram elevada imunogenicidade caracterizada pelo aumento no percentual de Linfócitos B e nos níveis de IgG antígeno-específicos.....	81
12.3 Avaliação do potencial de interferência das sequências 1-6 no ciclo biológico de <i>R. sanguineus</i> após repasto sanguíneo em camundongos BALB/c.....	84
12.4 Avaliação da eficácia vacinal das sequências 1 a 6.....	89
A Figura 19 representa a eficácia vacinal de cada sequência em interferir em aspectos biológicos de fêmeas de <i>R. sanguineus</i> . Os valores estão apresentados em ordem crescente de eficácia. Neste sentido, pode-se observar que todas as sequências apresentaram eficácia superior a 50%, sendo a sequência 4 (61%) a que apresentou menor eficácia e a sequência 5 (99%) a que apresentou maior eficácia. ....	
.....	90
13. DISCUSSÃO.....	91
14. CONCLUSÃO.....	96
15. REFERÊNCIAS.....	97
16. ANEXOS.....	107
16.1 Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais 389/ 2015.....	107
16.2 Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais 95/ 2017.....	108
16.3 Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais 95/ 2017.....	108

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais do *Rhipicephalus sanguineus*: Distribuição geográfica e hospedeiro

Os carrapatos (Acari : Ixodide) são um dos principais vetores de patógenos do Filo Arthropoda, sendo comparado apenas aos mosquitos (Insecta: Culicidae) como potenciais transmissores de agentes infecciosos (Hoogstraal, 1985; Marcondes, 2009). Os carrapatos podem afetar seus hospedeiros, diretamente em função da espoliação sanguínea e lesões cutâneas, sendo esses danos agravados em situações de intensa infestação (Sonenshine, 1991). Destaca-se ainda a ação indireta, pela transmissão e manutenção de diferentes patógenos, incluindo vírus (*Tick-borne Encephalitis Virus*, *Russian Spring Summer Encephalitis Virus*, *Creamean-Congo Hemorrhagic Fever Virus*, *Kyasanur Forest Disease Virus* e *Omsk Hemorrhagic Fever Virus*), bactérias (*Borrelia burgdorferi*, *B. mayonii*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *Rickettsia conorii*, *R. africae*, *R. sibirica*, *R. rickettsii* Ehrlichia *chaffeensis* e *E. phagocytophila*), helmintos (*Cercopithifilaria* spp) e protozoários (*Babesia divergens* e *B. microti*) (Jongejan & Uilenberg, 2004; Otranto et al., 2013; CDC, 2019; WHO, 2019). Essas características justificam o motivo de os carrapatos apresentarem grande importância, principalmente, médico-veterinária, sendo o carrapato marrom de cão (*Rhipicephalus sanguineus*) o que possui maior relevância, devido à crescente população de cães domésticos. Isso ocorre por ser a espécie de carrapato mais amplamente distribuída, sendo registrado sua presença em todos os continentes (Sonenshine, 1991; Szabó et al., 2001; González et al., 2004; GBIF, 2019; ALA, 2019) (Figura 1). Inokuma et al. (1996) e Louly (2007) relatam que a presença do *R. sanguineus* no hospedeiro varia de acordo com as condições climáticas, sendo encontrado por todo o ano em países tropicais e subtropicais (sem estações bem definidas) e no início da primavera até o outono em regiões com estações bem definidas.

## Distribuição de *Rhipicephalus sanguineus*



**Figura 1. Distribuição geográfica do *Rhipicephalus sanguineus*.**

Os cães são os principais hospedeiros para a manutenção de *R. sanguineus*, sendo de pouca relevância a quantidade de hospedeiro no ambiente, visto que um único cão é capaz de manter uma população local do carrapato. Autores já registraram a ocorrência de *R. sanguineus* em outros animais como gatos, coelhos, camelos, cabras, cavalos, ovelhas, morcegos, répteis, pássaros e humanos (Flechtmann, 1973; Walker *et al.*, 2000). Os adultos de *R. sanguineus* comumente são encontrados parasitando pescoço, orelha e regiões interdigitais de cães, enquanto as formas imaturas são observadas principalmente na região do pescoço (Jacobs, 2001). Dentre os patógenos transmitidos por *R. sanguineus* no Brasil, destacam-se *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* e *Anaplasma platys*. Apesar da baixa especificidade, o *R. sanguineus* também é capaz de transmitir patógenos aos seres humanos, como *R. rickettsii* e *R. conorii* (Palmas *et al.*, 2001; Demma *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2005).

### 1.2 Biologia do *Rhipicephalus sanguineus*

O *R. sanguineus* é um carrapato hematófago, de hábito primário nidícola, encontrado em ninhos, tocas ou abrigos dos hospedeiros e, também, de hábito endofílico, altamente adaptado ao ambiente domiciliar. São monotróficos, todos os estágios evolutivos se alimentam, preferencialmente, em uma mesma espécie de

hospedeiro e, são trioxênicos, ou seja, cada estágio evolutivo larva, ninfa e adultos após a soltura realiza a muda no ambiente e inicia o repasto sanguíneo em um novo ou no mesmo hospedeiro para se alimentar e realizam a muda no ambiente. Uma vez no hospedeiro, com o auxílio de estruturas sensoriais localizadas na extremidade dos palpos maxilares, os carrapatos procuram pelo local mais adequado para o início do repasto sanguíneo, preferencialmente na cabeça, nos interdígitos, costas, região inguinal e axilas. Uma vez localizado, prendem-se firmemente e forçam o hipostômio, que possui fileiras de dentes quitinosos dirigidos para trás contra a pele do hospedeiro, penetrando-a lentamente e funcionando como um órgão de fixação ao animal durante todo o repasto sanguíneo. As quelíceras também penetram a epiderme e com movimentos cortantes dilaceram-na, realizando assim a espoliação sanguínea (Sonenshine, 1991; Szabó & Bechara, 1999). Quando não estão parasitando o hospedeiro, habitam preferencialmente o chão ou as frestas e os buracos das tocas de animais (Labruna & Pereira, 2001; Labruna, 2004).

O período de alimentação do *R. sanguineus* é variável, dependendo do estágio evolutivo, variando de 2 dias para larvas a 21 dias para fêmeas (Petrova-Piontkovskaya, 1947; Koshy *et al.*, 1983; Pegram *et al.*, 1987; Troughton & Levin, 2007). Os carrapatos machos podem realizar vários repastos sanguíneos em um mesmo ou em diferentes animais, podendo ter outras funções além do reprodutivo (Rechav & Nutall, 2000). Rechav & Nutall (2000) descreveram que a presença dos machos pode aumentar a capacidade dos estádios imaturos em se alimentar. O sangue é considerado o principal estímulo para ocorrer a espermatogênese (machos) e a ovogênese (fêmeas), sendo que a maturação sexual e a cópula ocorrem somente no hospedeiro (Feldman-Muhsam & Borut, 1971).

A maioria dos carrapatos possui ritmo circadiano de soltura do hospedeiro, normalmente coordenado com as atividades do mesmo. Larvas de *R. sanguineus* realizam a soltura em período diurno, já as ninfas e adultos predominantemente noturno (Hadani & Rechav, 1969; Oliver, 1989). A soltura ocorre após os carrapatos estarem completamente alimentados, e em fêmeas adultas, após esse processo, iniciam o período de pré-oviposição entre 3-14 dias, em que há digestão do sangue e maturação dos ovos (Srivastava & Varma, 1964; Sweatman, 1967; Koch, 1982). A oviposição é realizada de forma ininterrupta, variando de 1500-4000 ovos, podendo levar semanas para ser completada (Koch, 1982; Pegram *et al.*, 1987).

O período de incubação dos ovos varia entre 6-23 dias (Koch, 1982; Jittapalapong *et al.*, 2000). Após eclosão das larvas, ocorre o enrijecimento da cutícula, e começam a procurar um hospedeiro para realização do repasto sanguíneo. Larvas recém-eclodidas são pequenas com comprimento, 0,54 mm; largura, 0,39 mm e possuem apenas três pares de patas. As larvas podem se alimentar por 3-10 dias antes da soltura e realizarem a muda para ninfas após 5-15 dias da soltura (Koshy *et al.*, 1983; Pegram *et al.*, 1987). Diferentemente das larvas, as ninfas possuem quatro pares de patas, e se assemelham aos adultos, exceto por serem menores (comprimento, de 1,14 a 1,3 mm; largura, de 0,57 a 0,66 mm), e serem sexualmente imaturas e possuírem escudo curto seja em ninfas que originam machos as que originam fêmeas. As ninfas se alimentam por 3-11 dias, realizam a soltura e muda para adultos (9-47 dias) (Koshy *et al.*, 1983; Pegram *et al.*, 1987).

Machos são alongados (comprimento, 2,28–3,18 mm; largura 1,11–1,68 mm), marrom-avermelhados, com pequenas pontuações espalhadas ao longo escudo dorsal. Antes do ingurgitamento, fêmeas adultas se assemelham aos machos em tamanho (comprimento 2,4–2,7 mm; largura 1,44–1,68 mm), forma e cor. Após o repasto sanguíneo, as fêmeas podem aumentar para 11,5 mm por 7,5 mm e sua coloração se torna verde oliva (Koshy *et al.*, 1983; Pegram *et al.*, 1987). Em condições favoráveis de temperatura e umidade, o ciclo biológico do *R. sanguineus* se completa em aproximadamente 63–91 dias (Goddard, 1987; Bechara, 1995; Louly *et al.*, 2007). *R. sanguineus* possui notória capacidade de sobrevivência fora do hospedeiro. Larvas, ninfas e adultos não alimentados podem sobreviver por até oito, seis e 19 meses sem se alimentar, respectivamente (Goddard, 1987). Em condições laboratoriais, os parâmetros biológicos *R. sanguineus* variam de acordo com a temperatura, umidade relativa e tipo de hospedeiro (Bellato & Daemon, 1997). A sobrevivência máxima de ninfas ocorre sob 20°C e 85% de umidade relativa. Em contra partida, adultos são mais resistentes a condições dissecantes, sobrevivendo em ambientes com 35°C e 35% de umidade relativa (Koch & Tuck, 1986). Yoder *et al.* (2006) demonstraram que *R. sanguineus* é menos dependente de ambientes úmidos, o que facilita seu estabelecimento em regiões áridas.



### 1.3 Importância econômica do *Rhipicephalus sanguineus* e métodos de controle

Diante do exposto, torna-se clara a importância do *R. sanguineus* como ectoparasito e vetor de patógenos, motivo pelo qual vem despertando atenção de órgãos públicos de saúde, evidenciado pela grande expansão da indústria farmacêutica veterinária na tentativa de criar formulações acaricidas (Labruna, 2004; Paz *et al.*, 2008). Do ponto de vista do mercado de produtos veterinários, a indústria *pet* brasileira faturou cerca de R\$ 20.3 bilhões em 2017, com crescimento de 7.9% em relação ao ano de 2016, e está em terceiro lugar no mercado mundial com faturamento de 5.1% dos US\$ 119 bilhões no mercado mundial (ABINPET, 2018). As exportações movimentaram US\$ FOB 210 milhões em 2017, contra cerca de US\$ FOB 5.9 milhões de importações (redução de 11% em relação às importações de 2016). O Brasil é o quarto país no ranking de população de animais de estimação no mundo, com 132,4 milhões de pets. Esse contingente movimenta um setor que, em 2016, chegou a ocupar 0,37% do PIB nacional, número superior àqueles dos componentes elétricos e eletrônicos e automação industrial. As vendas de *Pet Food* são a maior fonte de receita, ocupando 68,6%, seguidas por *Pet Service*, com 15,8%, *Pet Care* representou 7,9% e *Pet Vet* 7,7% no ano de 2017 (ABINPET, 2018). Segundo dados do ABINPET (2018) a população de cães domésticos no Brasil era de 52 milhões no ano de 2017, representando em média um cão para cada 4 brasileiros e cerca de 2 cães por domicílio. Esses dados apontam a importância desse mercado, em franca expansão, ilustrando o potencial econômico para novas formulações de uso veterinário, como o desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato de cães.

Tradicionalmente, os métodos empregados para controle de carrapatos consistem na aplicação de químicos acaricidas, porém com baixa eficácia em reduzir a população de carrapatos (de la Fuente & Kocan, 2014). Além da baixa eficácia, esses químicos causam complicações como a seleção de carrapatos resistentes (Eiden *et al.*, 2015, Lu *et al.*, 2015; Rodrigues-Vivas *et al.* 2017a; Rodrigues-Vivas *et al.* 2017b; Grzeda *et al.*, 2017)., contaminação do meio ambiente e, no caso da pecuária contaminação do leite e carne. A crescente resistência em relação aos acaricidas é um grande problema para a indústria veterinária, aumentando o custo para o desenvolvimento de novas substâncias, uma vez que o uso constante o torna insustentável (Parizi *et al.*, 2012). Nesse contexto, o desenvolvimento/aplicação de

vacinas que atuam no controle de carrapatos torna-se uma medida sustentável, reduzindo a utilização de acaricidas.

Como proposto por Elvin & Kemp (1994) para obter uma vacina eficaz, os antígenos candidatos devem possuir critérios importantes como: anticorpos induzidos no hospedeiro devem ser capazes de possuir acesso às proteínas alvo em quantidade suficiente; a formação do complexo anticorpo-antígeno deve ser capaz de interromper a função da proteína alvo e/ou induzir modificações fisiológicas que afetem o vetor; e o antígeno deve compartilhar epítomos conservados com diferentes espécies de carrapato; ocasionalmente as vacinas podem reduzir a capacidade do vetor em transmitir patógenos.

Uma das primeiras formulações vacinais, disponível comercialmente, foi a vacina Gavac<sup>®</sup> (Heber Biotec S.A.), desenvolvida para o controle de carrapatos de bovinos (*Rhipicephalus microplus*), produzida em 1993 (Havana, Cuba) (de la Fuente *et al.*, 2007). Essa vacina resultou na redução da anaplasmose e babesiose, evitando perda de 6 milhões de dólares pela indústria pecuária cubana. No Brasil a aplicação da Gavac<sup>®</sup> demonstrou resultados semelhantes, redução de 50% da população de *R. microplus* e redução em 60% a utilização de químicos acaricidas (Rodríguez *et al.* 1995). Valle *et al.* (2004) demonstraram que no período de 1995-2004, houve redução em 87% na utilização de acaricidas para o controle de carrapato de bovinos. Outra vacina comercial destinada ao controle de carrapatos de bovinos, TickGard<sup>®</sup> (Queensland Dairyfarmers Organization, Austrália) resultou na redução de 56% da população de carrapatos, com redução em 72% da capacidade reprodutiva dos carrapatos, além de observado maior ganho de peso nos bovinos após seis meses da imunização (Jonsson *et al.*, 2000). Ambas vacinas, Gavac<sup>®</sup> e TickGard<sup>®</sup>, são específicas para *R. microplus* e obtidas através da proteína recombinante BM86 proveniente do intestino de *R. microplus* (de la Fuente *et al.*, 2007). Estudos que avaliaram o seu desempenho em outras espécies de carrapato observaram que há quase 100% de eficácia contra *Boophilus annulatus* (Fragoso *et al.* 1998), porém, sua eficácia contra *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum* foi próxima de zero (de Vos *et al.* 2001). Por mais que as vacinas Gavac<sup>®</sup> e TickGard<sup>®</sup> possuam eficiência comprovada, há grande variação na eficácia levando em consideração diferentes regiões do mundo, tendo em vista as diferentes populações de carrapatos de cada local, resultando em baixa adesão da vacina por produtores no mercado nacional.

Nesse mesmo sentido, diferentes autores buscaram por proteínas de *R. sanguineus* e avaliaram o seu potencial como mecanismo de redução do ciclo biológico de carrapato do cão. A proteína 4D8 desempenha um papel crítico durante a alimentação e a oviposição do carrapato, que acaba por resultar na redução da progênie do carrapato. Essa proteína é ortóloga de “*akirins*” de insetos, com papel importante na imunidade e em outras vias moleculares, desencadeando um papel crucial no processo de alimentação (Sonenshine 1991; de la Fuente *et al.*, 2006a; de la Fuente *et al.*, 2006b). De la Fuente *et al.* (2006a) silenciando 4D8 em diferentes espécies de carrapatos, incluindo fêmeas de *R. sanguineus*, mostram a importância desta proteína nos parâmetros biológicos desse carrapato, com drástica redução na ingestão de sangue e na massa de ovos, bem como aumento na mortalidade de fêmeas de *R. sanguineus*. Ferrolho *et al.* (2017) descreveram resultados referentes ao silenciamento do gene da Ferritina 1 em fêmeas de *R. sanguineus* e alimentadas em cães. Nesse estudo, a falta de Ferritina 1 reduziu o volume de sangue ingerido, e afetou a morfologia pedicelar e oocitária, indicando processo degenerativo e/ ou reabsortivo.

Tendo em vista o comportamento biológico de *R. sanguineus*, que pode causar desde espoliação sanguínea e lesões cutâneas, à transmissão de diversos patógenos, a elaboração de vacinas contra esta espécie de carrapato, torna-se essencial. Esta estratégia é interessante por permitir o controle do *R. sanguineus*, minimizando assim o risco de transmissão de patógenos ao cão, bem como os efeitos da ação espoliativa do carrapato. Nesse contexto, a identificação de proteínas ou epítomos do carrapato, que possam induzir uma resposta imune no cão, e, interferir em aspectos biológicos do *R. sanguineus*, poderá contribuir de forma efetiva no controle populacional dessa espécie. Nesse sentido, o presente projeto foi elaborado de modo a estabelecer diferentes estratégias que possam favorecer a identificação de alvos proteicos do *R. sanguineus*, para serem utilizados como vacina para o controle dos carrapatos de cães.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar e testar alvos antigênicos capazes de interferir no ciclo biológico do *Rhipicephalus sanguineus*.

Para facilitar a compreensão das etapas desenvolvidas, este estudo foi dividido em três capítulos com as suas respectivas metodologias, resultados e discussão, conforme descrito a seguir.

**CAPÍTULO I: Ensaio pré-clínico vacinal com antígeno intestinal de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* – prova de conceito**

## 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar em camundongos BALB/c imunizados com antígenos intestinais de fêmeas de *R. sanguineus*:

- Inocuidade do imunobiológico.
- Hemograma.
- Perfil imunofenotípico de leucócitos circulantes.
- Presença de anticorpos IgG induzidos pela imunização.

2.2.2 Avaliar em fêmeas de *R. sanguineus* após repasto sanguíneo em camundongos BALB/c imunizados com antígenos intestinais:

- Taxa de sobrevivência.
- Oviposição individual e fertilidade dos ovos.
- Viabilidade de adultos.

2.2.3 Avaliar em cães imunizados com antígenos intestinais de fêmeas de *R. sanguineus*:

- Inocuidade do imunobiológico.
- Hemograma, Leucograma e, perfil hepático e renal.
- Presença de anticorpos IgG induzidos pela vacinação.

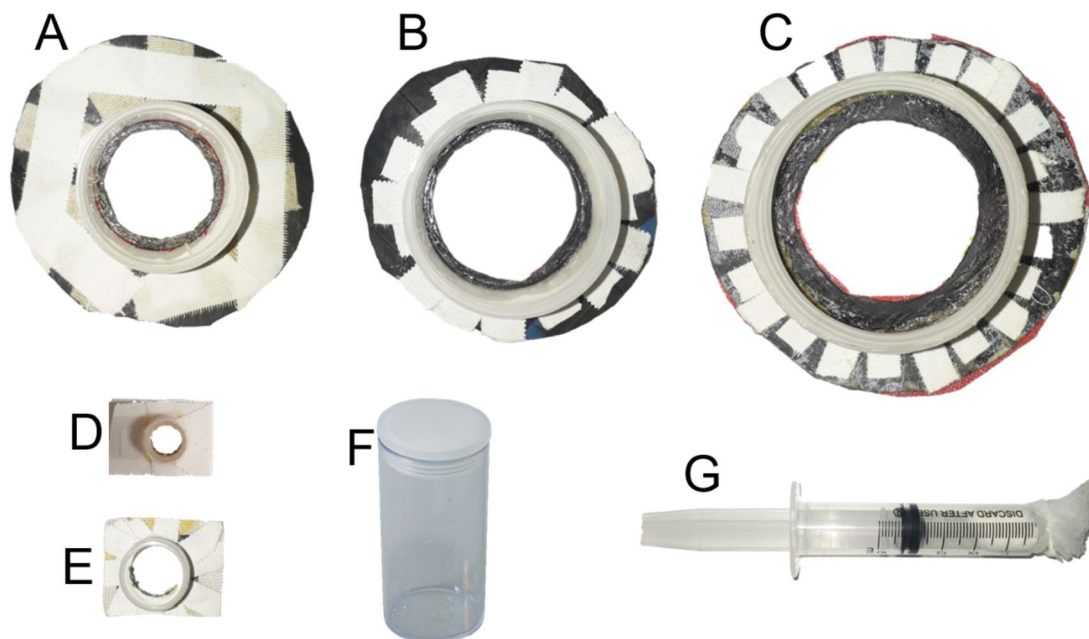
2.2.4 Avaliar em larvas, ninfas e fêmeas de *R. sanguineus* após repasto sanguíneo em cães vacinados com extrato intestinal:

- Taxa de sobrevivência.
- Viabilidade de larvas, ninfas e adultos.
- Oviposição individual e fertilidade dos ovos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção e Manutenção da colônia de *R. sanguineus*

Os carrapatos *R. sanguineus* utilizados no presente projeto foram obtidos no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos-UFMG e mantidos em estufa de Demanda Química do Oxigênio (BOD) climatizada com temperatura média de 27°C e 80% de umidade no Laboratório de Biologia das Interações Celulares, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para a alimentação de larvas, ninfas, machos e fêmeas de *R. sanguineus*, foram fixadas câmaras de alimentação em cães. As câmaras de alimentação foram confeccionadas a partir de tubos plásticos com diâmetro variando de 4, 5 e 6 cm e 3 cm de altura (sem fundo) colados em borracha com adesivo de contato (Brascoplast – Brascola Joinville, Santa Catarina, Brasil) (Figura 2 – A, B e C, respectivamente). Previamente ao repasto, as câmaras de alimentação foram fixadas no dorso de cães, com o tamanho das câmaras variando de acordo com o tamanho do cão, os quais tiveram o dorso tricotomizado para a instalação das câmaras de alimentação e mantidos no canil do ICB-UFMG. Após a soltura, as larvas e ninfas foram transferidas para recipientes plásticos (J 30 – Injeplast São Paulo, São Paulo) de 3,1 cm x 6,2 cm de diâmetro e altura (Figura 2 – F) para realizarem a muda. As câmaras de alimentação observadas na figura 2 D e E foram utilizadas em camundongos, como descrito nos itens 3.3 e 11.6, respectivamente. As fêmeas foram transferidas individualmente para recipientes plástico, com a mesma descrição anterior, para realizarem a postura individual dos ovos. Ao fim da oviposição, os ovos foram transferidos para um recipiente adaptado o qual consistiu de seringas plásticas de 5 mL com a ponta removida e fechada com algodão (Figura 2 - G).



**Figura 2. Diferentes tipos de câmaras de alimentação utilizadas para manutenção de carrapatos *R. sanguineus*.** Câmaras de alimentação de tubos plásticos com diâmetro variando de 4 cm (A), 5 cm (B) e 6 cm (C) e altura de 3 cm (sem fundo) colados em borracha e tubos plástico com diâmetro de 0.8 cm (D) e 1.5 cm (E) e 2 cm de altura. F: Recipiente plástico de 3,1 cm x 6,2 cm de diâmetro e altura. G: seringas plásticas de 5 mL com a ponta removida e fechada com algodão.

### 3.2 Coleta das amostras de intestino de fêmeas de *R. sanguineus* e preparo da formulação vacinal RsSap

Para a coleta dos intestinos foram utilizadas fêmeas de *R. sanguineus* com 4 semanas após a muda, que possuem em média 6 ug de proteínas. Primeiramente, o capitulum foi removido com auxílio de microtesoura, e realizado dois cortes em cada lado do idiossoma, através da abertura feita pela remoção do capitulum. Após esses procedimentos foram transferidas para 20 µL de solução salina 0,9%, em placas de petri revestida de silicone, duas micropinças foram utilizadas para a abertura do idiossoma e exposição do intestino, que foi removido e transferido para micro tubos estéreis contendo 20 uL de solução salina 0.9% e armazenados à -80°C até o momento do uso.

Para o preparo da vacina, as amostras de intestino de fêmeas de *R. sanguineus* foram submetidas ao processo de rompimento da membrana intestinal em sonicador ultrassônico de banho (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA), seguidas de dosagem



das proteínas pelo método de Ácido Bicinconínico (BCA), como descrito por (Smith et al, 1985) e medida da absorvância no espectrofotômetro Nanodrop (DeNovix DS-11 Spectrophotometer, Wilmington, DE, EUA).

### 3.3 Ensaio pré-clínico vacinal com antígenos intestinais de fêmeas de *R. sanguineus* em camundongos BALB/c

No ensaio pré-clínico vacinal, foram utilizados 18 camundongos BALB/c machos, com seis semanas de idade, livres de patógenos específicos (SPF), provenientes do Biotério Central da UFMG. Os animais foram mantidos no Biotério de Ensaio Pré-clínicos do Departamento de Morfologia (ICB/UFMG), em caixas de polisulfona de 20x32x21cm com maravalha autoclavada, dispostas em rack ventilada em sala climatizada, com ração autoclavada (Nuvilab CR-1 autoclavável) e água *ad libitum* proveniente de um sistema de filtração dupla, com filtro de primeiro estágio com porosidade de 0,45µm, e segundo estágio de filtração com 0,2µm. Os camundongos receberam marcação com ácido pícrico (Vetec, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em diferentes regiões do corpo para identificação e acompanhamento de cada indivíduo ao longo de todo o estudo. Os animais foram divididos em três grupos de 6 indivíduos (Tabela 1).

**Tabela 1. Grupos experimentais para imunização de camundongos BALB/c com a formulação RsSap.**

Grupo	Sigla	Composição do Inócuo
Controle	CT	Solução Salina 0.9%
Saponina	Sap	10 ug de saponina diluído em Solução Salina 0.9%
Imunizado	RsSap	10 ug de saponina + 60 ug de extrato bruto de <i>R. sanguineus</i>

O esquema de vacinação consistiu de três doses subcutâneas de 100µL, com intervalo de 14 dias. Os antígenos vacinais foram associados ao adjuvante Saponina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As concentrações do antígeno e do adjuvante foram estabelecidas em estudos pré-clínicos preliminares, onde foram realizadas cinéticas para definir a melhor dose a ser utilizada (Mendonça, 2017 – dados não publicados). O experimento foi dividido em cinco momentos de avaliação: antes do

início do protocolo vacinal (T0), 7 dias após a primeira dose (T1), 7 dias após a segunda dose (T2), 20 dias após a terceira dose (T3) e 40 dias após a terceira dose vacinal quando foi realizada a eutanásia dos animais (T4). A inocuidade do imunobiológico, os parâmetros hematológicos e a presença de anticorpos séricos foram avaliados em todos os tempos do estudo. Vale ressaltar que os parâmetros da série vermelha Contagem de Hemácias (RBD), Hemoglobina (HGB), Volume Corpuscular Média (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e série branca Leucócitos totais, Linfócitos, Eosinófilos e Neutrófilos também foram avaliados antes do início do protocolo vacinal (T0), a fim de ser utilizado como controle e atestar a saúde inicial dos animais utilizados. Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), conforme protocolos nº389/ 2015 (Anexo, item 16.1) e 95/2017 (Anexo, item 16.2).

### **3.4 Ensaio pré-clínico vacinal com antígenos intestinais de fêmeas de *R. sanguineus* em cães**

Para o ensaio pré-clínico vacinal, foram utilizados 6 cães sem raça definida (Grupo controle N=3 e Grupo RsSap N=3), mantidos no canil do ICB-UFMG, com água e ração Quatree (Granvita, Pará de Minas – MG) *ad libitum*.

O esquema de vacinação consistiu de três doses subcutâneas, contendo 120 µg de antígenos, inoculado em intervalos de 21 dias. Os antígenos vacinais foram associados ao adjuvante Saponina na concentração de 1 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), sendo este grupo denominado de RsSap. O experimento foi dividido em quatro momentos de avaliação: 14 dias após a primeira dose (T1), 14 dias após a segunda dose (T2), 14 dias após a terceira dose (T3), e 60 dias após a terceira dose vacinal (T4). A inocuidade do imunobiológico, os parâmetros hematológicos e a presença de anticorpos séricos foram avaliados em todos os tempos do estudo. Vale ressaltar que os parâmetros sanguíneos também foram avaliados antes do início do protocolo vacinal (T0) a fim de servir de controle e atestar sobre a saúde inicial dos animais utilizados (Tabela 2).

**Tabela 2. Grupos experimentais avaliados no estudo de prova de conceito da formulação RsSap.**

<b>Grupo</b>	<b>Sigla</b>	<b>Composição do Inócuo</b>
--------------	--------------	-----------------------------

Controle	CT	Solução Salina 0.9%
Imunizado	RsSap	1 mg de saponina + 60 ug de estrato bruto de <i>R. sanguineus</i>

### 3.5 Análise clínica da inocuidade do imunobiológico

A inocuidade do imunobiológico foi avaliada através da 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 disso, foi feito um acompanhamento do peso e uma observação diária do comportamento dos animais.

### 3.6 Avaliação dos parâmetros hematológicos em camundongos BALB/c

A coleta de sangue em camundongo BALB/c foi realizada através de incisão na veia lateral da cauda com lâmina de bisturi N11. Para avaliação da série eritrocítica e leucograma, cerca de 50µL de sangue foram coletados e transferidos para microtubos de 0,6 mL contendo EDTA 10%. Em seguida, as amostras foram lidas em leitor hematológico veterinário Bio-2900Vet (Hematology Analyser, Bioeasy, EUA) no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias-UFMG.

### 3.7 Avaliação dos parâmetros hematológicos e função hepática e renal

A coleta de sangue em cães foi realizada através da veia jugular. Para avaliação da série eritrocítica e leucocitária 4 mL de sangue foram transferidos para tubos contendo EDTA (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Em seguida, as amostras foram lidas em leitor hematológico veterinário Bio-2900Vet (Hematology Analyser, Bioeasy, EUA) Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias-UFMG. Para a avaliação do perfil hepático e renal, 9 mL de sangue foram coletados e transferidos para tubo seco (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e lidas em leitor hematológico veterinário Bio-2900Vet.

### **3.8 Avaliação do perfil fenotípico das populações de linfócitos induzidos pela imunização com RsSap em camundongos BALB/c**

Cinquenta microlitros de sangue de camundongos BALB/c foram transferidos para tubos de poliestireno de 5mL (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo os anticorpos anti-CD3-Percep-Cy.5 (clone 145-2C11 - eBioscienc - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, EUA), anti-CD4-FITC (clone RM4-5 – eBioscienc - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, EUA) e anti-CD8-APC (clone 53-6.7 - eBioscienc - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, EUA) e, outros 50µL transferidos para tubo de poliestireno contendo anticorpo anti-CD19-FITC (clone MB19-1 - eBioscienc - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, EUA). Os tubos foram homogeneizados em vortex e incubados por 30 minutos ao abrigo da luz. Após incubação, foram adicionados 3mL, 1mL por vez, de solução de lise Billing Dog e incubados por 10 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação a reação de lise foi interrompida pela adição de 1mL de PBS-W e as amostras foram centrifugadas a 300 xg durante 7 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado o pellet ressuscitado em vortex e adicionados 3mL de PBS-W. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 200µL de solução fixadora (FACS Lysing Solution – BD Biosciences). Para aquisição dos dados foram obtidos 30.000 eventos totais utilizando o citômetro de fluxo FACSCanthalII™-BD, pelo software DIVA™.

### **3.9 Avaliação da presença de anticorpos induzidos pela vacinação em camundongos BALB/c e cães**

Amostras de soro de camundongos imunizados foram submetidas ao teste imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) para verificar a presença de anticorpos IgG total induzidos pelo antígeno vacinal. Placas de 96 poços (NUNC - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) foram sensibilizadas com extrato bruto contendo, com 0,5 µg/poço para camundongos e 0,01 µg/ poço para cães, diluído em 100 µL de solução de cobertura Tampão Carbonato (0,1% de carbonato de sódio e 0,2% de bicarbonato de sódio). As placas foram mantidas *overnight* em geladeira, ao abrigo da luz. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes consecutivas com PBS-Tween (PBS 1x com 0,05% de Tween 20). Após as lavagens, foram adicionados 300 µL de solução de bloqueio PBS caseína (PBS 1x com 2% de caseína, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em cada poço, e

as placas foram mantidas a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 90 minutos. Após a incubação, o conteúdo das placas foi removido e foram adicionados 100 µL de PBS-Tween contendo o soro dos camundongos diluído na proporção de 1:200 e de cães diluído na proporção de 1:1000. As amostras foram homogeneizadas e mantidas *overnight* em geladeira, ao abrigo da luz. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes consecutivas com PBS-Tween. Após as lavagens, foram adicionados 100 µL de anticorpo secundário anti-IgG total conjugado com peroxidase diluído 1:2000 em PBS-Tween (anti-*mouse* IgG-h+I HRP, Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, TX, EUA). As placas foram incubadas por 70 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e lavadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Para revelação, foram adicionados 50µL do substrato contendo o-Phenylenediamine (1,2-Benzenediamine) Dihydrochloride (OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), solução de ácido cítrico (0,7% de fosfato de sódio dibásico e 0,5% de ácido cítrico) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Posteriormente, adicionou-se 30µL de ácido sulfúrico a 2,5 M para interromper a reação. A leitura das amostras foi realizada no espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Advices, Sunny Vale, CA, EUA), em comprimento de onda de 490 nm.

Para a reação de ELISA para avaliar a presença de IgG induzido pela imunização em cães utilizou-se o mesmo procedimento descrito acima com alteração da diluição do soro em PBS-Tween 1:1000 e a utilização do anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase diluído 1:4000 em PBS-Tween (Anti-Dog IgG - whole molecule - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

### **3.10 Desafio com fêmeas de *R. sanguineus* em camundongos BALB/c vacinados**

A avaliação dos aspectos biológicos de *R. sanguineus* após repasto foi realizada para verificar se os anticorpos induzidos pela vacinação, ao entrarem em contato com o trato digestório seriam capazes de interferir na sobrevivência e no desenvolvimento do carrapato.

Para realizar o repasto sanguíneo de fêmeas de *R. sanguineus* em camundongos BALB/c vacinados, 21 dias após a última dose vacinal os animais foram anestesiados intraperitonealmente utilizando 100 µL de solução anestésica de 21,6% quetamina (Cloridrato de Cetamina 10%) e 13,5% xilazina (Cloridrato de xilazina 2%) (Syntec – Santana de Parnaíba – SP). Essa dose foi calculada considerando o peso

médio dos animais de 27 g. As câmaras de alimentação foram elaboradas de acordo com Bouchard e Wikel (2005), com alterações. Brevemente, microtubos de 2 mL foram cortados 1,5 cm abaixo da tampa e colados em uma tira de esparadrapo com 2cm x 2 cm de largura e comprimento (Figura 2 – D). O pêlo dorsal dos camundongos foi removido e as câmaras de alimentação foram fixadas com o adesivo de contato Brascoplast. Vinte e quatro horas após a fixação das câmaras duas fêmeas e um macho de *R. sanguineus* foram colocados para realizarem o repasto sanguíneo. Os camundongos foram alojados no insetário do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos com temperatura controlada ( $23 \pm 1$  °C), humidade ( $70 \pm 5\%$ ) e ciclo claro/ escuro de 12 h/ 12 h.

A avaliação dos aspectos biológicos de *R. sanguineus* teve início no terceiro dia após instalação das câmaras de alimentação e foi avaliado até a soltura de todas as fêmeas, sendo avaliados inicialmente se todas as fêmeas iniciaram o repasto sanguíneo. As câmaras de alimentação foram conferidas em intervalos de 12 horas para registro e remoção das fêmeas que realizaram a soltura. As fêmeas foram pesadas em balança analítica e transferidas para um recipiente tampado e mantido em BOD a  $28 \pm 2$  °C e umidade 80%. Uma vez em BOD, as fêmeas também foram avaliadas diariamente com o objetivo de detectar quaisquer alterações biológicas. Os ovos foram pesados e transferidos para seringas de 5 mL com a ponta removida e com tampa de algodão, mantidos em BOD a  $28 \pm 2$  °C e umidade 90%. O número de ovos foi contado de acordo com os dados fornecidos por Hadi e Adventini (2015). Também foi registrado quais fêmeas não realizaram a oviposição e seu tempo de vida. Duas fórmulas foram usadas para avaliar o Índice de Eficiência Reprodutiva (IER) e o Índice Nutricional (IN), de acordo com Bennet (1974):

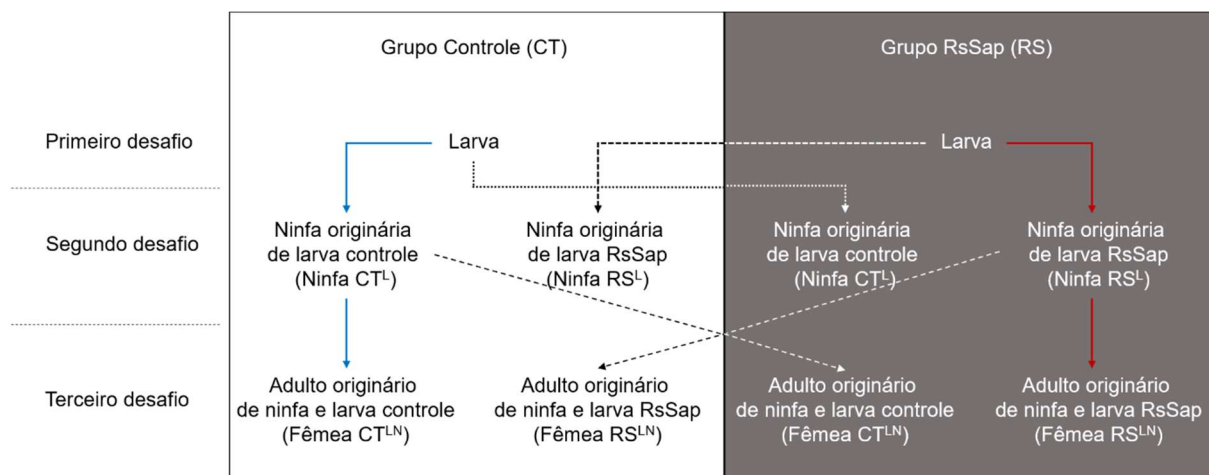
$$\text{IER} = \frac{\text{peso dos ovos}}{\text{peso inicial das fêmeas}} \times 100$$

$$\text{IN} = \frac{\text{peso dos ovos}}{\text{peso inicial das fêmeas} - \text{peso final das fêmeas}^*} \times 100$$

\* peso das fêmeas após oviposição

### 3.11 Desafio com larvas, ninfas, machos e fêmeas de *R. sanguineus* em cães imunizados

O repasto sanguíneo de larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus* em cães foi iniciado 21 dias após a terceira dose vacinal. A fixação das câmaras de alimentação foi realizada conforme descrito no item “3.1 Obtenção e Manutenção da colônia de *R. sanguineus*”. Primeiramente, 600 larvas foram colocadas para alimentarem em cães (conforme os grupos descritos na Tabela 2) e após a soltura foram transferidas para tubos plástico J 30 (Figura 2 - F) e mantidas em incubadora BOD a 28 °C  $\pm$ 2 °C e umidade 80%. Duas semanas após a muda das larvas em ninfas, 100 ninfas foram colocadas em cada cão, sendo 50 ninfas provenientes das larvas alimentadas em cães do grupo controle e 50 ninfas provenientes das larvas alimentadas em cães do grupo imunizado com RsSap (Figura 3). Após a soltura as ninfas foram transferidas para tubos plástico J 30 e mantidas em BOD a 28 °C  $\pm$ 2 °C e umidade 80%. Duas semanas após a muda das ninfas 30 fêmeas e 30 machos foram colocadas em cada cão da seguinte forma, 15 fêmeas e 15 machos provenientes das ninfas alimentadas em cão controle e o restante de ninfas alimentadas em cão imunizado (Figura 3). Após a soltura as fêmeas foram avaliadas quanto ao peso e comprimento e transferidas para tubos J 30 para oviposição individual, posteriormente os ovos foram pesados e transferidos para seringas de 5 mL com a ponta removida e com tampa de algodão, mantidos em BOD a 28 °C  $\pm$ 2 °C e umidade 90%. O esquema de desafios está representado na Figura 3. O número de ovos foi calculado de acordo com os dados fornecidos por Hadi e Adventini (2015). Também foi registrado quais fêmeas não realizaram a oviposição e seu tempo de vida. Duas fórmulas foram usadas para avaliar o Índice de Eficiência Reprodutiva (IER) e o Índice Nutricional (IN), de acordo com Bennet (1974), descritas no item 3.9.



**Figura 3. Esquema de desafio em cães com formas larvais, ninfas e adultos.** Cães do grupo Controle (CT) e grupo RsSap (RS) foram desafiados com larvas 21 dias após a terceira imunização (primeiro desafio). No segundo desafio ninfas originárias de larvas que fizeram repasto sanguíneo em cães CT desafiaram cães do grupo CT e do grupo RsSap, separadamente. Ninfas originárias do grupo RsSap desafiaram cães do grupo CT e RsSap, separadamente. No último desafio, os adultos originários de ninfas e larvas que alimentaram apenas em cães do grupo controle foram colocadas para realizarem repasto sanguíneo em cães dos grupos CT e RsSap, separadamente. Adultos originados de larvas e ninfas que alimentaram apenas em cães do grupo RsSap foram colocadas para desafiar cães dos grupos CT e RsSap, separadamente.

### 3.12 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA). Os dados apresentaram distribuição não paramétrica no teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, dessa forma, para análise comparativa entre dois grupos, foi empregado o teste Mann-Whitney. A comparação das curvas de sobrevivência foi realizada pelo teste de Log-Rank Mantel-Cox. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .



## 4 RESULTADOS

### 4.1 A formulação vacinal RsSap foi considerada segura e inócua em camundongos BALB/c

O protocolo vacinal não induziu nenhuma reação adversa como nódulos, pápulas ou úlceras no local do inócuo, bem como não foi observado alteração comportamental ou perda de peso. Além disso, análises macroscópicas da morfológicas do fígado, baço e rim foram realizadas após a eutanásia, e nenhuma alteração foi observada.

As análises realizadas para a série eritrocítica e plaquetas (Tabela 3), mostrou que a maioria dos resultados estão dentro dos valores de referência estabelecidos por Araújo (2012), ainda que fossem observadas diferenças estatísticas, como descritas a seguir. Pode-se observar redução do número de Eritrócitos (RBC) do grupo controle (CT) no T2, T3 e T4 quando comparados a T1. No grupo Saponina (Sap) a contagem de hemácias foi menor em T2 e T4 quando comparadas a T1. Os resultados das contagens de hemoglobina (HGB) para o grupo Controle apresentaram menores valores em T2, T3 e T4 quando comparado ao T1. No grupo Saponina foi observada redução de HGB em T2 e T4 em relação ao T1. A análise comparativa entre grupos revelou em T1 redução de HGB no grupo RsSap em relação ao grupo Controle. A avaliação do Volume Corpuscular Médio (VCM) no grupo controle mostrou redução em T1, T2 e T3 em relação a T4.

O VCM do grupo Saponina foi menor em T1, T3 e T4 comparado ao T2. No grupo RsSap foi observado que o Volume Corpuscular Médio foi maior em T4 em relação ao T1. Comparando os grupos constatamos VCM menor no grupo RsSap comparado aos grupos Controle e Saponina (T2). As diferenças observadas para Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC) foram semelhantes, sendo os valores de T1, T2 e T3 menores que os observados em T4, tanto para o grupo controle quanto Saponina. Semelhanças também foram observadas em T4, com menor HCM e MCHC pelo Grupo RsSap em relação aos grupos Controle e Saponina.

**Tabela 3. Hemograma de camundongos BALB/c imunizados com RsSap.**

	RBC ( $\times 10^6$ mm <sup>3</sup> )	HGB (g/dL)	VCM (fL)	HCM (g/dL)	CHCM (g/dL)	
T0	10,76 $\pm$ 0,59	16,00 $\pm$ 0,69	47,48 $\pm$ 1,08	14,87 $\pm$ 0,33	31,34 $\pm$ 0,43	
T1	CT	11,09 $\pm$ 0,71	16,4 $\pm$ 0,73	47,17 $\pm$ 0,83	14,92 $\pm$ 0,46	31,63 $\pm$ 1,00
	Sap	10,56 $\pm$ 0,47	15,47 $\pm$ 1,10	46,88 $\pm$ 0,58	14,94 $\pm$ 0,42	31,90 $\pm$ 0,73
T2	RsSap	10,41 $\pm$ 0,51	14,81 $\pm$ 1,46 <sup>CT</sup>	46,99 $\pm$ 0,78	14,93 $\pm$ 0,36	31,79 $\pm$ 0,61
	CT	9,45 $\pm$ 1,36 <sup>T1</sup>	14,02 $\pm$ 1,72 <sup>T1</sup>	48,48 $\pm$ 1,28	14,92 $\pm$ 0,46	30,77 $\pm$ 0,52
T3	Sap	9,60 $\pm$ 0,83 <sup>T1</sup>	14,01 $\pm$ 1,10 <sup>T1</sup>	47,93 $\pm$ 0,62 <sup>T1</sup>	14,63 $\pm$ 0,15	30,47 $\pm$ 0,31
	RsSap	9,14 $\pm$ 1,21	13,66 $\pm$ 1,40	46,90 $\pm$ 0,44 <sup>CT/ Sap</sup>	14,37 $\pm$ 0,16	30,67 $\pm$ 0,41
T4	CT	10,26 $\pm$ 0,51 <sup>T1</sup>	14,75 $\pm$ 0,96 <sup>T1</sup>	47,93 $\pm$ 0,69	14,92 $\pm$ 0,35	31,12 $\pm$ 0,49
	Sap	9,98 $\pm$ 1,05	14,66 $\pm$ 1,43	47,15 $\pm$ 0,51 <sup>T2</sup>	14,72 $\pm$ 0,15	31,17 $\pm$ 0,43
T4	RsSap	9,72 $\pm$ 0,66	14,00 $\pm$ 0,74	46,70 $\pm$ 0,43	14,60 $\pm$ 0,14	31,28 $\pm$ 0,57
	CT	8,31 $\pm$ 1,45 <sup>T1</sup>	13,75 $\pm$ 0,55 <sup>T1</sup>	51,13 $\pm$ 5,66 <sup>T1/ T2/ T3</sup>	17,48 $\pm$ 2,99 <sup>T1/ T2/ T3</sup>	34,62 $\pm$ 3,01 <sup>T1/ T2/ T3</sup>
T4	Sap	9,17 $\pm$ 0,65 <sup>T1</sup>	13,13 $\pm$ 0,88 <sup>T1</sup>	47,63 $\pm$ 5,46 <sup>T2/ T3</sup>	16,33 $\pm$ 0,15 <sup>T1/ T2/ T3</sup>	33,36 $\pm$ 0,67 <sup>T1/ T2/ T3</sup>
	RsSap	9,85 $\pm$ 1,24 <sup>CT/ Sap</sup>	13,15 $\pm$ 1,01	45,33 $\pm$ 0,73 <sup>T1</sup>	14,93 $\pm$ 1,25 <sup>CT/ Sap</sup>	31,10 $\pm$ 0,80 <sup>CT/ Sap</sup>
Referência*	7,4-11,1	11,5-15,3	46-48	14,1-16,9	30,5-35,4	

T0 – pré-inócuo; T1 – 7 dias após a primeira dose; T2 - 7 dias após a segunda dose; T3 - 7 dias após a terceira dose; T4 - 40 dias após a terceira dose.

As siglas CT, Sap, T1, T2 e T3 representa diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Controle, grupo Saponina, tempo T1, tempo T2 e tempo T3, respectivamente.

\* - valores de referência segundo Araújo (2012).

#### 4.2 A formulação RsSap induziu imunogenicidade marcada pelo aumento no percentual de Linfócitos B e pelos elevados níveis de IgG anti-RsSap

A avaliação geral da imunogenicidade foi realizada pela contagem de leucócitos (Tabela 4), bem como pela análise detalhada por imunofenotipagem de leucócitos circulantes (Linfócitos T CD3<sup>+</sup>, linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, Linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e Linfócitos B CD19<sup>+</sup>) (Figura 4) e a produção de anticorpos IgG específicos (Figura 5).

Na série leucocitária (Tabela 4) podemos observar que houve redução de Leucócitos Totais bem como das populações de Linfócitos, Eosinófilos e Neutrófilos em T4 quando comparado aos T1, T2 e T3 nos grupos Controle, Saponina e RsSap. Observamos também que houve aumento de Linfócitos em T3 em relação a T1 nos grupos Controle e Saponina, além de menor número de Linfócitos no grupo RsSap T3 comparado aos grupos Controle e Saponina no mesmo tempo. Na contagem de neutrófilos observamos, além do que já foi descrito, maior número de células no Grupo RsSap T1 em relação aos grupos Controle e Saponina no mesmo tempo. No momento T2 observamos que o grupo Saponina apresentou maior contagem de neutrófilos em relação aos grupos Controle e RsSap no mesmo tempo. Por vez, observamos maior

número de neutrófilos no grupo RsSap T4 comparado aos grupos Controle e Saponina no mesmo tempo (Tabela 4).

**Tabela 4. Leucograma de camundongos BALB/c imunizados com RsSap.**

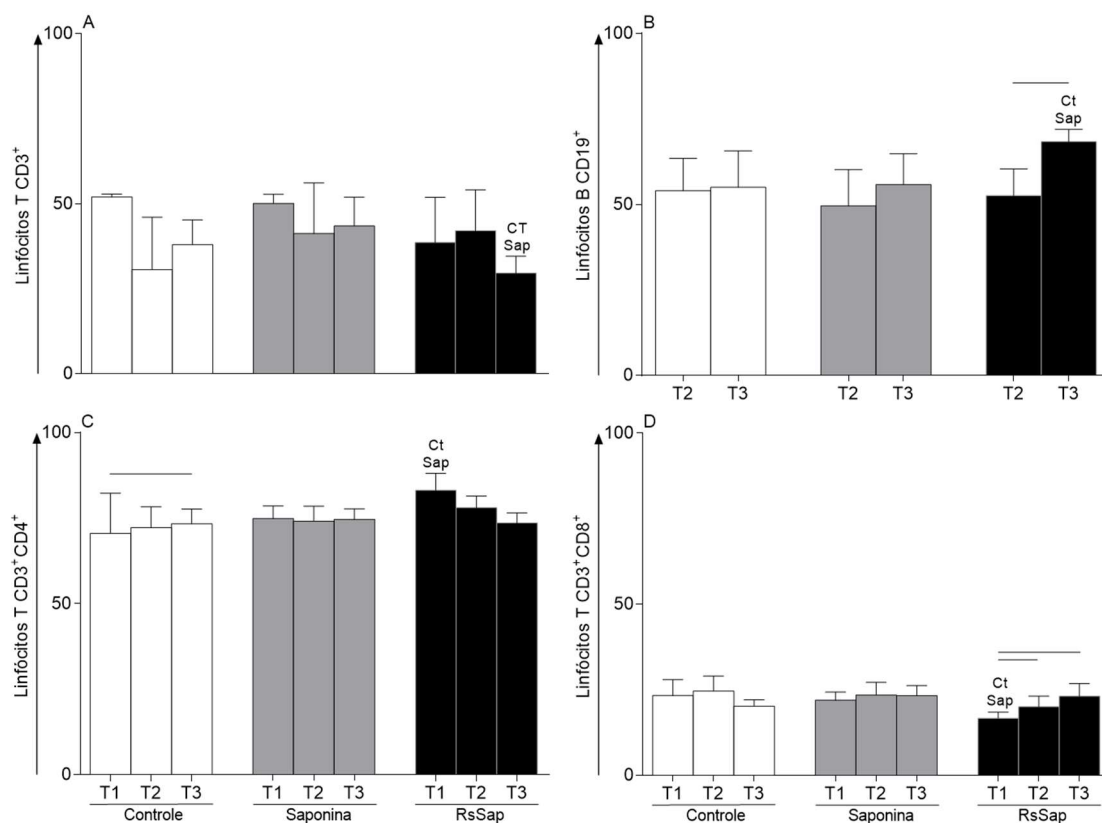
		Leucócitos totais ( $10^3 \text{ mm}^3$ )	Linfócitos ( $10^3 \text{ mm}^3$ )	Eosinófilos ( $\text{mm}^3$ )	Neutrófilos ( $10^3 \text{ mm}^3$ )
T0		8,42 $\pm$ 1,18	5,52 $\pm$ 1,07	234,11 $\pm$ 101,78	1,66 $\pm$ 0,52
	CT	10,57 $\pm$ 2,54	6,16 $\pm$ 2,60	292,67 $\pm$ 127,80	2,16 $\pm$ 1,09
T1	Sap	9,57 $\pm$ 1,45	6,00 $\pm$ 1,91	292,67 $\pm$ 127,0	2,00 $\pm$ 0,47
	RsSap	12,12 $\pm$ 0,86	5,30 $\pm$ 2,54	288,89 $\pm$ 116,67	4,61 $\pm$ 1,34 <sup>CT/ SAP</sup>
	CT	10,10 $\pm$ 2,97	7,85 $\pm$ 2,50	253,67 $\pm$ 103,15	2,00 $\pm$ 0,45
T2	Sap	9,67 $\pm$ 2,12	6,98 $\pm$ 1,42	283,33 $\pm$ 132,92	2,40 $\pm$ 0,70 <sup>CT</sup>
	RsSap	8,46 $\pm$ 1,78	5,50 $\pm$ 1,50	250,00 $\pm$ 104,88	1,90 $\pm$ 0,48 <sup>Sap</sup>
	CT	12,33 $\pm$ 1,26	9,41 $\pm$ 0,95 <sup>T1</sup>	279,67 $\pm$ 158,56	2,54 $\pm$ 0,13
T3	Sap	11,82 $\pm$ 2,15	9,01 $\pm$ 0,50 <sup>T1</sup>	133,33 $\pm$ 57,74	2,73 $\pm$ 0,38
	RsSap	10,70 $\pm$ 0,70	7,37 $\pm$ 0,35 <sup>CT/ Sap</sup>	225,00 $\pm$ 125,83	2,67 $\pm$ 0,60
	CT	3,85 $\pm$ 1,08 <sup>T1/ T2/ T3</sup>	2,33 $\pm$ 1,26 <sup>T1/ T2/ T3</sup>	101,60 $\pm$ 91,20 <sup>T1/ T2/ T3</sup>	0,60 $\pm$ 0,38 <sup>T1/ T2/ T3</sup>
T4	Sap	3,45 $\pm$ 1,31 <sup>T1/ T2/ T3</sup>	1,90 $\pm$ 0,56 <sup>T1/ T2/ T3</sup>	117,20 $\pm$ 107,79 <sup>T1/ T2/ T3</sup>	1,10 $\pm$ 0,71 <sup>T1/ T2/ T3/ CT</sup>
	RsSap	3,75 $\pm$ 1,35 <sup>T1/ T2/ T3</sup>	2,22 $\pm$ 0,89 <sup>T1/ T2/ T3</sup>	147,50 $\pm$ 55,00 <sup>T1/ T2/ T3</sup>	1,28 $\pm$ 0,56 <sup>T1/ T2/ T3/ CT</sup>
Referência*		2-5	1,2-4,9	0-96	0,3-1,2

T0 – pré-inócuo; T1 – 7 dias após a primeira dose; T2 - 7 dias após a segunda dose; T3 - 7 dias após a terceira dose; T4 - 40 dias após a terceira dose.

As siglas CT, Sap, T1, T2 e T3 representa diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Controle, grupo Saponina, tempo T1, tempo T2 e tempo T3, respectivamente.

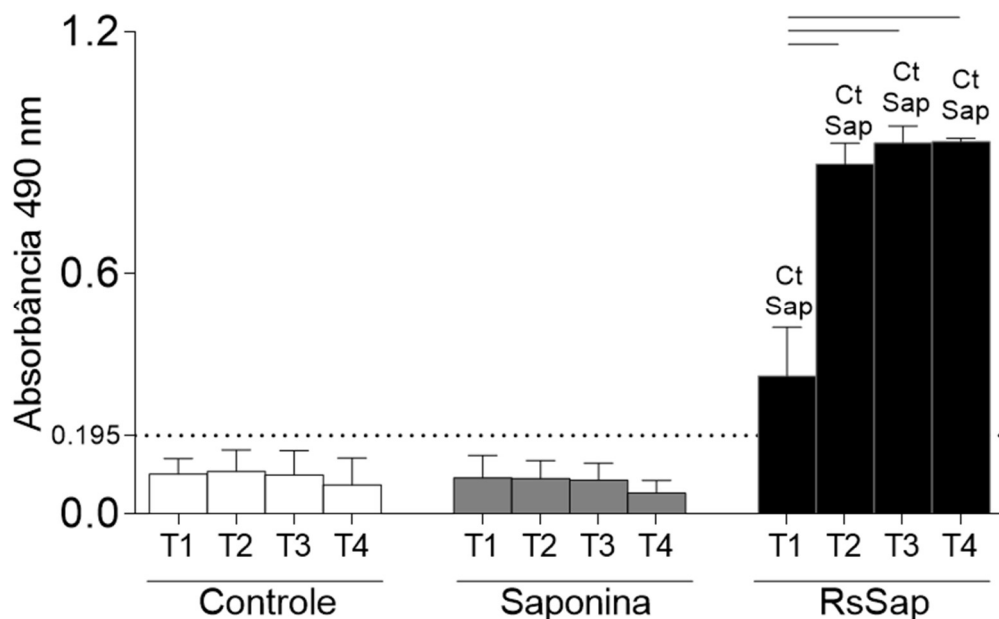
\* - valores de referência segundo Araújo (2012).

As análises *ex vivo* de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, linfócitos T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> e Linfócitos B CD19<sup>+</sup> B foram realizadas para avaliar mudanças nos perfis de subpopulações de Linfócitos Totais. Foi observado inicialmente um menor percentual de Linfócitos T CD3<sup>+</sup> no grupo RsSap T3 comparado aos grupos Controle e Saponina no mesmo tempo (Figura 4 A). Os resultados para Linfócitos B CD19<sup>+</sup> são opostos ao observado para CD3<sup>+</sup>, com maior percentual de LB CD19<sup>+</sup> no grupo RsSap T3 em relação aos grupos Controle e Saponina no mesmo tempo, além de maior percentual em T3 comparado a T2 do grupo RsSap (Figura 4 B). Nas subpopulações de LT CD3<sup>+</sup> foi observado aumento no percentual de LT CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> no grupo Controle T3 em relação ao T1 (Figura 4 C). No grupo RsSap T1 houve maior percentual de LT CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> no grupo RsSap comparado aos grupos Controle e Saponina no mesmo tempo (Figura 4 C). Na Figura 4 D observamos menor percentual de LT CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no grupo RsSap T1 em relação aos grupos Controle e Saponina, observamos também aumento de LT CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> nos tempos T2 e T3 do grupo RsSap em relação a T1.



**Figura 4. Perfil imunofenotípico de diferentes subpopulações de Linfócitos após imunização com RsSap.** As barras brancas representam os perfis induzidos nos animais do grupo controle; as barras cinza representam os perfis induzidos nos animais do grupo Saponina; as barras pretas representam os perfis induzidos nos animais do grupo RsSap. Amostras de sangue foram obtidas para realizar o *ex vivo* nos tempos: 7 dias após a primeira imunização (T1); 7 dias após a segunda imunização (T2); 20 dias após a terceira imunização (T3). Para avaliação dos seguintes parâmetros: Linfócitos T CD3<sup>+</sup> (A); Linfócitos B CD19<sup>+</sup> (B), Linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (C) e Linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (D). Os dados estão apresentados em gráficos de barras, destacando a média e desvio padrão. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre diferentes tempos de avaliação em um mesmo grupo foram representadas por linhas conectoras. As siglas “Ct” e “Sap” representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos Controle e Saponina, respectivamente.

Após as coletas de sangue nos tempos T1, T2, T3 e T4 foi observado aumento significativo na reatividade de IgG anti-RsSap no grupo vacinado em relação aos grupos CT e Sap, em todos os tempos avaliados. O aumento da reatividade se deve a presença de IgG específico para antígeno bruto a partir da primeira imunização com RsSap, que apresentou reatividade superior ao limite de positividade (linha tracejada da Figura 5). Além disto, houve aumento da reatividade de IgG nos tempos T2, T3 e T4 quando comparados ao T1 do grupo RsSap (Figura 5).

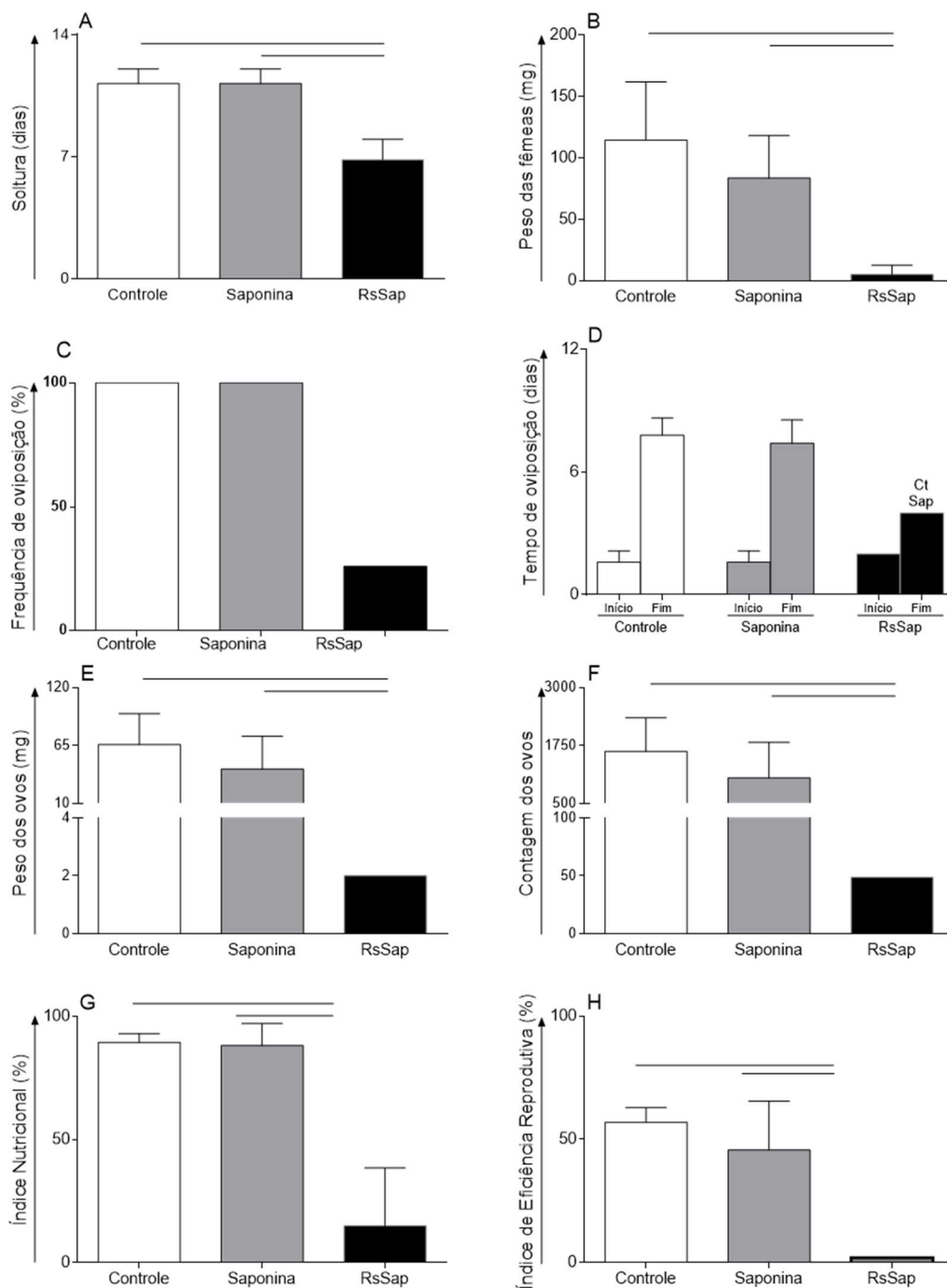


**Figura 5. Produção de IgG específico para antígenos relacionados a formulação vacinal com RsSap.** Camundongos BALB/c do grupo Controle (barras branca), grupo Saponina (barras cinza) e grupo RsSap (barras preta) foram submetidos à coleta de sangue 7 dias após a primeira imunização (T1), 7 dias após a segunda imunização (T2), 7 dias após a terceira imunização (T3) e 7 dias após desafio com adultos de *R. sanguineus* (T4). Os dados estão apresentados em gráficos de barras, destacando a média e o desvio padrão. O *cut off* está representado pela linha pontilhada (média do grupo pré-inóculo mais duas vezes o valor do desvio padrão). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre diferentes tempos de um mesmo grupo estão representadas por linhas conectoras, enquanto diferenças significativas entre os grupos, no mesmo tempo, foram representadas por “Ct” e “Sap” referentes aos grupos Controle e grupo Saponina, respectivamente.

#### 4.3 A imunização com RsSap em camundongos BALB/c induziu uma significativa interferência no ciclo biológico do *Rhipicephalus sanguineus*

A análise do ciclo de vida de *R. sanguineus* após desafio em camundongos imunizados do grupo Controle, Saponina e RsSap apresentou diferenças distintas nos aspectos biológicos (Figura 6 A-G). No terceiro dia após o protocolo para adesão das câmaras de alimentação, todas as câmaras foram conferidas e constatado que todas as fêmeas iniciaram o repasto sanguíneo. Inicialmente foi observado que a imunização com RsSap induziu soltura prematura nas fêmeas média de 7 dias, quando comparado às fêmeas dos grupos Controle média de 11 dias e Saponina média de 11 dias (Figura 6 A). Conseqüentemente, houve significativa redução no peso das fêmeas alimentadas no grupo RsSap com média de 5.1 mg em relação ao peso das fêmeas alimentadas nos grupos Controle com média de 114.4 mg e Saponina com média de 83.6 mg (Figura 6 B). Foi observado que 74% das fêmeas do grupo RsSap morreram antes de iniciar a oviposição (Figura 6 C). Após todas as

fêmeas iniciarem a oviposição, foi observado que o término foi prematuro nas fêmeas que fizeram repasto sanguíneo nos camundongos imunizados com RsSap com média de 4 dias comparado às fêmeas alimentadas no grupo Controle com média de 7.8 dias e Saponina com média de 7.4 dias (Figura 6 C). No mesmo sentido que do que já foi descrito, houve redução no peso dos ovos (Figura 6 E), bem como no número de ovos (Figura 6 F) gerados pelas fêmeas alimentadas no grupo RsSap com média de 2 mg e média de 49 ovos, respectivamente, comparado ao peso e número de ovos gerados pelas fêmeas de *R. sanguineus* alimentadas no grupo Controle com média de 65.8 mg e média de 1621 ovos, e Saponina com média de 45.2 mg e média de 1050 ovos. Na Figura 6 H podemos observar queda no Índice de Eficiência Reprodutiva (IER) nas fêmeas desafiadas nos camundongos imunizados com RsSap em média de 2% ao compararmos ao IER das fêmeas desafiadas nos grupos Controle com média de 56.8% e Saponina com média de 45.6%. Houve redução no Índice Nutricional das fêmeas de *R. sanguineus* desafiadas no grupo RsSap com média de 15% comparado ao das fêmeas desafiadas nos grupos Controle com média de 89% e Saponina com média de 88% (Figura 6 G).



**Figura 6. Efeito da imunização com RsSap no ciclo biológico de *R. sanguineus* alimentados em camundongos BALB/c.** Todas as análises foram realizadas após terceiro dia de adesão das câmaras de alimentação em camundongos BALB/c do grupo Controle (barras brancas), do grupo Saponina (barras cinzas) e do grupo RsSap (barras pretas), para avaliar: o dia da soltura das fêmeas (A), peso das fêmeas após a soltura (B), frequência de oviposição (C), início e fim da oviposição (D), peso do ovo (E), número de ovos (F), Índice de Eficiência Reprodutiva (G) e Índice Nutricional (H). Os dados estão apresentados em gráficos de barras, destacando a média e desvio padrão (A, B, D-H) e gráfico de contingência (C – no qual o padrão listrado representa fêmeas que morreram sem ovipor). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes grupos de avaliação foram representadas por linhas conectoras.

#### 4.4 A formulação RsSap foi considerada segura e inócua em cães

O protocolo vacinal não induziu nenhuma reação adversa como nódulos, pápulas ou úlceras no local do inócuo, bem como não foi observado alteração comportamental ou perda de peso.

Nas análises realizadas para a série vermelha (Tabela 5), série branca (Tabela 6) e, função hepática e renal (Tabela 7) não houve alterações significativas, e todos os resultados obtidos estão dentro dos valores de referência.

**Tabela 5. Eritrograma de cães.**

		Volume Globular (%)	Hemoglobina (g/dL)	Hemácias (x 10 <sup>6</sup> cels/uL)	VMC (fL)	CHCM (g/dL)	HCM (g/dL)	RDW (%)	Plaquetas (cels/ uL)
T0	Controle	42,0 ±8,9	13,6 ±3,2	6,1 ±0,9	68,4 ±4,9	32,3 ±0,6			
	RsSap	47,3 ±5,1	15,6 ±1,6	6,7 ±0,5	70,3 ±2,2	33,0 ±0,4			
T1	Controle	40,3 ±8,4	13,0 ±2,7	6,0 ±0,8	67,1 ±4,9	32,3 ±0,2	22,9 ±0,2	13,9 ±1,0	224667 ±2887
	RsSap	46,7 ±2,1	15,1 ±0,3	6,6 ±0,2	70,9 ±1,5	32,4 ±0,7	21,7 ±1,5	12,4 ±0,5	186667 ± 85049
T2	Controle	42,0 ±7,2	14,2 ±2,5	6,2 ±0,8	67,3 ±6,0	33,7 ±0,3	22,7 ±2,1	14,2 ±0,4	254100 ±87297
	RsSap	49,0 ±4,6	16,3 ±1,6	6,9 ±0,5	70,5 ±2,1	33,1 ±0,8	23,5 ±0,9	12,2 ±0,4	202000 ±78581
T3	Controle	41,3 ±7,8	14,2 ±2,6	6,2 ±0,8	68,0 ±5,2	33,4 ±0,2	22,2 ±1,1	14,2 ±0,4	223333 ±5774
	RsSap	47,7 ±2,5	15,7 ±1,3	7,0 ±0,2	70,9 ±2,5	33,0 ±0,6	23,1 ±1,3	13,0 ±0,6	220000 ±20000
T4	Controle	41,7 ±8,1	14,0 ±2,7	6,2 ±0,7	67,8 ±5,0	33,2 ±0,2	22,0 ±0,8	13,8 ±0,7	22451 ±17555
	RsSap	48,0 ±2,6	16,0 ±0,9	6,9 ±0,4	70,9 ±1,6	32,9 ±0,6	23,1 ±1,0	12,7 ±0,5	23000 ±16325
Valor de Referencia*		37 - 55	12 - 18	5,5 - 8,5	60 - 77	32 - 36	19,5 - 24,5	12 15	175000 - 500000

T0 – pré-inócuo; T1 – 7 dias após a primeira dose; T2 - 7 dias após a segunda dose; T3 - 7 dias após a terceira dose; T4 - 60 dias após a terceira dose.

\* - valores de referência segundo Meyer, Coles e Rich (1995).

**Tabela 6. Leucograma de cães.**

		Leucócitos totais (cels/uL)	Segmentados (cels/uL)	Eosinófilos (cels/uL)	Linfócitos (cels/uL)	Monócitos (cels/uL)
T0	Controle	6876 ±1099	3744 ±1156	212 ±95	2675 ±1038	168 ±97
	RsSap	10180 ±2682	6427 ±3964	889 ±1029	2612 ±1159	275 ±183
T1	Controle	7530 ±876	4355 ±573	122 ±32	2943 ±1189	109 ±132
	RsSap	13166 ±1721	7756 ±3597	394 ±192	2453 ±371	459 ±320
T2	Controle	7910 ±2348	4325 ±497	272 ±129	3185 ±2431	108 ±109
	RsSap	15000 ±4570	8007 ±2378	1106 ±101	2332 ±469	162 ±231
T3	Controle	7374 ±1183	4192 ±648	192 ±20	2833 ±1596	155 ±98
	RsSap	13893 ±2225	7521 ±2690	1005 ±370	2641 ±188	364 ±65
T4	Controle	7369 ±1057	4209 ±514	192 ±20	2769 ±1455	175 ±70
	RsSap	13736 ±2089	7769 ±2015	749 ±149	3292 ±476	315 ±158
Valor de Referencia*		6000 - 17000	3000 - 11500	100 - 1250	1000 - 4800	150 - 1350

T0 – pré-inócuo; T1 – 7 dias após a primeira dose; T2 - 7 dias após a segunda dose; T3 - 7 dias após a terceira dose; T4 - 60 dias após a terceira dose.

\* - valores de referência segundo Meyer, Coles e Rich (1995).



**Tabela 7. Exame bioquímico de cães.**

		Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Amilase (U/L)	Gama Glutamilttransferase (U/L)
T0	Controle	34,05 ±15,93	0,94 ±0,45	32,85 ±1,11	18,30 ±0,36	1236 ±458	2,51 ±1,60
	RsSap	31,63 ±12,83	1,14 ±0,12	42,68 ±14,25	22,90 ±8,96	999 ± ±411	6,08 ±1,76
T1	Controle	30,51 ±7,13	1,12 ±0,21	31,13 ±6,22	24,60 ±10,97	1040 ±173	2,79 ±2,55
	RsSap	43,60 ±14,82	1,64 ±0,36	50,96 ±10,84	12,10 ±3,30	1237 ±501	5,74 ±3,22
T2	Controle	26,61 ±16,69	1,05 ±0,27	33,91 ±5,32	24,67 ±4,72	1258 ±521	5,70 ±0,83
	RsSap	33,97 ±5,62	1,42 ±0,40	48,02 ±20,37	22,17 ±4,79	1053 ±391	2,69 ±1,37
T3	Controle	31,50 ±9,81	1,13 ±0,12	33,47 ±5,32	27,47 ±2,50	1075 ±82	5,91 ±0,73
	RsSap	36,87 ±11,63	1,41 ±0,26	52,49 ±6,79	20,73 ±3,23	1008 ±325	5,93 ±2,29
T4	Controle	31,47 ±9,30	1,18 ±0,07	33,30 ±4,42	27,80 ±2,07	1148 ±85	6,00 ±0,77
	RsSap	35,73 ±8,64	1,34 ±0,19	53,20 ±6,91	20,80 ±3,21	995 ±318	5,70 ±1,40
Valor de Referencia*		20 - 56	0,5 - 1,5	0 - 110	0 - 100	500 - 1500	0 - 25

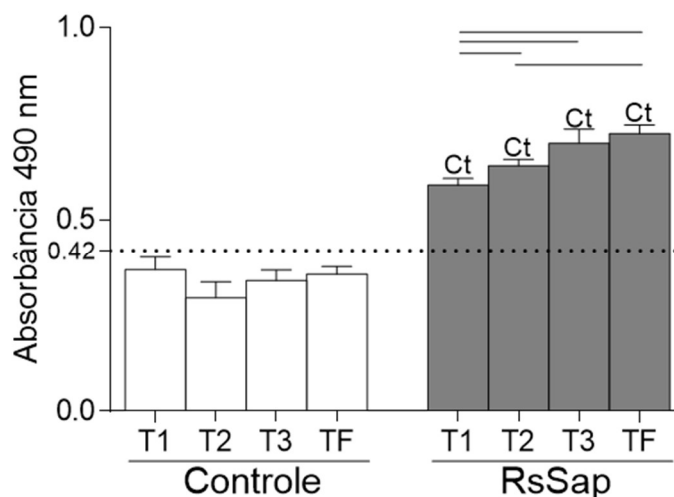
		Glicose (mg/dL)	Proteínas totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulina (mg/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)
T0	Controle	77,97 ±2,66	8,40 ±0,62	2,81 ±0,64	5,59 ±0,91	30 ±18,3
	RsSap	88,03 ±5,49	7,44 ±1,45	3,33 ±0,20	4,11 ±1,64	27 ±20
T1	Controle	100,03 ±12,72	8,02 ±0,68	2,68 ±0,18	5,34 ±0,80	33 ±21
	RsSap	98,87 ±9,24	8,15 ±1,69	2,44 ±0,76	5,71 ±2,11	22 ±14
T2	Controle	82,03 ±12,67	8,00 ±0,50	2,65 ±0,74	5,35 ±0,62	47 ±21
	RsSap	89,90 ±8,55	8,04 ±1,80	3,03 ±0,27	5,03 ±2,10	20 ±6
T3	Controle	83,77 ±6,97	8,34 ±0,70	2,63 ±0,38	3,97 ±0,42	48 ±23
	RsSap	94,30 ±45	8,18 ±1,39	2,43 ±0,50	4,21 ±0,23	24 ±4
T4	Controle	83,73 ±10,06	7,23 ±0,19	2,67 ±0,32	4,03 ±0,18	50 ±24
	RsSap	93,03 ±5,31	6,99 ±0,38	2,33 ±0,49	4,09 ±0,03	27 ±4
Valor de Referencia*		76 - 119	5,4 - 7,5	2,3 - 3,1	2,7 - 4,4	20 - 156

T0 – pré-inócuo; T1 – 7 dias após a primeira dose; T2 - 7 dias após a segunda dose; T3 - 7 dias após a terceira dose; T4 - 60 dias após a terceira dose.

\* - valores de referência segundo Meyer, Coles e Rich (1995).

#### 4.5 A formulação RsSap induziu um perfil de imunogenicidade ao induzir altos níveis de IgG específicos para RsSap em cães

Após as coletas de sangue nos tempos T1, T2, T3 e T4 observamos que houve indução da produção de IgG específico para antígeno vacinal a partir da primeira imunização com RsSap. Nesse sentido podemos observar que os níveis de IgG foram maiores nos tempos T1, T2, T3 e T4 do grupo RsSap quando comparado aos mesmos tempos nos grupos Controle. Observamos também que a produção de IgG específico foi menor em T1 do grupo RsSap comparado aos tempos T2, T3 e T4 do mesmo grupo, além de T4 apresentar maior nível que T2 (Figura 7).



**Figura 7. Produção de IgG específico para antígenos bruto induzido pela imunização com RsSap em cães.** Cães do grupo Controle (barras brancas), grupo RsSap (barras cinza) foram submetidos à coleta de sangue 7 dias após a primeira imunização (T1), 7 dias após a segunda imunização (T2), 7 dias após a terceira imunização (T3) e 40 dias após desafio com adultos de *R. sanguineus* (TF). Os dados estão apresentados em gráficos de barras, destacando a média e o desvio padrão. O *cut off* está representado pela linha pontilhada (média do grupo pré-inóculo mais duas vezes o valor do desvio padrão). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre diferentes tempos de um mesmo grupo estão representadas por linhas conectoras, enquanto diferenças significativas entre os grupos Controle e RsSap, no mesmo tempo, estão representadas por “Ct”.

#### 4.6 A imunização com RsSap em cães induziu interferência no ciclo biológico do *Rhipicephalus sanguineus*

A análise da influência da imunização com RsSap no ciclo biológico de *R. sanguineus* foi realizada após três ciclos de alimentação utilizando as três formas evolutivas (larva, ninfa e adultos) de *R. sanguineus*. No primeiro ciclo de alimentação, realizado com larvas, observou-se que a imunização com RsSap (420 larvas vivas) reduziu o número de larvas recuperadas vivas após a soltura quando comparado ao número de larvas recuperadas em cães do grupo controle (480 larvas vivas) (Figura 8 – Painel 1). Foi observado aumento no número de larvas não recuperadas no grupo RsSap (80 larvas mortas) comparado ao grupo Controle (20 larvas mortas) (Figura 8 – Painel 1). Na Figura 9 podemos observar que algumas larvas se fixaram e iniciaram o repasto, porém morreram durante o processo de alimentação em cão imunizado com RsSap. Ainda no Painel 1, pode-se observar que as larvas do grupo alimentadas em cães do grupo RsSap tiveram redução no número de sucesso em realizar a muda para ninfas (261 larvas), comparado às larvas alimentadas no grupo Controle (341 larvas). Conseqüentemente, no grupo RsSap houve aumento no número de insucesso em completar a muda para ninfa (Painel 1). No segundo ciclo de alimentação (Figura

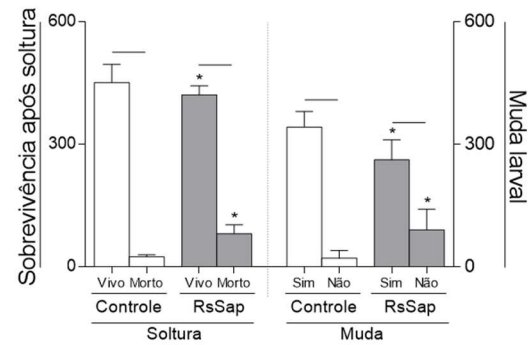
8 – Painel 2 A), com ninfas resultantes da muda de larvas que alimentaram no grupo Controle ( $CT^L$ ) e Vacina ( $RS^L$ ), foi observado em cães do grupo Controle submetidos a alimentação com ninfas  $CT^L$  ou  $RS^L$ , que o fato de as larvas terem alimentado em cães imunizados com RsSap reduziu o número de ninfas recuperadas vivas após a soltura. Por sua vez, nos cães imunizados a quantidade de ninfas  $RS^L$  recuperadas vivas foi menor comparado às ninfas  $CT^L$ . Por outro lado, a comparação entre ninfas  $CT^L$  alimentadas em cães do grupo Controle ou do grupo RsSap, mostrou que o número de ninfas recuperadas vivas foi menor nos cães imunizados. Resultado semelhante foi observado para as ninfas  $RS^L$  alimentadas em cães do grupo Controle ou RsSap, resultando em menor sobrevivência (Figura 8 – Painel 2 A). No Painel 2 B da Figura 8 estão representados a capacidade dessas ninfas em completar a muda. Inicialmente observamos que no grupo Controle as ninfas  $RS^L$  tiveram redução em completar a muda para adultos comparado às ninfas  $CT^L$ . Resultado semelhante foi observado para o grupo RsSap, com redução no número de ninfas  $RS^L$  que completaram a muda e relação às ninfas  $CT^L$ . Por outro lado, a comparação entre ninfas  $CT^L$  alimentadas em cães do grupo Controle ou do grupo RsSap, mostrou que o número de ninfas que completaram a muda foi menor no grupo RsSap. Resultado semelhante foi observado para as ninfas  $RS^L$  alimentadas em cães do grupo Controle ou RsSap (Figura 8 – Painel 2 B).

No Painel 3 da Figura 8 está representado o impacto da imunização com RsSap em fêmeas de *R. sanguineus* resultantes da muda de ninfas que alimentaram no grupo Controle ( $CT^{LN}$ ) e Vacina ( $RS^{LN}$ ). Comparando as fêmeas  $CT^{LN}$  com as fêmeas  $RS^{LN}$  alimentadas nos cães do grupo Controle pode-se observar redução tanto no peso (Painel 3 A) quanto no comprimento (Painel 3 B). O mesmo foi observado quando as fêmeas alimentaram em cães do grupo RsSap, fêmeas  $RS^{LN}$  tiveram menor peso e comprimento em comparação às fêmeas  $CT^{LN}$ . Comparando as fêmeas  $RS^{LN}$  alimentadas em cães do grupo Controle ou RsSap, observamos que as que alimentaram em cães do grupo RsSap obtiveram menor peso. Na sequência dos resultados, foram avaliados o peso da massa de ovos originados da postura individual (Figura 8 – Painel 3 C) bem como a quantificação dos ovos (Figura 8 – Painel 3 D). Os resultados mostram redução na oviposição (peso e quantidade de ovos) por fêmeas  $RS^{LN}$  alimentadas no grupo Controle em relação às fêmeas  $CT^{LN}$  alimentadas no mesmo grupo. O mesmo resultado foi observado em fêmeas  $RS^{LN}$  alimentadas em cães do grupo RsSap quando comparadas às fêmeas  $CT^{LN}$  alimentadas nos mesmos cães. Analisando as fêmeas  $RS^{LN}$  alimentadas em cães do grupo Controle ou RsSap,

foi observado que houve redução no peso e no número de ovos de fêmeas grupo RsSap comparado ao grupo Controle. No Painel 3 E (Figura 8) podemos observar que fêmeas RS<sup>LN</sup> alimentadas em cães do grupo Controle possuem menor Índice de Eficiência Reprodutiva comparado ao das fêmeas CT<sup>LN</sup> alimentadas nos mesmos cães. Resultado semelhante foi observado para as fêmeas RS<sup>LN</sup> alimentadas em cães do grupo RsSap, com menor IER comparado aos das fêmeas CT<sup>LN</sup> alimentadas nos mesmos cães. No Painel 3 F (Figura 8) observamos que fêmeas RS<sup>LN</sup> ao alimentarem em cães do grupo RsSap tiveram menor Índice Nutricional que as fêmeas CT<sup>LN</sup> alimentadas nos mesmos cães. Também foi observado que fêmeas RS<sup>LN</sup> alimentadas em cães do grupo RsSap possuem menor IN que as que alimentaram em cães do grupo Controle.

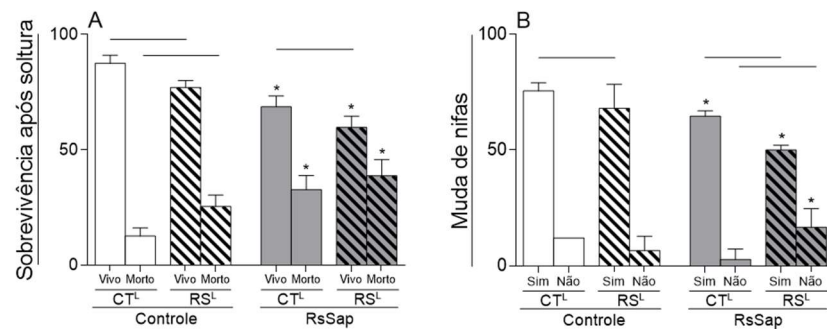
Painel 1

## Impacto da Imunização em Larvas



Painel 2

## Impacto da Imunização em Ninfas



Painel 3

## Impacto da Imunização em Fêmeas

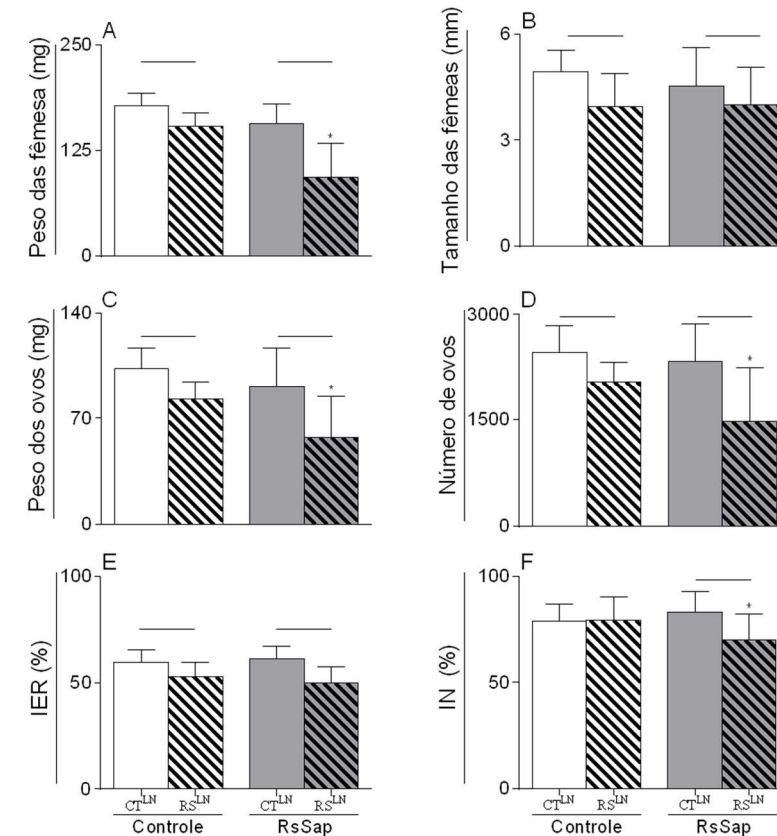
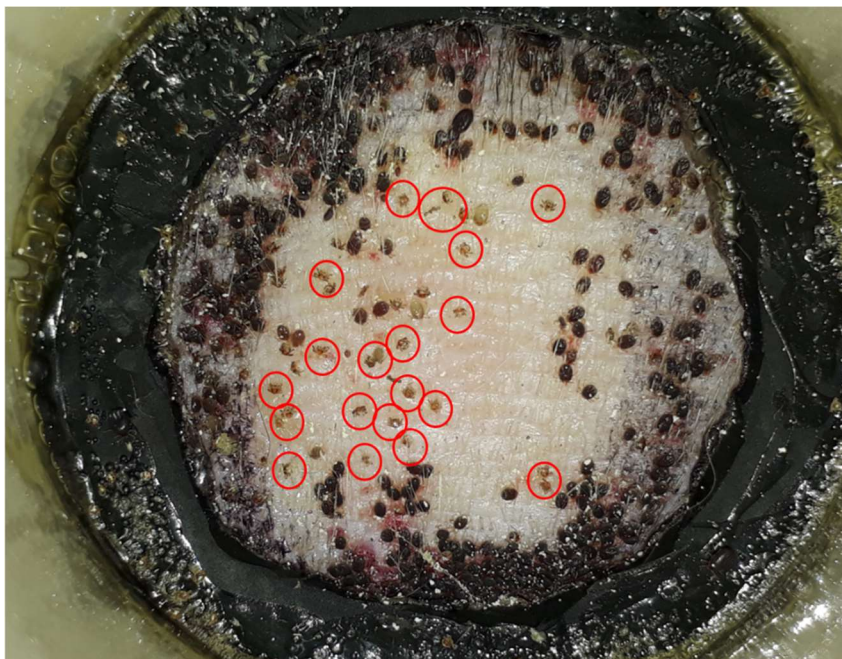


Figura 8. Efeito da imunização com RsSap no ciclo biológico de *R. sanguineus* alimentados em cães. Todas as análises foram realizadas após terceiro dia de adesão das câmaras de alimentação em cães do grupo Controle (barras brancas) e do grupo RsSap (barras pretas). As barras hachuradas branco e preta representam desafio com formas evolutivas alimentadas no grupo CT, barras hachuradas cinza e preta representam desafio com formas evolutivas alimentadas no grupo RS. O Painel 1 representa o impacto da imunização com RsSap sobre a sobrevivência após soltura e muda de larvas. O Painel 2 representa o impacto da imunização sobre sobrevivência (A) e muda (B) de ninfas. O Painel 3 representa o impacto da imunização com RsSap sobre o peso (A), tamanho (B), Índice de Eficiência Reprodutiva (E) e Índice Nutricional (F) de fêmeas e, massa (C) e quantidade (D) de ovos. Nos Painéis 1 e 2, o termo “Soltura” indica desprendimento do hospedeiro, representado como número de indivíduos classificados como “Vivo” ou “Morto”. O termo “Muda” refere-se a mudança evolutiva, que quando presente foi classificada como “Sim” e ausente classificada como “Não”. No Painel 2, CT<sup>L</sup> indica ninfas originadas da muda de larvas alimentadas em cão do grupo Controle, enquanto RS<sup>L</sup> indica ninfas originadas da muda de larvas alimentadas em cão do grupo RsSap, avaliadas no grupo “Controle” e “RsSap”. No Painel 3, CT<sup>LN</sup> indica fêmeas originadas de larvas e ninfas alimentadas em cão do grupo Controle, enquanto RS<sup>LN</sup> indica ninfas originada de larvas e ninfas alimentadas em cão do grupo RsSap, avaliadas no grupo “Controle” e “RsSap”. Os dados estão apresentados em gráficos de barras, destacando a média e desvio padrão. Diferenças significativas (p < 0,05) em um mesmo grupo estão representados por linhas de conexão. Diferenças significativas (p < 0,05) entre o grupo “Controle” e o grupo “RsSap” estão representadas pelo “\*”.



**Figura 9. Larvas secas em cão do grupo RsSap.**

## 5. DISCUSSÃO

Elaborar novas estratégias para o controle sustentável de populações de carrapatos são altamente necessárias para regiões endêmicas para *R. sanguineus*. Ao contrário de vacinas contra patógenos, a presente estratégia não visa impedir que um cão vacinado seja infectado e/ ou desenvolva quaisquer dos sintomas clínicos associados a um patógeno. Tem como objetivo principal agir diretamente no carrapato. Este tipo de vacina tem como principal vantagem a especificidade para o vetor, ser de fácil manejo e apresentar baixo custo, se destacando em relação às estratégias tradicionais (Marcelino *et al.*, 2012; Guerrero *et al.*, 2012). A principal hipótese em relação ao desenvolvimento de uma vacina composta por antígenos de *R. sanguineus* é a capacidade de desencadear a produção de anticorpos específicos, interferindo nos efeitos da espoliação sanguínea, bem como em aspectos biológicos do carrapato. A ideia de se desenvolver uma vacina contra insetos hematófagos advém de trabalhos que desenvolveram as vacinas: (i) contra leishmaniose visceral canina, usando antígenos de flebotomíneos (BR1020130228052; BR1020140220275; BR1020170229041; BR1020170229068; BR1020170229033) e (ii) contra mosquitos *Aedes aegypti* (BR1020170278859; BR1020190103329). Essas formulações vacinais demonstraram induzir alteração no ciclo do inseto além de bloqueio da transmissão de *Leishmania infantum*, essa última pela vacina contendo antígenos de flebotomíneos. Além disso, no contexto do desenvolvimento de vacinas contra carrapatos, Willadsen *et al.* (1988), demonstraram que o potencial da proteína intestinal Bm86 de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, utilizada em duas vacinas comerciais contra *R. microplus*, a Gavac® (Heber Biotec SA – Havana, Cuba) e Tickgard® (CSIRO).

Tendo em vista que o presente estudo tem como objetivo central desenvolver a primeira vacina contra *R. sanguineus*, foi fundamental realizar um ensaio preliminar de prova de conceito buscando avaliar, ainda que preliminarmente, a viabilidade técnica de desenvolver o produto pretendido. Nesse sentido, para o desenvolvimento de novas formulações vacinais, se faz necessário a realização de ensaios pré-clínicos em que a etapa inicial tem como objetivo avaliar a inocuidade do imunobiológico. Esse estudo é de extrema importância uma vez que componentes vacinais não devem induzir efeitos colaterais incompatíveis com a administração do produto testado (Burakova *et al.*, 2018). Além disso, busca-se incorporar na formulação vacinal em desenvolvimento um adjuvante que seja capaz de aumentar a imunogenicidade dos

antígenos, potencializando a resposta imune sem induzir efeitos colaterais indesejáveis. Os dados obtidos neste estudo mostraram que a prova de conceito avaliada pela administração da vacina RsSap demonstrou ser segura tanto para camundongos BALB/c quanto para cães, não induzindo nenhuma alteração comportamental ou reações no local do inóculo. Além disso, foi observada que a imunização com RsSap não alterou o peso dos animais (camundongos e cães). Embora diferenças estatisticamente significativas tenham sido encontradas em camundongos, a maioria dos resultados dos parâmetros hematológicos e leucocitários estão dentro dos valores de referência para camundongos BALB/c, mostrando que a vacina não induziu distúrbios sistêmicos graves como hemólise, anemia ou alterações leucocitárias. Foi observado um indicativo de anemia megablástica nos animais dos grupos Controle e Saponina, possivelmente desencadeada pela redução dos níveis de B12 e ácido fólico devido à perda de sangue durante o repasto sanguíneo do carrapato (Nagao e Hirokawa, 2017). Isso explicaria o aumento nos parâmetros VCM, HCM e CHCM (Nagao e Hirokawa, 2017). De forma interessante, esse efeito não foi observado no grupo RsSap, mostrando que os camundongos imunizados com RsSap permaneceram saudáveis durante todo o estudo. Além disso, a vacina induziu altos níveis de linfócitos B CD19<sup>+</sup> circulantes, indicando o envolvimento de uma população celular fundamental na produção de anticorpos. A ausência de alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos reforça que a formulação RsSap também é inócua para cães.

Outro ponto importante observado foi o elevado nível de IgG específico para o antígeno bruto de *R. sanguineus* tanto em cães quanto em camundongos, indicando uma forte antigenicidade induzida pelo protocolo de imunização. Mendonça (BR1020130228052; BR1020140220275) imunizou camundongos BALB/c e cães com antígenos de *L. longipalpis* associado ao adjuvante saponina, e observou aumento dos níveis séricos de IgG nos dois modelos experimentais. Rodrigues-Alves (BR1020170278859; BR1020190103329) também observou altos níveis de anticorpos em camundongos BALB/c imunizados com antígenos bruto de *Aedes aegypti* associados ao adjuvante MPLa. Embora tenha sido demonstrado que houve uma forte imunogenicidade induzida pela vacinação, a realização dos testes de interferência no ciclo de vida de *R. sanguineus* é um pré-requisito para a análise de eficácia vacinal. Neste sentido, a análise da eficácia foi realizada a fim de validar o



potencial de interferência da formulação nos aspectos biológicos do carrapato, para então seguir com os ensaios em cão.

A imunização com RsSap induziu soltura prematura das fêmeas de *R. sanguineus*, o que leve à menor ingestão de sangue. Um menor volume de sangue ingerido implica em menor peso das fêmeas, o que pode prejudicar o desenvolvimento e a maturação do ovário (Weiss e Kaufman, 2001; Weiss e Kaufman, 2004). A vitelogenina é uma importante proteína à qual estão associados lipídios, carboidratos e fosfato, que é fundamental no desenvolvimento dos oócitos. Em carrapatos, é sintetizada no intestino médio (Coons *et al.* 1989), nos oócitos (Diehl *et al.*, 1982) e principalmente no corpo gorduroso (Araman, 1979), após o acasalamento e principalmente após a soltura da teleógina (Araman, 1979). No presente estudo observamos uma intensa redução no número de ovos gerados pelas fêmeas do grupo RsSap. Além disso, os ovos apresentaram coloração preta, aspecto seco e não eclodiram. Estes dados suportam a hipótese de que a soltura precoce observada em teleóginas do grupo RsSap pode ter prejudicado a síntese de vitelogenina e, conseqüentemente, falta de proteína gema nos oócitos, tornando os ovos inférteis. Trabalhos anteriores utilizando antígenos bruto de *L. longipalpis* e *A. aegypti* também obtiveram sucesso em interferir no ciclo biológico desses vetores (Mendonça - BR1020130228052; BR1020140220275 e Rodrigues-Alves - BR1020170278859; BR1020190103329).

Após os resultados obtidos pela imunização em camundongos tornou-se viável e interessante iniciar o protocolo em cães, a fim de assegurar a confiabilidade do protocolo no hospedeiro prioritário do *R. sanguineus*. Nesse sentido, a forma de desafio proposta para os cães visou avaliar não apenas o efeito direto da formulação RsSap, mas também, avaliar se uma forma evolutiva “transfere” os efeitos da imunização para a forma evolutiva seguinte do carrapato. O primeiro desafio foi realizado com larvas de *R. sanguineus* e foi possível observar que a imunização com RsSap reduziu o número de larvas recuperadas viáveis, bem como reduziu o número das larvas que conseguiram completar a muda para ninfa. O mesmo efeito foi observado no desafio com as ninfas, porém, o diferencial da metodologia proposta foi a identificação dos efeitos do desafio cruzado, como explicado na Figura 3. Independente do cruzamento para o repasto sanguíneo nos diferentes grupos (RS<sup>L</sup> ou CT<sup>L</sup>), pode-se observar que independente da origem da ninfa, o repasto em cães imunizados com RsSap diminui a viabilidade e a eficiência da muda para adultos. Além

disso, interferência semelhante foi observada nas ninfas RS<sup>L</sup> alimentadas em cães não imunizados demonstrando ser um ponto interessante da vacina, já que estas formas evolutivas, mesmo que tivessem acesso subsequente a algum hospedeiro não imunizado, ainda assim sofreriam redução em sua população. Com isso pode-se inferir que as larvas quando alimentadas em cães imunizados com RsSap passam os anticorpos para a forma evolutiva seguinte. Esse efeito foi evidenciado quando ninfas RS<sup>L</sup> alimentadas em cães controle apresentaram maior mortalidade durante a alimentação e menor capacidade de realizar muda. Os resultados observados para larvas e ninfas são importantes por mostrarem que mesmo utilizando uma formulação com antígeno bruto de fêmeas em jejum há componentes que são capazes de interferir na viabilidade desses dois estágios.

No terceiro desafio empregado neste estudo, usando formas adultas (macho e fêmea) de *R. sanguineus* originadas dos desafios anteriores demonstraram que os resultados foram consistentes com o que foi encontrado para larvas e ninfas. Fêmeas CT<sup>L</sup> alimentadas em cães imunizados e fêmeas RS<sup>L</sup> alimentadas em cães controle apresentaram comportamento semelhante no que diz respeito ao baixo volume de sangue ingerido e na quantidade de ovos gerados. Dessa forma, destacamos que todas as formas evolutivas de *R. sanguineus* que realizaram o repasto sanguíneo em cães imunizados sofreram um grande impacto na ingestão de sangue. Como esperado, houve redução na quantidade de ovos gerados por teleóginas RS e na taxa de eclosão. Johnston *et al.* (1986) realizaram um dos estudos pioneiros de imunização de bovinos das raças *Bos taurus* e *Bos indicus* com extrato bruto de *R. microplus* associado ao adjuvante completo de Freund e observaram perda de peso e redução da massa de ovos em teleóginas alimentadas em ambas as raças. A partir desse estudo, Willadsen *et al.* (1988) identificaram uma proteína do intestino de *R. microplus* capaz de interferir em sua fisiologia, o que permitiu algum avanço no desenvolvimento de vacinas contra carrapatos bovinos. Jittapalapong *et al.* (2000) imunizaram cães da raça Beagle com antígeno intestinal de fêmeas e machos semi-ingurgitados (3-5 dias de alimentação) de *R. sanguineus* com adjuvante de Freund. Apesar dos autores terem relatado que a imunização induziu um maior peso às teleóginas, observaram redução no número de teleóginas recuperadas, na massa de ovos e no número de ovos viáveis. Remedio *et al.* (2013) demonstraram que o tecido epitelial do intestino de *R. sanguineus* é do tipo pseudoestratificado. Outros autores evidenciaram que esse tecido é permeável a imunoglobulinas do hospedeiro e que esses anticorpos

uma vez na hemolinfa, poderiam se ligar à sua proteína correspondente em qualquer órgão (Ben-Yakir *et al.* 1986; Wang & Nuttall 1994). Agbede & Kemp (1986) citam que no caso de dano no epitélio intestinal, o seu conteúdo pode ser exposto a outros órgãos como ovário, útero e glândulas salivares. Considerando o exposto por esses autores e com base nos dados obtidos neste trabalho, é possível defender a hipótese em que os anticorpos anti-RsSap possam ter se ligado às proteínas presentes no intestino das fêmeas de *R. sanguineus*, causando assim uma modificação na homeostase do carrapato.

Em geral, os carrapatos são altamente especializados na digestão sanguínea, especialmente a hemoglobina, componente predominante da dieta digerido em espaços intracelulares ou extracelulares (Sonenshine, 1991). A rápida absorção da fração globina é importante para o processamento de ferro, enquanto a fração heme é rapidamente processada e eliminada (Kitoaka, 1961). Lara *et al.* (2005) descreveram a existência de um receptor de superfície celular para a hemoglobina, enfatizando a rápida captação da fração heme. A ferritina também está associada à captação de ferro, tanto no intestino médio quanto nas glândulas salivares de *Haemaphysalis longicornis*, e quando modulada pode induzir danos às proteínas, lipídios e DNA, e influenciar diretamente na alimentação sanguínea, reprodução e sobrevivência (Hajdusek *et al.*, 2009; Galay *et al.*, 2013; Galay *et al.*, 2014).

Os resultados apresentados nesse capítulo foram usados para realizar o depósito no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), sob a forma de patente de invenção intitulada “VACINA CONTRA CARRAPATOS *Rhipicephalus sanguineus*” (Anexo, item 16.2).

Baseado na validação da prova de conceito apresentado neste capítulo, foram usadas as amostras de soro geradas para realizar o aprimoramento biotecnológico da vacina, de modo a se identificar alvos vacinais que pudessem ser produzidos a baixo custo pela indústria e em larga escala. Essa etapa foi descrita no capítulo seguinte.

## **CAPÍTULO II: Identificação de novos alvos vacinais contra o carrapato de cães que possam ser produzidos em larga escala e com baixo custo**

## 6. Objetivos Específicos

6.1 Purificação de anticorpos IgG anti-RsSap obtidos na etapa anterior.

6.2 Seleção e identificação dos alvos de maior especificidade às IgGs anti-RsSap purificadas através da técnica de *phage display*.

6.3 Extração e sequenciamento do DNA viral dos clones selecionados para identificação dos peptídeos alvo.

## 7. MATERIAL E MÉTODOS

### 7.1 Purificação de anticorpos IgG anti-RsSap

Os anticorpos IgG foram precipitados e purificados a partir 5mL de soro contendo um *pool* de três cães previamente imunizados com a formulação RsSap. Como controle foi utilizado soro de 3 cães do grupo controle inoculados com solução salina 0,9%. Adicionou-se 5 mL de PBS 1x ao soro. Para precipitar as proteínas do soro, 6,7 mL da solução saturada de sulfato de amônio (100%) foi adicionada por gotejamento, e a amostra foi mantida *overnight* à 4°C, sob agitação. Após a incubação, a amostra foi transferida para uma membrana de poro molecular de 8000 a 12000 nm (Spectra/Por; Spectrum Laboratories, Inc, US) previamente hidratada em PBS 1x, e foi mantida sob agitação, durante 48 horas à 4°C. A solução de diálise foi trocada 2x ao dia para evitar supersaturação. Após diálise, as amostras foram submetidas à dosagem pelo método de BCA (Pierce, Rockford, IL, USA) (Smith et al, 1985).

O soro dialisado foi submetido a purificação das IgGs utilizando a coluna de separação com Proteína-A sepharose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para preparação da coluna, a sepharose (1 g) foi diluída em 40 mL de solução NaCl 0,5 M (pH 2.5) em um tubo cônico (50 mL). A solução foi homogeneizada e submetida a duas centrifugações a 364 xg, durante 2 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscendido em 40 mL de solução NaCl 0,5 M (pH 2.5). O sobrenadante foi descartado e *pellet* ressuscendido em 40 mL de solução NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M em NaCl 0,5 M (pH 8,2). A amostra foi novamente centrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente. Após descarte do sobrenadante, a amostra foi ressuscendida em 5 mL de solução NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M em NaCl 0,5 M (pH 8,2). Transferiu-se a coluna para um tubo de cultura de polipropileno (fundo em "U", 13 mL, Globe Scientific, Paramus, NJ, EUA) e adicionou-se 5mL da solução de IgG previamente precipitada e dialisada. A coluna foi mantida *overnight* à 4 °C, sob agitação lenta por inversão (agitador hematológico) para não hidrolisar a resina. Após incubação, a coluna foi centrifugada a 363 xg, durante 2 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado para dosagem das IgGs que não aderiram à coluna. Após dosagem por BCA, o resultado foi comparado ao obtido logo após a diálise. Para desligar as IgGs da coluna, foi utilizada solução ácida de glicina (pH 2,8),

seguida de neutralização do pH com solução NaOH 0,5 M. A concentração das IgGs foi dosada pelo método de BCA (Smith et al, 1985).

Após a purificação das IgGs, a concentração para uso nos ciclos de *biopanning* (25 µg/ poço) foi definida através de uma titulação realizada por técnica imunoenzimática (ELISA), seguindo as mesmas condições descritas no item 3.6, com pequenas modificações no bloqueio. Após sensibilização, as amostras foram bloqueadas com 200 µL/ poço de PBS-BSA (PBS 1x com 3% BSA), seguido de incubação durante 90 minutos à 4 °C.

## **7.2 Phage display - Ciclos de *biopanning***

### **7.2.1 Seleção**

Para selecionar os alvos capazes de se ligar especificamente às IgGs anti-RsSap purificadas, foram utilizadas bibliotecas de bacteriófagos filamentosos M13 (fagos) que expressam entre 12 e 15 peptídeos associados à sua proteína de superfície pVIII (Simon Fraser University, Burnaby BC, Canadá). Para seleção negativa, placas de 96 poços foram sensibilizadas com IgGs purificadas (35 µg/ mL) de camundongos controle (CT). Posteriormente, as placas foram lavadas com TBS-T 0,05% e bloqueadas por 2 h a 37 °C com TBS-T/BSA 3%. Após este passo, adicionou-se  $10^{11}$  fagos das bibliotecas primárias em meio contendo 100 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,6). As placas foram mantidas sob agitação, à 4°C, *overnight*. Após incubação, o sobrenadante contendo os fagos não ligantes foi coletado e reservado e a placa contendo os fagos ligantes foi descartada. Após a seleção negativa, os fagos não ligantes foram incubados com as IgGs anti-RsSap purificadas (25 µg/ mL), promovendo uma seleção positiva. Após a incubação, os fagos não ligantes foram removidos por lavagens sucessivas com PBS-Tween (pH 7,5) suplementado com TBS (50 mM) e NaCl (150 mM). Em seguida, os fagos ligantes foram removidos por eluição com solução ácida de glicina 0,1M (pH 2,2) suplementada com 0,1% de BSA. Três ciclos consecutivos de seleção específica para IgGs anti-RsSap foram realizados com a finalidade de aumentar a especificidade das ligações (Ferrières *et al.* 2000).

### 7.2.2. Amplificação

Os fagos eluídos foram amplificados após serem transferidos para culturas de 120 mL de *Escherichia coli* K-91 em fase exponencial de multiplicação (equivalente a 1,8 em densidade óptica de 550 nm) em meio Luria Bertani (LB) e incubados inicialmente sem agitação em estufa à 37 °C, durante 10 minutos. Após esta incubação, as bactérias infectadas foram selecionadas pela adição de 20 µg/ mL de tetraciclina Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seguida de incubação à 37 °C *overnight*, em 180 rpm de agitação. A cultura foi submetida a duas centrifugações por 30 minutos de (4000 rpm). Para obtenção dos fagos, os mesmos foram precipitados com solução de polietilenoglicol 8000 (PEG 8000 20% 2.5 M NaCl, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e mantidos *overnight* em gelo. O precipitado foi coletado após duas centrifugações à 2900 xg, 4 °C durante 40 e 10min, respectivamente. O *pellet* foi ressuscitado em 3 mL de Tris/NaCl, incubado à 37 °C, durante 30 minutos, em 180 xg de agitação, e transferido para microtubos. As amostras foram novamente centrifugadas, a 5400 xg durante 10min, para retirar qualquer vestígio de bactéria. O sobrenadante contendo os fagos de interesse foi armazenado em freezer –20 °C até o momento da titulação.

### 7.2.3 Titulação

Os fagos foram titulados a partir de diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-12}$ ) em meio LB líquido. Separadamente, 10 µL das diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  e  $10^{-12}$  foram utilizadas para infectar culturas de 200 µL de *E. coli* em fase exponencial de crescimento (1,8 em densidade óptica de 550 nm). Para otimizar a infecção, as culturas foram incubadas à 37 °C, durante 30 minutos, sendo os 15 minutos finais em 400 xg de agitação. As amostras foram plaqueadas em meio LB ágar contendo tetraciclina (20 µg/ mL). A maior diluição onde houve crescimento foi selecionada para a quantificação dos fagos, através do seguinte cálculo: *número de colônias x fator de diluição x 100*. O resultado foi expresso em unidades por mililitro (TU/ mL). A titulação foi realizada após cada ciclo de seleção.



### 7.3 Reatividade dos fagos após os ciclos de *biopanning*

Buscando avaliar se houve aumento da afinidade dos fagos selecionados pelas IgGs anti-RsSap purificadas, uma nova ELISA foi realizada com amostras de fagos após o término de cada um dos três ciclos de seleção como forma de comparar a reatividade. Após o terceiro ciclo de *biopanning*. As placas foram sensibilizadas com as IgGs anti-RsSap purificadas (com 25 µg/ poço) e incubadas *overnight* à 4 °C. Após incubação, as placas foram lavadas com PBS-Tween (PBS 1x com 0,1% de Tween 20) e bloqueadas com PBS-BSA durante 1h, à 37 °C. Após bloqueio, os fagos obtidos após cada ciclo foram adicionados e mantidos durante 2 h, à 37 °C. Além dos fagos previamente selecionados, um fago selvagem foi utilizado como controle da reação. Em seguida, adicionou-se uma solução de anticorpo anti-IgG conjugado a peroxidase com anticorpo anti-M13 (Roche Molecular Biochemicals) diluído 1:5000. Após 1h de incubação à 37 °C, as placas foram lavadas e a reação foi revelada adicionando OPD (Lot: 77H5360, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como substrato. A leitura das amostras foi realizada no espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Advices, Sunny Vale, CA, EUA), em comprimento de onda de 490 nm.

### 7.4 Individualização dos clones de fagos (*Screening*)

Após o terceiro ciclo de *biopanning* os fagos selecionados foram incubados com *E. coli* (K91) na fase mid-log (0,9 em densidade ótica de 600 nm), plaqueados sobre ágar sólido em meio LB contendo 1% de tetraciclina e incubados *overnight* à 37°C. As colônias que se apresentaram individualmente isoladas foram amplificadas para análise individual. Em seguida, foram transferidas separadamente para uma placa de cultivo celular *Deep Well* de 96 poços (Sarsted, Numbrecht, AL) com 200 µL de meio LB contendo tetraciclina (20 µg/ mL), e incubadas à 37°C, durante 24 horas em 400 xg de agitação. Finalmente, as placas foram centrifugadas a 2700 xg durante 30 minutos e o sobrenadante da cultura, contendo os fagos isolados, foi testado pela técnica de ELISA, conforme descrito anteriormente no item 3.6.

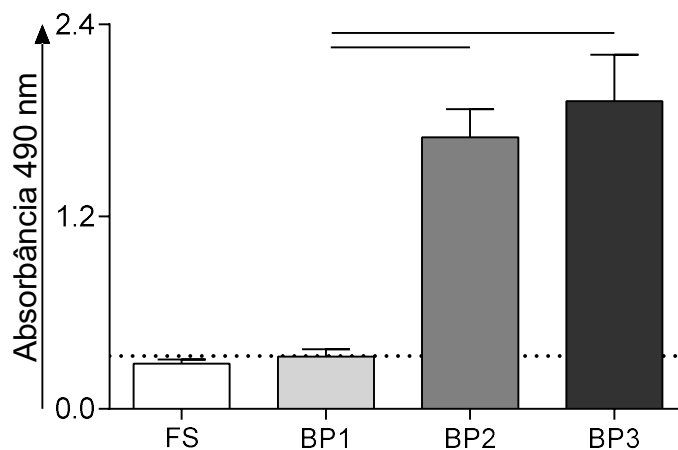
## **7.5 Extração e sequenciamento do DNA viral dos clones selecionados para identificação dos peptídeos alvo**

Para a identificação das sequências peptídicas presentes na superfície dos fagos selecionados e clonados, o DNA viral foi extraído com o kit de extração QIAprep Spin M13 Purification (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A quantificação do DNA extraído foi realizado no espectrofotômetro Nanodrop (Denovix DS11, Wilmington, Delaware, USA). Após quantificação, as amostras de DNA (400 pb) foram sequenciadas pela empresa Myleus Biotecnologia© através do método de Sanger, utilizando 10 µM do primer M13 reverse 5'-TCG GCA AGC TCT TTT AGG-3' (IDT®).

## **8. RESULTADOS**

### **8.1 Avaliação da reatividade dos fagos após os ciclos de *biopanning***

Para avaliar a reatividade dos fagos frente às IgGs anti-RsSap, foram realizados testes por reação de ELISA após os três diferentes ciclos de *biopanning*. Como esperado, foi observado um aumento significativo na reatividade dos fagos após o segundo e o terceiro ciclo *biopanning* quando comparado ao primeiro ciclo, e o fago selvagem (Figura 10). O terceiro ciclo aumentou a especificidade em 2x quando comparado ao primeiro ciclo. Este resultado mostra que os fagos reativos foram selecionados de forma eficaz.



**Figura 10. Reatividade dos fagos após os ciclos de *biopanning* 1, 2 e 3.** O resultado da análise da reatividade dos fagos às IgGs anti-RsSap, após os ciclos de *biopanning* 1 (BP1), 2 (BP2) e 3 (BP3), está representado em gráfico de barra destacando a mediana e o intervalo interquartil. Fagos selvagem (FS) foram utilizados como controle. O *cut-off* está representado pela linha pontilhada. Os valores de *P* foram obtidos pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney e considerados estatisticamente significativos quando  $<0,05$ . As linhas conectoras representam as diferenças entre os grupos. O *cut off* está representado pela linha pontilhada (média do fago selvagem mais duas vezes o valor do desvio padrão)

## **8.2 Avaliação da reatividade de cada um dos clones após o terceiro ciclo de *biopanning***

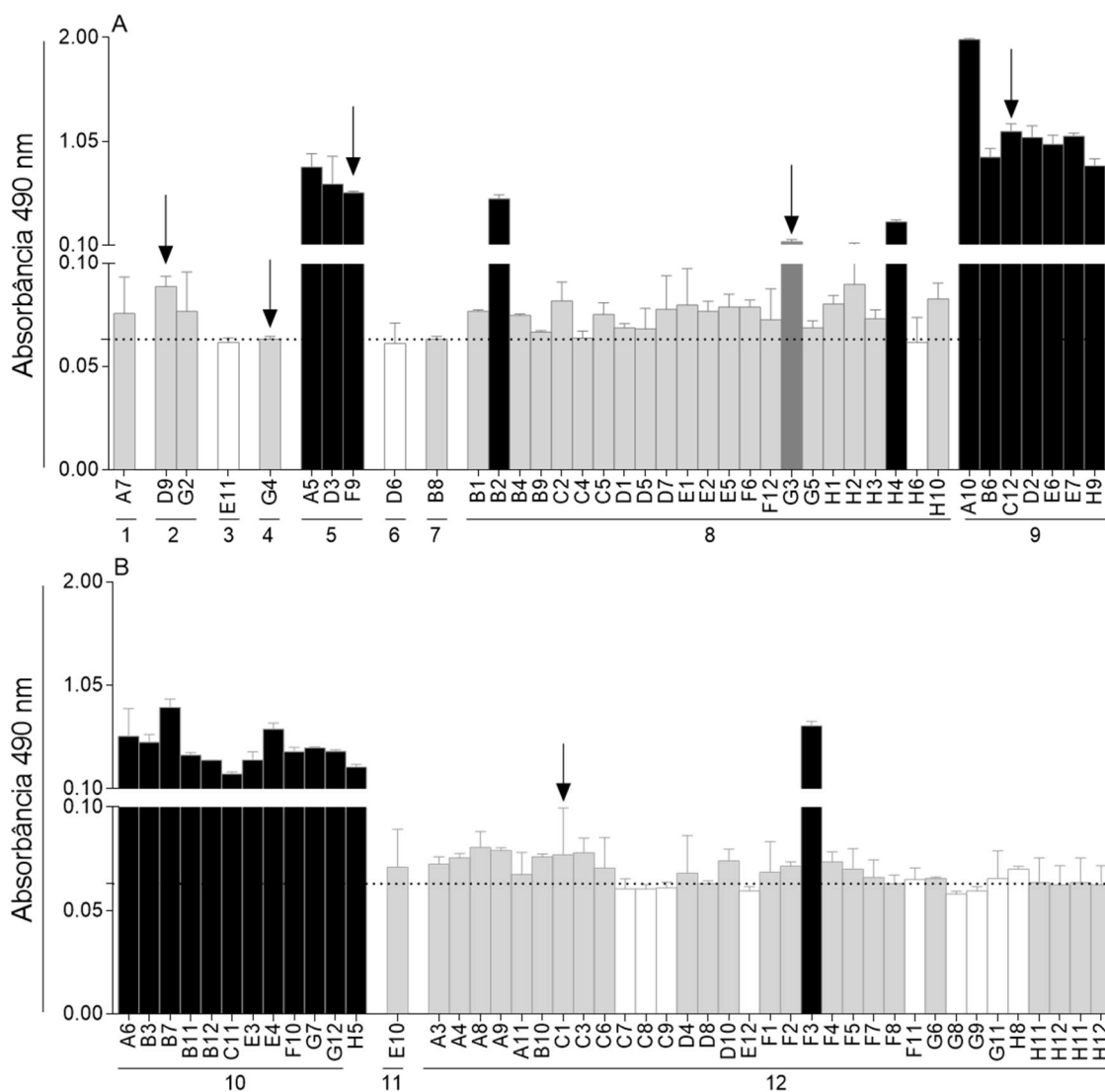
Após constatar o aumento da reatividade nos ciclos, os fagos foram avaliados individualmente quanto ao reconhecimento às IgGs anti-RsSap. Para isto, algumas alíquotas resultantes do terceiro ciclo de seleção foram plaqueadas juntamente com bactérias *E. coli* K91 em meio LB sólido e após o crescimento as colônias foram isoladas e crescidas individualmente em meio líquido LB. Após a individualização dos clones a reatividade dos clones foi avaliada pela técnica de ELISA. A Figura 11 mostra os 94 clones amplificados após a clonagem, os clones em ordem crescente de identificação.

Considerando que a intensidade de reatividade dos clones aos anticorpos purificados não indica necessariamente o potencial biológico em interferir no ciclo de vida de *R. sanguineus*, o critério de seleção dos clones diferentes níveis de reatividade: alta (valores 2x acima do *cut-off*), média (valores 1x acima do *cut-off*), baixa (valores próximos ao *cut-off*), e não reativos (valores abaixo ou igual ao *cut-off*). Desses, 31.9% apresentaram alta reatividade, 1.1% dos clones demonstraram reatividade moderada, 48.9% apresentaram baixa e 18.1% apresentam não reativos às IgGs anti-RsSap.

## **8.3 Extração e sequenciamento do DNA viral dos clones selecionados para identificação dos peptídeos alvo**

Para a identificação das sequências dos peptídeos presentes na superfície dos fagos clonados, foi feita a extração e o sequenciamento do DNA viral. Para extrair o DNA dos Fagos selecionados no *screening*, utilizou-se o kit de extração, específico para fagos M13, *QIAprep Spin M13 purification* (QIAGEN – Hilden, Alemanha), conforme descrito pelo fabricante. Após a extração foi feita a quantificação do DNA extraído no aparelho Nanodrop (Denovix DS11 Spectrophotometer). A reação de sequenciamento de 91 amostras foi realizada pela empresa Myleus (Belo Horizonte-MG, Brasil), a partir de 2µg de DNA de cada fago e 10µM do *primer M13 reverse* 5'-TCG GCA AGC TCT TTT AGG-3' (IDT® - Belo Horizonte-MG, Brasil). A análise do sequenciamento foi feita utilizando o programa DNA Baser v4.3.

Os resultados da dosagem e do sequenciamento do DNA estão apresentados na Tabela 8 e indicados na Figura 11 abaixo do eixo “x” pelas numerações de 1 a 12. A partir dos 87 fagos que foram sequenciados (Figura 11) foi obtido no total 12 sequências distintas de nucleotídeos, sendo: Sequência 1 (clone A7); Sequência 2 (clone D9 e G2); Sequência 3 (clone E11); Sequência 4 (clone G4); Sequência 5 (clone A5, D3 e F9); Sequência 6 (clone D6); Sequência 7 (clone D8); Sequência 8 (clone B1, B4, B9, C2, C4, C5, D1, D5, D7, E1, E2, E5, F6, F12, G3, G5, H1, H2, H3, H4, H6 e H10); Sequência 9 (clone A10, B6, C2, D2, E6, E7 e H9); Sequência 10 (clone A6, B3, B7, B11, B12, C11, E3, E4, F10, G7, G12 e H5); Sequência 11 (clone E10); Sequência 12 (clone A3, A4, A8, A9, A11, A12, B10, C1, C3, C6, C7, C8, C9, D10, E8, E12, F1, F2, F3, F4, F5, F7, F8, F11, G6, G8, G9, G11, H7, H8, H11 e H12).



**Figura 11. Reatividade dos clones selecionados após o terceiro ciclo de *biopanning* agrupados de acordo com a sequência de aminoácidos.** O resultado da análise da reatividade dos clones às IgGs anti-RsSap, após o terceiro ciclo de *biopanning* está representado em gráficos de barra destacando a mediana e o intervalo interquartil. Barras brancas representam clones não reativos; barras cinza-claros representam clones com baixa reatividade; barra cinza médio representa clone com reatividade média; barras pretas representam clones com alta reatividade. Os números 1-12 abaixo do eixo X representam as sequências de 1-12 agrupando as seus respectivas clones. As setas indicam os clones que foram escolhidos para imunização em camundongos BALB/c. O *cut-off* está representado pela linha pontilhada (média entre os controles mais duas vezes o desvio padrão).

**Tabela 8. Dosagem e sequenciamento do DNA (ng/ $\mu$ L) dos clones de fagos selecionados após o terceiro ciclo de *Biopanning*.**

Clone	DNA (ng/ $\mu$ L)	Sequência	Clone	DNA (ng/ $\mu$ L)	Sequência
A7	55,6	1	A6	44,51	
D9	40,37		B3	43,83	
G2	67,46	2	B7	54,32	
E11	29,01	3	B11	42,53	
G4	74,82	4	B12	53,11	
A5	45,83		C11	48,95	
D3	51,4	5	E3	50,23	10
F9	40,57		E4	66,61	
D6	19,57	6	F10	36,39	
B8	60,74	7	G7	29,21	
H6	65,23		G12	52,84	
H10	58,04		H5	60,32	
B1	92,79		E 10		11
B2	44,29		A3	88,03	
B4	68,42		A4	73,2	
B9	9,97		H7	42,73	
C2	10,14		H8	80,38	
C4	10,45		H11	82,79	
C5	78,25		H12	66,87	
D1	76,7		A8	69,38	
D5	55,54		A9	79,37	
D7	11,4	8	A11	11,46	
E1	29,97		A12	77,3	
E2	27,6		B10	62,94	
E5	10,69		C1	78,65	
F6	79,33		C3	10,18	
F12	86,97		C6	65,44	
G3	78,96		C7	58,23	
G5	60,65		C8	66	
H1	80,21		C9	34,47	12
H2	79,26		D4	38,51	
H3	75,64		D8	17,69	
H4	45,78		D10	20,4	
H9	35,35		E8	50,5	
A10	36,32		E12	28,63	
B6	60,51		F1	68,76	
C12	53,32	9	F2	82,11	
D2	47,54		F3	52,53	
E6	56,38		F4	88,34	
E7	32,73		F5	78,68	
			F7	75,81	
			F8	71,55	
			F11	86,31	
			G6	83,65	
			G8	64,59	
			G9	83,57	
			G11	71,33	

Por motivo de sigilo de patente e segredo industrial, as sequências de aminoácidos não serão reveladas nesse trabalho. Após obtenção desses alvos, avaliamos o potencial como formulações vacinais em interferir no ciclo de vida de *R. sanguineus*, em novo teste pré-clínico vacinal descrito no capítulo seguinte.

## 9. DISCUSSÃO

A tecnologia *phage display* é considerada como eficiente por favorecer à amplificação de um grande número de cópias de diferentes clones de fagos com elevada seletividade e afinidade de ligação as moléculas alvo (Folgori *et al.*, 1994). Além disso, apresenta outras vantagens tais como facilidade de padronização, rapidez da técnica e de baixo custo quando comparada à outras técnicas de proteínas recombinantes. A seleção de fagos através de interações com antígenos alvo foi descrita por Parmley e Smith (1988) e desde então, tem sido empregada em diferentes estudos de diagnóstico, tratamento e profilaxia. Nesse sentido, diferentes estudos têm aplicado a técnica *phage display* para finalidades diversa (Zanganeh *et al.* 2018, Chang *et al.* 2018, Windsor e Raines, 2018, Radwańska *et al.* 2018). Zanganeh *et al.* (2018) desenvolveram nanocorpos altamente específicos e de baixo custo para serem usados em imunoenaios de detecção da enterotoxina estafilocócica B (SEB) de *Staphylococcus aureus*. Chang *et al.* (2018) utilizaram o *phage display* para identificar novos fármacos baseados em anticorpos monoclonais humanos para o tratamento da leucemia leucocítica crônica. Windsor e Raines (2018) utilizaram a técnica para identificar substratos da protease de HIV-1 ajudando a elucidar o mecanismo de reconhecimento molecular por esta enzima e favorecendo a busca por inibidores. Radwańska *et al.* (2018) mostraram que fragmentos de anticorpos sintéticos (Fabs) gerados por *phage display* são capazes de se ligar seletivamente e com elevada afinidade aos domínios C-terminais das nucleoproteínas (NPs) das cepas conhecidas do vírus Ébola, e que possuem potencial para uso diagnóstico e terapêutico. Jo *et al.* (2018) utilizaram uma biblioteca de Fabs sintéticos humanos apresentados por fagos para gerar um anticorpo monoclonal humano capaz de neutralizar os quatro genótipos do vírus da Hepatite B, que pode ser usado na prevenção e no tratamento da infecção viral. Neste estudo foram identificados 12 sequencias de aminoácidos distintas, todas possuem potencial em constituir um imunobiológico contra *R. sanguineus*, mostrando que a utilização de uma biblioteca aleatória é eficaz para a seleção de alvos específicos, no nosso caso, para *R. sanguineus*. O potencial biológico não é necessariamente proporcional à reatividade observada na Figura 11, uma vez que o clone com a menor reatividade pode ser o que possua o melhor efeito biológico em carrapatos *R. sanguineus*.

A técnica em questão também vem sendo amplamente utilizada na busca de alvos vacinais contra diferentes doenças. Deng *et al.* (2015) construíram fagos



híbridos contendo M2e, domínio extracelular conservado da proteína M2 de membrana no vírus Influenza A, e aminoácidos (2-16) da região N-terminal da proteína pVIII de fagos f88. Os autores mostraram que a imunização com estes fagos protegeu camundongos BALB/c contra o desafio com dose murina letal contendo diferentes subtipos do vírus influenza A. Já foi demonstrado que imunógenos contra soros de cães infectados com *Leishmania infantum* baseados em epítomos selecionados pelo *phage display*, induziu uma proteção parcial em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* (Costa *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2015). Em trabalhos de Leite (2017 – dados não publicados - BR1020170229041; BR1020170229068; BR1020170229033) selecionou 83 clones de fagos potenciais candidatos vacinais, através do *screening* utilizando IgGs induzidas pela vacinação de cães com as proteínas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Destes, 25 clones tiveram suas sequências nucleotídicas caracterizadas que foram traduzidas em seis sequências peptídicas distintas. Alves (2018 – dados não publicados - (BR1020170278859; BR1020190103329) obteve 94 clones de fagos potenciais candidatos vacinais, através do *screening* utilizando IgGs induzidas pela vacinação de camundongos BALB/c com as proteínas de *A. aegypti*. Destes, 28 clones tiveram suas sequências nucleotídicas caracterizadas que foram traduzidas em 13 sequências peptídicas distintas. Esse sucesso na seleção de sequências com potencial uso como candidatos vacinais contra flebotomíneos e mosquitos estimulou a busca por alvos vacinais contra outros artrópodes hematófagos justificando a realização do presente trabalho. Dessa forma, após concluir a prova de conceito da formulação RsSap (Capítulo I), foi utilizado o *phage display* para identificar alvos vacinais presentes no soro obtido de cães imunizados com esta formulação. Foi observado um aumento significativo na afinidade dos fagos pelas IgGs anti-RsSap purificadas, favorecida pelo aumento da especificidade da ligação peptídeo/anticorpo após os três ciclos de seleção. No total foram amplificados 94 clones de fagos durante o *screening* e todos foram submetidos para a extração e sequenciamento do DNA. Como visto anteriormente, vários clones possuem a mesma sequência nucleotídica e, como resultado do processo de seleção, foram obtidas 12 sequências distintas, peptídicas reconhecidas por IgGs anti-RsSap que podem ser utilizadas como alvos vacinais, como pode ser visto na Tabela 8, sendo que desses apenas 5 clones apresentaram sequência nucleotídica única. Baseado nesses dados, 6 alvos foram selecionados para realizar um novo ensaio pré-clínico vacinal em camundongos BALB/c e avaliar o

seu potencial em induzir produção de anticorpos específicos capazes de interferir na sobrevivência e/ou no ciclo de vida de *R. sanguineus*.

## **CAPÍTULO III: Ensaio pré-clínico vacinal com alvos vacinais definidos identificados por *phage display***

## 10. Objetivos específicos

10.1 Avaliar em camundongos BALB/c imunizados com seis diferentes formulações vacinais provenientes da seleção por *phage display*, os seguintes parâmetros:

- Inocuidade do imunobiológico.
- Hemograma, subpopulações de linfócitos e, função hepática e renal.
- Perfil imunofenotípico de leucócitos e monócitos circulantes.
- Presença de anticorpos IgG induzidos pela imunização.

10.2 Avaliar o potencial de interferência de seis formulações vacinais (S1-6) no ciclo de vida de *R. sanguineus* mantidos em camundongos BALB/c.

- Taxa de sobrevivência.
- Oviposição individual e fertilidade dos ovos.

## 11. MATERIAL E MÉTODOS

### 11.1 Ensaio pré-clínico vacinal com diferentes formulações vacinais identificadas por *phage display*

Para avaliar o potencial dos alvos selecionados no Capítulo 2, foram realizados dois ensaios pré-clínicos vacinais independentes, com camundongos BALB/c machos, de seis semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da UFMG. Os animais foram mantidos nas mesmas condições descritas no item 3.3 (Capítulo 1), sendo divididos em 9 grupos de 5 indivíduos cada, em duplicata (Tabela 9).

**Tabela 9. Grupos experimentais.**

Grupo	Sigla	Clone	Composição do Inócuo
Controle	DPBS	-	Tampão salino-fosfato Dulbecco estéril
Hidróxido de Alumínio	HALUM	-	1 mg de hidróxido de alumínio diluído em DPBS estéril
Fago Selvagem	FS	-	10 <sup>11</sup> TU do Fago M13 diluído em solução DPBS estéril
Sequência 1	S1	D9	10 <sup>11</sup> TU do clone D9 em solução DPBS + hidróxido de alumínio
Sequência 2	S2	G4	10 <sup>11</sup> TU do clone G4 em solução DPBS + hidróxido de alumínio
Sequência 3	S3	F9	10 <sup>11</sup> TU do clone F9 em solução DPBS + hidróxido de alumínio
Sequência 4	S4	G3	10 <sup>11</sup> TU do clone E10 em solução DPBS + hidróxido de alumínio
Sequência 5	S5	C12	10 <sup>11</sup> TU do clone A10 em solução DPBS + hidróxido de alumínio
Sequência 6	S6	C1	10 <sup>11</sup> TU do clone C1 em solução DPBS + hidróxido de alumínio

O esquema de vacinação consistiu de três doses subcutâneas de 100µL, com intervalo de 14 dias de acordo com os grupos descritos na Tabela 9. O adjuvante hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi diluído em Tampão salino-fosfato Dulbecco estéril (DPBS) (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,15 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> por litro e pH 7.4) na concentração de 1 mg/mL conforme descrito por Beck et al., (2018), 10<sup>11</sup> de Fago selvagem e as sequências 1-6 foram diluídos em adjuvante hidróxido de alumínio conforme descrito na Tabela 9.

O experimento foi dividido em cinco tempos de acompanhamento: previamente ao início do protocolo vacinal (T0), 7 dias após a primeira dose (T1), 7 dias após a segunda dose (T2), 7 dias após a terceira dose (T3), e o tempo final de 42 dias após a terceira dose vacinal, quando foi realizada a eutanásia dos animais (TF). A inocuidade do imunobiológico, os parâmetros hematológicos e a presença de anticorpos séricos foram avaliados em nos tempos T0 e TF. Nos tempos T1, T2 e T3 foram avaliados aspectos relacionados a inocuidade como formação de nódulos,

pápulas ou lesão no local do inócuo, mudanças comportamentais e alteração no peso. Em T3 foi realizada a coleta de sangue através de veia lateral da cauda para o teste de ELISA e avaliar a produção de anticorpos e dar sequência à fase de desafio com as fêmeas de *R. sanguineus*.

### **11.2 Avaliação da inocuidade do imunobiológico**

A inocuidade do imunobiológico foi avaliada nas mesmas condições descritas no item 3.5 (Capítulo 1).

### **11.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos**

A coleta de sangue e a avaliação dos parâmetros hematológicos da série eritrocítica e leucocítica foram realizados conforme descrito no item 3.6 (Capítulo 1).

### **11.4 Avaliação do perfil imunofenotípico das populações de linfócitos e monócitos induzidos pela imunização com as sequências 1-6 em camundongos BALB/c**

Além das marcações realizadas no item 3.8 (Capítulo 1), nesta etapa foi realizada a marcação de monócitos com o anticorpo anti-CD14-APC (clone Sa2-8 eBioscienc - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, EUA), seguindo o mesmo protocolo citado acima.

### **11.5 Avaliação da presença de anticorpos induzidos pela vacinação**

Amostras de soro dos camundongos vacinados foram submetidas a técnica de ELISA para verificar a presença de anticorpos IgG induzidos com diferentes alvos selecionados no Capítulo 2. As reações foram realizadas conforme descrito no item 3.8 (Capítulo 1), com pequenas alterações. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com  $10^{10}$ TU de fagos dos clones descritos na Tabela 9 (item 11.1) ou com 0,5 µg de extrato intestinal utilizado na formulação RsSap diluídos em 100µL de solução de cobertura tampão carbonato. Após incubação *overnight* em geladeira, as placas foram lavadas e bloqueadas. Após a incubação, o conteúdo das placas foi vertido e foram

adicionados 100 µL de PBS-Tween contendo o soro dos camundongos diluído nas concentrações de 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400. Após incubação *overnight* a 4°C, as placas foram novamente lavadas para adição de 100µL de anticorpo secundário anti-IgG total conjugado com peroxidase (anti-*mouse* IgG-h+I HRP, Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, TX, EUA), diluído 1:4000 em PBS-Tween. Após 70 minutos de incubação em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, as placas foram lavadas e reveladas nas mesmas condições descritas anteriormente (item 3.6). A leitura das amostras foi realizada no espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Advices, Sunny Vale, CA, EUA), em comprimento de onda de 490nm.

### **11.6 Repasto sanguíneo de fêmeas de *R. sanguineus* para análise da interferência no ciclo biológico em camundongos BALB/c**

A avaliação dos aspectos biológicos de *R. sanguineus* após repasto em camundongos BALB/c foi realizada para verificar se os anticorpos induzidos pela vacinação, com os seis alvos (S1-6), seriam capazes de interferir na sobrevivência e no desenvolvimento do carrapato.

O repasto sanguíneo de fêmeas de *R. sanguineus* em camundongos BALB/c vacinados, 21 dias após a última dose vacinal foi realizado nas mesmas condições descritas no item 3.9 (Capítulo 1), com alteração na confecção das câmaras de alimentação. Brevemente, tubos de fundo cônico de 15 mL foram cortados 1,5 cm abaixo da tampa e fixados em fita isolante (2,5 cm x 2,5 cm) fixa em tecido morim (3 cm x 3 cm) (Figura 2 – E). O pelo dorsal dos camundongos foi removido e as câmaras fixadas com o adesivo de contato Brascoplast (Figura 12). O repasto foi realizado individualmente, com dois casais de *R. sanguineus* (2 machos e duas fêmeas) em jejum de 30 dias após a muda. As fêmeas foram pesadas em balança analítica e transferidas para um recipiente tampado e mantido em BOD a  $28 \pm 2$  °C e umidade 80%. Uma vez em BOD, as fêmeas também foram verificadas diariamente para avaliar qualquer alteração biológica. Os ovos foram pesados e transferidos para seringas de 5 mL com a ponta removida e com tampa de algodão, mantidos em BOD a  $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade 90%. O número de ovos foi contado de acordo com os dados fornecidos por Hadi e Adventini (2015). Também foi registrado quais fêmeas não realizaram a oviposição e seu tempo de vida.



Figura 12. Camundongo BALB/c com dorso tricotomizado e câmara de alimentação utilizada no desafio com adultos de *R. sanguineus*.

### 11.7 Cálculo da eficácia vacinal

O cálculo da eficácia vacinal foi realizado conforme descrito por Aguirre *et al.*, (2015), com alterações, conforme a formula  $E(\%) = 100 * [1 - (RA * VA * OA * FE)]$ , realizada individualmente para cada sequência. Na qual: “RA” representa o efeito de cada sequência no número de fêmeas recuperadas após a alimentação. Essa variável foi calculada como a razão entre as fêmeas recuperadas pelos grupos vacinadas (rav) e a média das fêmeas recuperadas nos grupos DPBS, HALUM e FS (rac), logo  $RA=(rav/rac)$ . “VA” representa o efeito de cada sequência no número de fêmeas que realizaram a oviposição. Essa variável foi calculada como a razão entre as fêmeas que oviporam nos grupos vacinadas (rav) e a média das fêmeas dos grupos DPBS, HALUM e FS (vac), logo  $VA=(rav/vac)$ . “OA” representa o efeito de cada sequência no peso dos ovos após a oviposição. Essa variável foi calculada como a razão entre o peso dos ovos nos grupos vacinadas (oav) e a média do peso nos grupos DPBS, HALUM e FS (oac), logo  $OA=(oav/oac)$ . “FE” representa o efeito de cada sequência na fertilidade dos ovos. Essa variável foi calculada como a razão entre o percentual de ovos eclodidos nos grupos vacinados (fev) e a média a fertilidade dos ovos nos grupos DPBS, HALUM e FS (fec), logo  $FE=(fev/fec)$ .



## 11.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA). Os dados apresentaram distribuição não paramétrica no teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, dessa forma, para análise comparativa entre dois grupos, foi empregado o teste Mann-Whitney. A comparação das curvas de sobrevivência foi realizada pelo teste de Log-Rank Mantel-Cox. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## 12. RESULTADOS

### 12.1. As formulações vacinais compostas pelas sequências 1 a 6 foram consideradas seguras e inócuas em camundongos BALB/c

O protocolo vacinal não induziu nenhuma reação adversa como nódulos, pápulas ou úlceras no local do inócuo, bem como não foi observado alteração comportamental ou perda de peso.

Nas análises realizadas para a série vermelha (Tabela 10) e função hepática e renal (Tabela 11) não apresentou nenhuma alteração significativa, além da maioria dos resultados se apresentarem dentro dos valores de referência estabelecidos por Araújo (2012).

Tabela 10. Hemograma de camundongos BALB/c imunizados com sequências 1 a 6

Grupo	RBC ( $\times 10^6$ mm <sup>3</sup> )	HGB (g/dL)	VCM (fL)	HCM (g/dL)	CHCM (g/dL)
DPBS	8,72 $\pm$ 0,64	13,39 $\pm$ 0,76	46,67 $\pm$ 1,43	15,53 $\pm$ 1,30	33,22 $\pm$ 2,73
HALUM	7,97 $\pm$ 1,29	12,12 $\pm$ 1,82	47,38 $\pm$ 2,04	15,26 $\pm$ 1,39	32,19 $\pm$ 1,67
FS	8,64 $\pm$ 1,31	13,18 $\pm$ 2,02	46,89 $\pm$ 1,15	15,27 $\pm$ 0,24	32,57 $\pm$ 0,70
Seq 1	8,79 $\pm$ 1,24	13,69 $\pm$ 1,12	46,63 $\pm$ 2,53	15,68 $\pm$ 0,94	33,37 $\pm$ 1,3
Seq 2	1,56 $\pm$ 2,79	16,30 $\pm$ 3,75	46,13 $\pm$ 0,78	15,58 $\pm$ 0,75	33,74 $\pm$ 1,33
Seq 3	7,71 $\pm$ 0,54	12,63 $\pm$ 1,02	46,27 $\pm$ 1,69	16,17 $\pm$ 0,54	35,38 $\pm$ 1,24
Seq 4	8,40 $\pm$ 1,84	13,62 $\pm$ 2,32	46,72 $\pm$ 3,05	16,04 $\pm$ 1,20	34,38 $\pm$ 1,00
Seq 5	8,29 $\pm$ 1,10	13,03 $\pm$ 1,04	48,10 $\pm$ 1,60	15,81 $\pm$ 1,60	32,89 $\pm$ 1,90
Seq 6	6,10 $\pm$ 2,84	12,13 $\pm$ 0,25	49,12 $\pm$ 2,01	16,58 $\pm$ 1,30	33,74 $\pm$ 1,73
Referência*	7,4-11,1	11,5-15,3	46-48	14,1-16,9	30,5-35,4

\* - valores de referência segundo Araújo (2012).

**Tabela 11. Função hepática e renal de camundongos BALB/c imunizados com sequências 1 a 6**

Grupos	ALT (U/L)	AST (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
DPBS	30,07 ±10,18	69,35 ±4,21	51,61 ±9,28	0,90 ±0,21
HALUM	34,78 ±13,18	88,76 ±10,50	51,97 ±4,42	0,90 ±0,63
FS	37,36 ±11,33	75,51 ±14,72	45,81 ±6,68	0,89 ±0,28
Seq 1	32,64 ±10,45	53,36 ±9,12	51,76 ±18,37	0,75 ±0,15
Seq 2	32,42 ±11,16	79,39 ±20,33	46,19 ±8,78	0,79 ±0,17
Seq 3	36,49 ±2,00	87,25 ±31,61	51,48 ±19,58	0,90 ±0,04
Seq 4	43,29 ±6,94	84,37 ±12,02	51,26 ±2,08	0,90 ±0,05
Seq 5	38,10 ±7,17	64,82 ±7,41	46,53 ±8,09	0,85 ±0,14
Seq 6	51,32 ±8,68	90,43 ±22,13	48,08 ±13,44	0,70 ±0,27
Referência*	32,0 – 178,0	64,0 – 258,0	22,0 – 51,0	0,2 – 0,9

\* - valores de referência segundo Araújo (2012).

## 12.2 As formulações vacinais compostas pelas sequencias 2 a 6 induziram elevada imunogenicidade caracterizada pelo aumento no percentual de Linfócitos B e nos níveis de IgG antígeno-específicos

A avaliação geral da imunogenicidade foi realizada por contagem de leucócitos (Tabela 12), imunofenotipagem de leucócitos circulantes (Linfócitos T CD3<sup>+</sup>, linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, Linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e Linfócitos B CD19<sup>+</sup>) (Figura 13) e produção de anticorpos IgG específicos (Figura 14).

Na série leucocitária (Tabela 9) não foi observado diferenças estatisticamente significativas, bem como os valores estão dentro dos valores de referência estabelecidos por Araújo (2012).

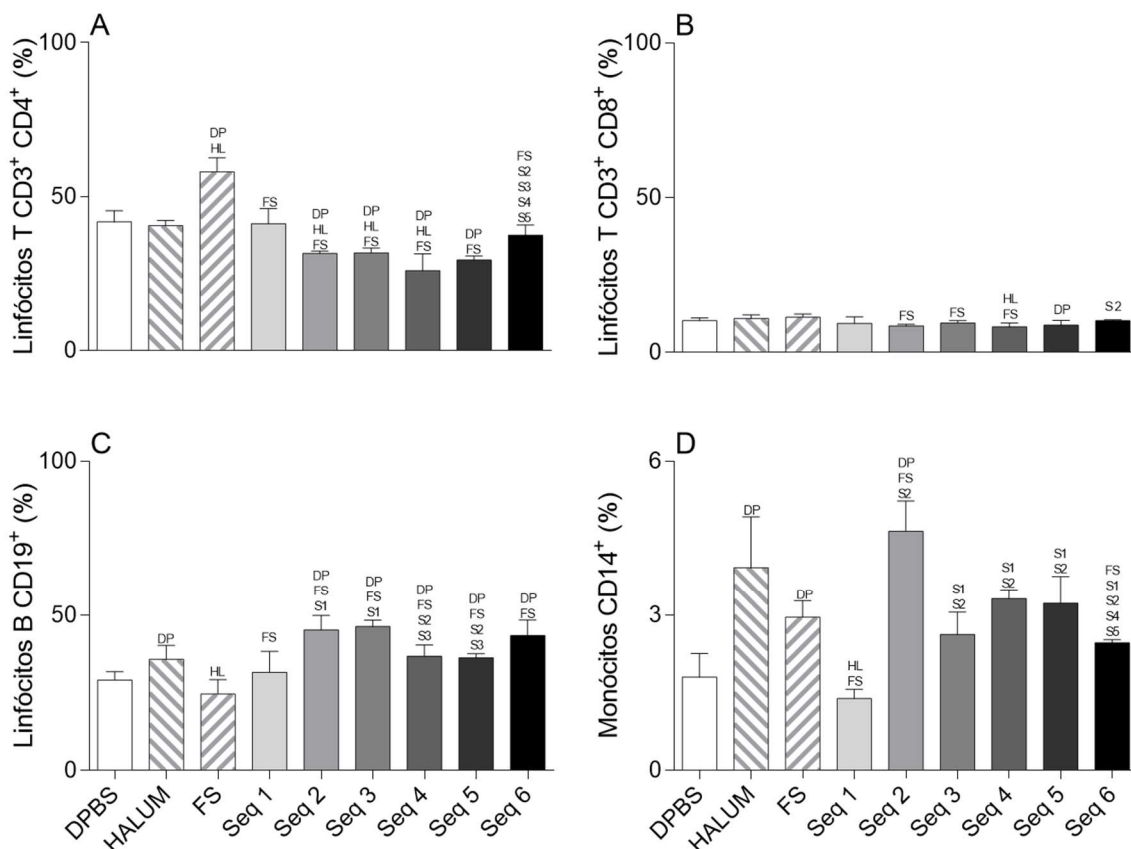
**Tabela 12. Leucograma de camundongos BALB/c imunizados com sequências 1 a 6.**

Grupo	Leucócitos totais (10 <sup>3</sup> mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (10 <sup>3</sup> mm <sup>3</sup> )	Neutrófilos (mm <sup>3</sup> )
DPBS	4230 ±258	3050 ±674	1266 ±512
HALUM	3851 ±1156	2894 ±774	1025 ±733
FS	4060 ±1163	2480 ±1244	1232 ±160
Seq 1	6420 ±2201	3603 ±617	1689 ±749
Seq 2	9240 ±1852	6100 ±1866	1900 ±400
Seq 3	3740 ±1500	2690 ±1094	1361 ±1114
Seq 4	4500 ±1574	3118 ±1174	1516 ±458
Seq 5	4233 ±2007	2726 ±1220	1484 ±776
Seq 6	4175 ±125	2896 ±566	2167 ±1174
Referência*	2000-5000	1200-4900	300-1200

\* - valores de referência segundo Araújo (2012).

As análises *ex vivo* de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, linfócitos B CD19<sup>+</sup> e monócitos CD14<sup>+</sup> foram realizadas para avaliar mudanças nos perfis de

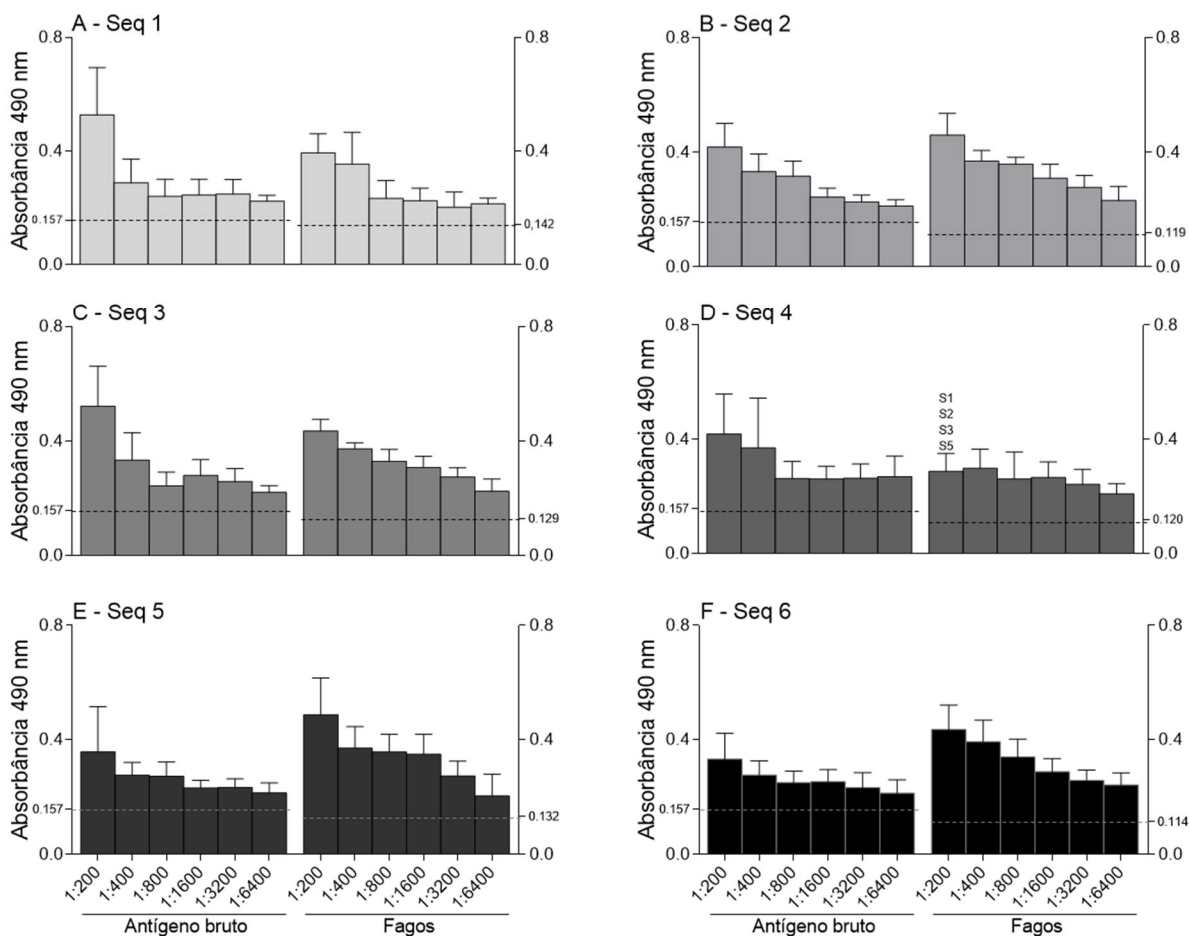
subpopulações de linfócitos totais e de monócitos. Foi observado que a frequência de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> no grupo FS foi maior que os detectados nos grupos DPBS, HALUM e Seq 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (Figura 13 – A). Os grupos Seq 2, 3, 4 e 5 apresentaram redução na população desses linfócitos em relação ao grupo DPBS, além do que, nos grupos Seq 2, 3, 4 os valores foram menores que no grupo HALUM. O percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> foi maior no grupo Seq 6 em relação aos grupos Seq 2, 3, 4 e 5. Na Figura 13 – B podemos observar que as sequências 2, 3 e 4 induziram menor percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> comparado aos induzidos pelo Fago Selvagem. A sequência 5 reduziu o a frequência desses linfócitos em relação ao HALUM, a sequência 6 induziu um menor percentual em relação ao observado no grupo DPBS. O grupo Seq 6 induziu menor frequência de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> comparado ao grupo Seq 2. Os dados presentes na Figura 13 – C mostram que o percentual de linfócitos B CD19<sup>+</sup> foi menor no grupo DPBS em relação aos grupos HALUM e, Seq 2, 3, 4, 5 e 6. O Fago Selvagem reduziu a frequência de linfócitos B CD19<sup>+</sup> em relação à induzida pelo Hidróxido de Alumínio e pelas sequencias 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Observamos também que as sequências 2 e 3 induziram a um elevado percentual de linfócitos B CD19<sup>+</sup> em relação aos induzidos pelas sequencias 1, 4 e 5 (Figura 13 – C). O percentual de monócitos induzido pela sequência 1 foi menor que os induzidos por Hidróxido de Alumínio, Fago Selvagem, Sequências 2, 3, 4, 5 e 6 (Figura 13 – D). A sequência 2 aumentou a frequência de monócitos em relação às sequências 3, 4, 5 e 6, por outro lado, a sequência 6 induziu menor percentual dessas células em relação aos induzidos por Fago Selvagem, sequências 4 e 5.



**Figura 13. Perfil imunofenotípico de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, linfócitos B CD19<sup>+</sup> e monócitos CD14<sup>+</sup> após imunização com as sequências 1-6.** As barras brancas representam os perfis induzidos nos animais do grupo controle DPBS; as barras brancas com padrão representam os perfis do grupo adjuvante Hidróxido de Alumínio (HALUM); as barras brancas com padrão representam os perfis do Fago Selvagem (FS); as barras , , , , e representam os grupos imunizados com a sequência 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente, associada ao adjuvante HALUM. Amostras de sangue foram obtidas para realizar o *ex vivo* após eutanásia dos animais para avaliar: Linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (A); Linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (B); Linfócitos B CD19<sup>+</sup> (C); Monócitos CD14<sup>+</sup>. Os dados estão apresentados em gráficos de barras, destacando a média e desvio padrão. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas siglas DP, HL, FS, S1, S2, S3, S4, S5 e S6 quando referentes aos grupos DPBS, HALUM, FS, Seq 1, Seq 2, Seq 3, Seq 4, Seq 5 e Seq 6, respectivamente.

Após eutanásia e coleta de sangue foi realizado o teste de ELISA para avaliar os níveis de anticorpos IgG induzidos pelo protocolo vacinal (Figura 14). Os resultados mostram que todas as sequências utilizadas no protocolo vacinal foram capazes de induzir IgG específicos para a sua respectiva sequência. Foi observado também que os IgGs específicos para cada sequência reconheceram proteínas da formulação RsSap. Foi observado que a sequência 4 apresentou menor indução à produção de IgG quando comparada à produção promovida pelas sequências 1, 2, 3 e 5. Além disso, titulou-se os anticorpos induzidos pelos grupos Seq 1-6 em diluições seriadas de 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 e 1:6400. Os resultados mostraram que as

formulações foram muito antigênicas, sendo possível observar a presença elevado título de anticorpos específicos, mesmo nas maiores diluições (Figura 19).



**Figura 14. Avaliação da resposta imune humoral em camundongos BALB/c imunizados com as sequências 1-6.** Camundongos BALB/c foram submetidos a coleta de soro 7 dias após o desafio com adultos de *R. sanguineus* para avaliação da produção e titulação dos anticorpos induzidos pela imunização com: sequência 1 (A); sequência 2 (B); sequência 3 (C); sequência 4 (D); sequência 5 (E); sequência 6 (F). Foram avaliadas diluições seriadas de 1:200 a 1:6400. Os dados estão apresentados em gráficos de barras, destacando a média e desvio padrão. O *cut off* (média mais duas vezes o desvio padrão da absorbância encontrada no grupo FS) está representado pela linha pontilhada. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas siglas S1, S2, S3 e S5 que são referentes aos grupos Seq1, Seq 2, Seq 3 e Seq 5.

### 12.3 Avaliação do potencial de interferência das sequências 1-6 no ciclo biológico de *R. sanguineus* após repasto sanguíneo em camundongos BALB/c

O impacto das sequências 1-6 no ciclo de vida de *R. sanguineus* após desafio em camundongos imunizados do grupo está representado na Figura 15 A-F. O peso das teleóginas após soltura mostrou que as fêmeas dos grupos Seq 1, 2, 3, 4, 5 e 6 apresentaram menor massa em relação às fêmeas que alimentadas nos grupos

DPBS, HAMUL e FS (Figura 15 – A). Também foi observado que as fêmeas do grupo Seq 1 tiveram maior peso que as fêmeas dos grupos Seq 2, 3, 5 e 6. A imunização com a sequência 2 levou as fêmeas a um peso maior que o peso induzido pelas sequências 3 e 5. Ao contrário, a sequência 4 induziu nas teleóginas uma maior massa em relação a sequência 2. As fêmeas do grupo Seq 3 apresentaram maior massa corporal em relação às fêmeas do grupo 5, porém, obtiveram menor peso em relação às teleóginas dos grupos Seq 4 e 6. No grupo Seq 4 podemos identificar que as fêmeas tiveram maior sucesso na ingestão de sangue que as fêmeas dos grupos Seq 5 e 6. Por vez, no grupo Seq 5 as fêmeas tiveram menor peso que as fêmeas do grupo Seq 6 (Figura 15 – A). Na Figura 15 – B está representado o percentual de fêmeas que vivas que realizaram a oviposição e o percentual de fêmeas que morreram sem ovipor. Observamos que 100% das fêmeas dos grupos DPBS, HALUM, FS e Seq 4 realizaram a oviposição. Nos grupos Seq 1, Seq 2, Seq 3 e Seq 6, 23%, 15%, 23% e 15% das morreram sem ovipor. No grupo Seq 5, 71% das fêmeas morreram sem ovipor. Essas fêmeas morreram secas, ainda na câmara de alimentação, sendo que ou iniciaram o repasto sanguíneo e fizeram a soltura prematura após o terceiro dia, ou continuaram fixas nos camundongos ao término do repasto, porém secas (Figura 16). A Figura 17 representa as variações de tamanho das teleóginas que realizaram a soltura nos diferentes grupos. A Figura 18 representa fêmeas em processo de alimentação no oitavo dia após início do repasto sanguíneo.

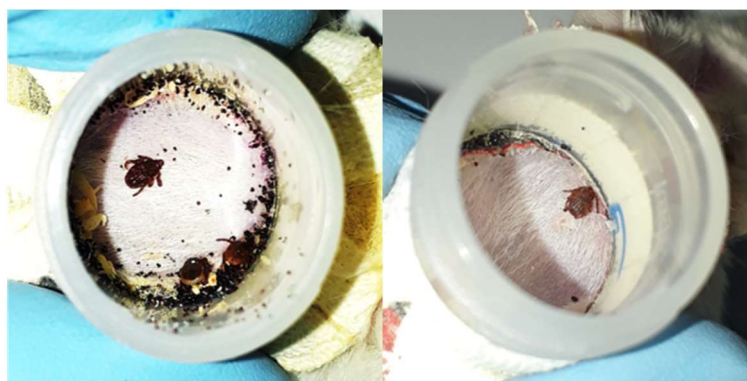
Nos gráficos C e D da Figura 15 estão representados os resultados referentes à pesagem e quantificação dos ovos. As diferenças observadas foram muito semelhantes ao peso das fêmeas. Foi observado redução no peso e número dos ovos dos grupos Seq 1-6 quando comparadas às fêmeas dos grupos DPBS, HALUM e FS. As fêmeas que realizaram repasto sanguíneo em camundongos imunizados com a sequência 1 colocaram mais ovos que às fêmeas dos grupos imunizados com as sequências 2, 3, 5 e 6. No grupo Seq 2 observamos que houve maior postura de ovos comparado à das fêmeas dos grupos 3 e 5, e menor postura comparado às fêmeas do grupo 4. No grupo imunizado com a sequência 3 a oviposição das fêmeas foi maior que a das fêmeas do grupo imunizado com a sequência 5, além de a postura dos ovos ser menor comparado à dos grupos imunizados com as sequências 4 e 6. No grupo Seq 5 observamos que a quantidade de ovos gerada foi menor que a observada nos grupos Seq 4 e 6 (Figura 15 – C e D). O Índice de Eficiência Reprodutiva mostra que as fêmeas dos grupos Seq 1, 2, 3, 4, 5 e 6 possuem pior *fitness* reprodutivo que as fêmeas dos grupos DPBS, HALUM, FS. As fêmeas dos grupos imunizados com as

sequências 1, 2 e 3 demonstraram melhor aptidão reprodutiva que as fêmeas dos grupos imunizados com as sequências 4 e 5. Além dessas diferenças observamos que as fêmeas do grupo Seq 5 apresentaram pior *fitness* reprodutivo em relação às dos grupos Seq 4 e 6 (Figura 15 – E). A avaliação do Índice Nutricional demonstrou ser menor nos grupos Seq 3, 4 e 5 em relação ao grupo DPBS (Figura 15 – F). Nos grupos DPBS, Seq 2, 3, 4, e 6 as fêmeas foram menos eficazes em converter o sangue em nutriente para os ovos em relação à capacidade das fêmeas dos grupos HALUM e FS. Nas fêmeas dos grupos imunizados com as sequências 1 e 2 o índice nutricional foi maior que nos grupos imunizados com as sequências 3, 4 e 5, apenas as fêmeas dos grupos Seq 1 tiveram IN maior que as do grupo Seq 6. Por sua vez, as fêmeas do grupo 6 foram mais eficazes na conversão de sangue em nutriente para os ovos comparado às fêmeas nos grupos Seq 5.



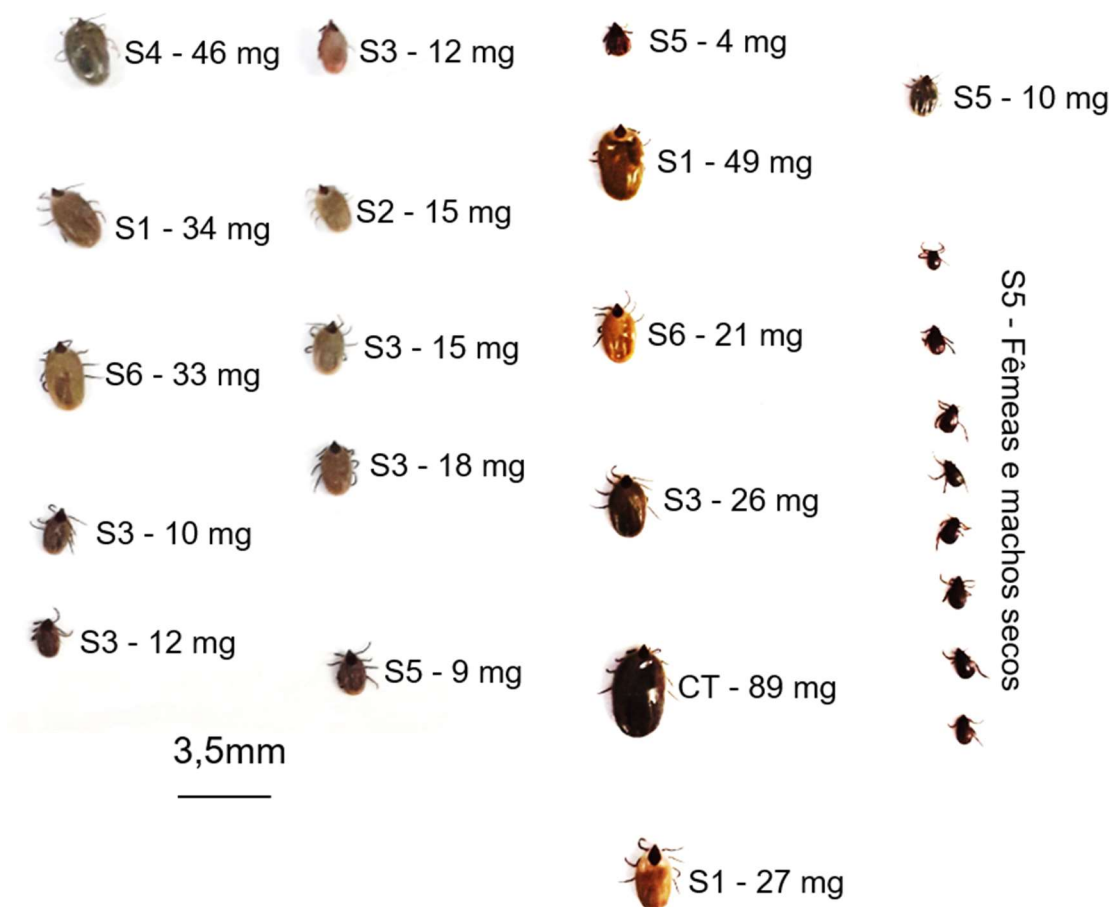


Fêmeas e machos secos que iniciaram o repasto e soltaram após o 5º dia de desafio



Fêmeas fixas seca do grupo seq 5 no 8º dia após início do desafio

**Figura 16. Fêmeas e machos secos após iniciarem o repasto sanguíneo.**



**Figura 17. Variação de tamanho das teleóginas que realizaram a soltura.**

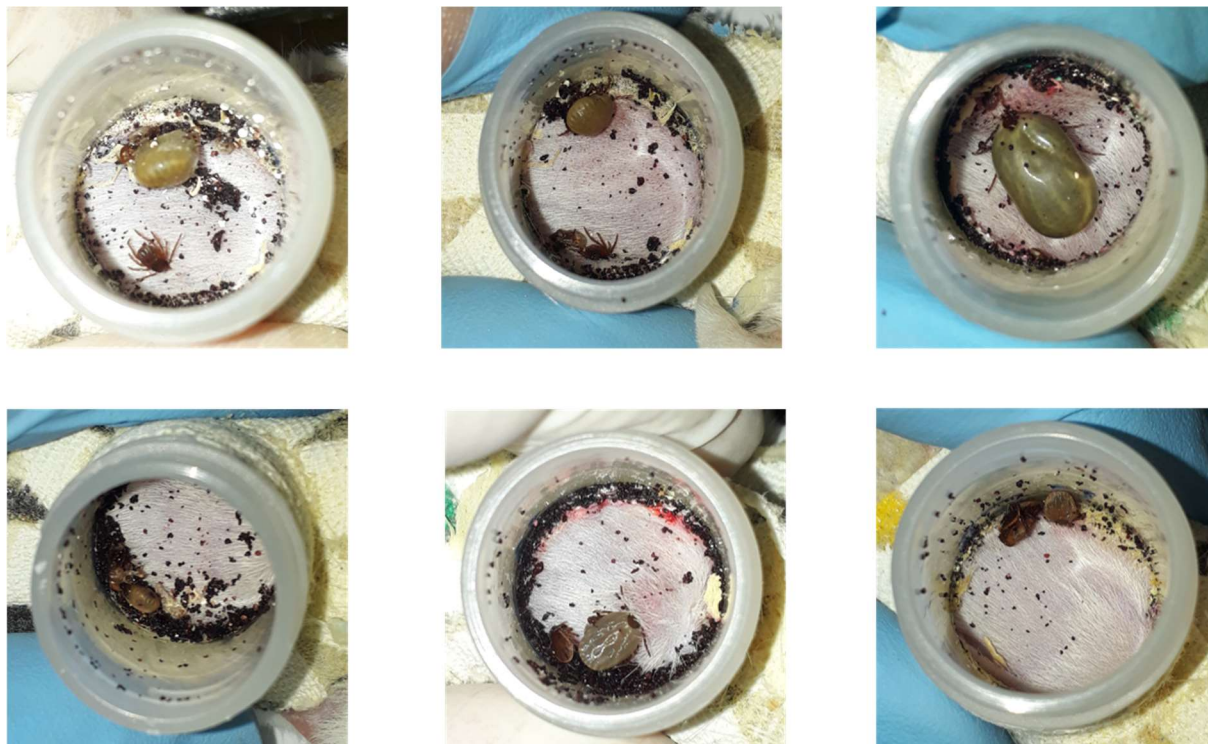
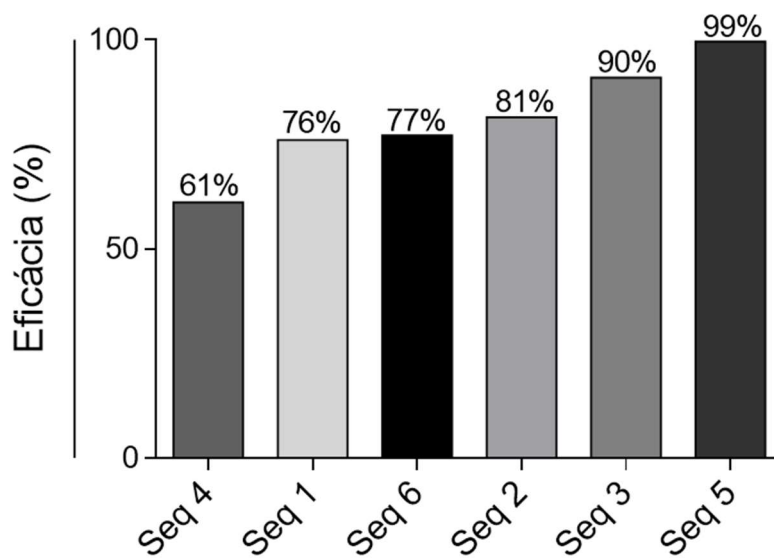


Figura 18. Representação de fêmeas durante o oitavo dia após início do desafio.

#### 12.4 Avaliação da eficácia vacinal das sequências 1 a 6

A Figura 19 representa a eficácia vacinal de cada sequência em interferir em aspectos biológicos de fêmeas de *R. sanguineus*. Os valores estão apresentados em ordem crescente de eficácia. Neste sentido, pode-se observar que todas as sequências apresentaram eficácia superior a 50%, sendo a sequência 4 (61%) a que apresentou menor eficácia e a sequência 5 (99%) a que apresentou maior eficácia.



**Figura 19. Eficácia das vacinas das sequências 1-6.** As barras □, □, □, □, □ e ■ representam os grupos imunizados com a sequência 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente, associada ao adjuvante HALUM. Os resultados estão apresentados em gráficos de barras destacando acima de cada barra o percentual de eficácia.

### 13. DISCUSSÃO

Semelhante ao que foi descrito no Capítulo I, a vacinação com as sequências 1-6 selecionados por *phage display* a partir de anticorpos IgG anti-RsSap, não causou reações no local do inóculo e não alterou o comportamento dos animais. Todos os camundongos ganharam peso ao longo do estudo, mostrando que os alvos não interferiram no apetite e no desenvolvimento natural dos animais. Os parâmetros eritrocíticos e leucocíticos permanecerem normais durante todo o protocolo vacinal, reforçando que os alvos não causaram distúrbios hematológicos. A adição do adjuvante Hidróxido de Alumínio teve como objetivo potencializar os efeitos dos fagos, uma vez que na literatura é descrito que os mesmos são agentes que agem com adjuvante (van Houten *et al.*, 2006). A atuação dos fagos se dá pela ativação tanto da resposta Th1 quanto Th2, e principalmente devido sua natureza são incorporados por células APC (Gaubin *et al.*, 2003), justificando o motivo de termos observado aumento no número de monócitos CD14<sup>+</sup> nos animais inoculados com Fago Selvagem. Em um estudo de nosso grupo, Rodrigues-Alves (2018 - dados não publicados) foi possível observar que a imunização de camundongos BALB/c com 8 sequências selecionadas por *phage display* a partir de antígenos de *A. aegypti*, induziu altos níveis de IgG específico para as sequências utilizadas. Nesse estudo foi observado a produção de altos níveis de IgG específico para cada sequência. Esse resultado também foi observado em outro trabalho do nosso grupo, no qual Leite (2017 – dados não publicados) imunizou camundongos BALB/c com alvos selecionados por *phage display*, com objetivo de avaliar o impacto dos anticorpos em aspectos biológicos e na infecção de *L. longipalpis* por *L. infantum*. Além da elevada produção de IgG específico pode-se observar também que houve aumento do número de linfócitos B CD19<sup>+</sup> nos grupos imunizados com as sequencias 1-6 e com HALUM, mostrando que o Hidróxido alumínio por si é um forte indutor da migração de linfócitos B CD19<sup>+</sup> para a corrente sanguínea, porem incapaz de induzir à produção de IgG específico quando administrado isoladamente. É importante ressaltar que, assim como descrito por Costa *et al.* (2015), Leite (2017 – dados não publicados) e Rodrigues-Alves (2018 – dados não publicados), o fago selvagem não induziu aumento de IgG antígeno-específica, garantindo que os anticorpos gerados são decorrentes exclusivamente do estímulo com as sequência 1-6. Baseado nesses resultados, concluímos que os animais vacinados permaneceram saudáveis durante todo o estudo, reforçando que os alvos S1-6 são formulações seguras, inócuas e antigênicas, visto que foram

capazes de induzir elevados níveis de IgGs antígeno-específicas. Considerando que a proposta vacinal deste estudo se baseia na produção de anticorpos anti-*R. sanguineus*, avaliamos o potencial de interferência dos alvos S1-6 nos aspectos biológicos do carrapato.

Diferentes grupos visam a busca por proteínas/ epítomos alvo que possam atuar no controle de insetos como *Aedes aegypti*, *Plodia Interpunctella*, *Plutella xylostella* e *Heliothis virescens*, por meio da técnica de *phage display* (Vílchez *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2015; Dominguez-Flores *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2018). No entanto, o maior desafio dessa estratégia é fazer com que os alvos selecionados sejam reconhecidos por seus receptores naturais (Vílchez *et al.*, 2004). Durante a esporulação, a bactéria *Bacillus thuringiensis* produz proteínas expressas como protoxinas (*Cry*) que atuam como inseticidas principalmente de insetos que afetam a agricultura. Quando ingeridas por larvas de insetos suscetíveis, as protoxinas são clivadas e ativadas por enzimas intestinais. Uma vez ativadas, são capazes de se ligar a moléculas receptoras presentes no epitélio intestinal do inseto e se inserir na membrana, formando poros que resultam em lise e conseqüentemente, na morte do inseto (Knowles e Ellar, 1987; Vachon *et al.*, 1995; Vílchez *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2008). Vílchez *et al.* (2004) realizaram um estudo pioneiro e mostraram a ligação de uma toxina *Cry* expressa no capsídeo de fagos  $\lambda$ , no intestino de *Manduca sexta*. Desde então, tem sido estudado o potencial inseticida de proteínas selecionadas por *phage display*. Em 2017, Domínguez-Flores *et al.* clonaram e selecionaram toxinas *Cry1Ac* ligadas a fagos  $\lambda$ . Após ciclos de *biopanning*, esses autores selecionaram os alvos de maior especificidade, e estes, foram capazes de se ligar a regiões específicas do intestino e induzir mortalidade em larvas de *A. aegypti*.

O processo de alimentação sanguínea dos carrapatos possui importância que vai além da produção de nutrientes para os ovos. Diretamente, durante o repasto, diversas modificações são observadas no intestino de fêmeas de *R. sanguineus*. Remedio *et al.* (2013) descreveram a existência de diferentes tipos celulares no intestino de fêmeas de *R. sanguineus* durante diferentes estágios de alimentação. Fêmeas em jejum apresentam em sua maioria células indiferenciadas e células digestivas residuais, entretanto, quando essas fêmeas estão parcialmente alimentadas ou repletas de sangue há a presença de células indiferenciadas, células digestivas pinocíticas, fagocíticas e maduras (Remedio *et al.* 2013). Diferentes autores demonstraram que a digestão do sangue ocorre dentro e fora da célula digestiva, e

que a presença de células secretoras seria no intuito de pré-digerir as células/ componentes do sangue, facilitando dessa forma a endocitose pelas células digestivas (Agbede & Kemp, 1985; Walker & Fletcher, 1987). Walker & Fletcher (1987) citaram que a digestão extracelular seria de importância nos momentos iniciais do repasto sanguíneo, de modo a selecionar os nutrientes mais importantes favorecendo ao rápido crescimento. Agyei e Runham (1995) sugeriram que a presença do sangue estimula mecânica e quimicamente as células indiferenciadas a se diferenciarem em células digestivas. Uma vez que haja distúrbio em alguma dessas populações, quer seja em células já desenvolvidas ou em células imaturas/ indiferenciadas pode se supor que algum impacto terá no indivíduo, durante ou após o repasto sanguíneo.

A alimentação sanguínea contendo anticorpos não é uma estratégia recente. Lackie & Gavin, 1989 mostraram que anticorpos anti-BSA de coelhos ingeridos durante o repasto sanguíneo atravessaram o epitélio intestinal e alcançaram a hemolinfa, onde permaneceram por 48h. Após esse período, os níveis de IgG diminuíram na hemolinfa, mas foram detectados na hemocele durante nove dias. Hatfield (1988) também descreveu a presença de anticorpos IgG anti-BSA de camundongos intactos na hemolinfa de *A. aegypti* até 48h após o repasto. No presente estudo, observamos diminuição significativa na quantidade de sangue ingerido por fêmeas alimentadas em camundongos vacinados com as sequências 1-6. Essa redução chegou a 53% para Seq 1, 70% para Seq 2, 77% para Seq 3, 37% para Seq 4, 90% para Seq 5 e 67% para Seq 6, quando comparado à médias dos grupos DPBS, HALUM e FS, além de 71% das fêmeas do grupo Seq 5 terem morrido ou não fizeram postura. Nesse ponto do presente estudo ficou evidente que a seleção de alvos/ epítomos por *phage display* e que são específicos para RsSap possuem um papel promissor em afetar as fêmeas nos momentos iniciais do repastado sanguíneo. A presença dos anticorpos pode ter afetado as células indiferenciadas, causando retardou no desenvolvimento ou células com reduzida capacidade em processar o sangue. Como era esperado, a redução no volume de sangue ingerido inibiu a oviposição em 58% para Seq 1, 74% para Seq 2, 84% para Seq 3, 40% para Seq 4, 90% para Seq 5 e 70% para Seq 6, relacionado à médias dos grupos DPBS, HALUM e FS. Outro ponto relevante foi a redução na capacidade das fêmeas alimentadas em camundongos imunizados com as sequências 1, 2, 3, 5 e 6 de converterem o sangue ingerido em massa ovos. As fêmeas dos grupos Seq 3 e Seq 5 se destacaram pela reduzida eficiência em converter sangue em nutrição para os ovos. Os efeitos observados pela imunização com as sequências são diferentes do induzido pela

imunização de camundongos BALB/c com RsSap, acreditamos que seja pela quantidade de diferentes antígenos presentes na formulação, de modo a potencializar os efeitos em fêmeas de *R. sanguineus*. As sequências 1-6 foram obtidas a partir das IgGs induzidas por RsSap, logo essas sequências estariam presentes na formulação RsSap. Opdebeeck *et al.* (1988) relatou uma redução de 91% na oviposição de *Rhipicephalus microplus* após alimentação em bovino previamente imunizados com uma formulação à base de proteínas de membrana do intestino médio do *R. microplus*. Esse mesmo estudo sugeriu que o uso de proteínas de membrana é mais eficaz, uma vez que observaram redução de apenas 33% na oviposição em carrapatos alimentados em bovinos imunizados com proteínas solúveis do intestino do artropode (Opdebeeck *et al.*, 1988). Vilela *et al.* (2006) avaliou a oviposição de fêmeas de *L. longipalpis* alimentadas em coelhos vacinados com intestinos de fêmeas alimentadas com açúcar e intestinos de fêmeas alimentadas com sangue, associados ao adjuvante de Freund. Os autores observaram redução da oviposição e diminuição da sobrevivência apenas em fêmeas alimentadas em coelhos vacinados com intestinos contendo sangue. Estudando a remodelação do epitélio intestinal e a substituição das células digestivas larvais durante a metamorfose, Fernandes *et al.* (2014) sugeriram que interferências no desenvolvimento normal do intestino médio pode reduzir a absorção e o armazenamento de nutrientes nas larvas, prejudicando a fertilidade dos adultos.

Devido à similaridade entre espécies de carrapato espera-se que esses efeitos possam se repetir para outras espécies de carrapato, como observado no trabalho realizado por de Vos *et al.*, (2001). Nesse estudo os autores imunizaram bezerros com TickGARD™ (contendo IgG anti-Bm86 obtida a partir de *R. microplus*) e seguiram para desafio com *R. microplus*, *B. decoloratus*, *H. dromedarii*, *R. apendiculastes*, *A. variegatum*. Para *R. microplus* observaram redução de 17% no peso das fêmeas e 74% no peso dos ovos, para *B. decoloratus* obtiveram redução de 26% e 70% no peso de fêmeas e ovos, respectivamente e para *H. dromedarii* reduziu em 78% o peso das fêmeas e em 91% o peso dos ovos. A imunização com TickGARD™ foi incapaz de afetar o peso das fêmeas de *R. apendiculastes* e *A. variegatum*, porém, para *R. apendiculastes* foi observado redução de 74% no peso de ovos. Fragosos *et al.* (1998) imunizaram bovinos com a vacina Gavac™ (contendo IgG anti-Bm86 obtida a partir de *R. microplus*) e seguiu para o desafio com duas linhagens de *B. annulatus*, “Quemado” (México) e “Fiasht-Fournan” (Irã) e observaram uma efetividade de 91% e 85% da vacina em fêmeas. Esses estudos reforçam a possibilidade de ação em

especiais que não são o alvo do produto desenvolvido, estudos para comprovar esse ponto são necessários após a obtenção do produto final.



## 14. CONCLUSÃO

Os protocolos de imunização com RsSap foram considerados seguros e inócuos quando administrados em camundongos BALB/c e cães, assim como a imunização com as sequências 1-6 identificadas pelo tecnologia *phage display* em camundongos BALB/c. Foi evidente a capacidade das formulações em reduziram significativamente a ingestão de sangue por fêmeas de *R. sanguineus*, bem como redução no número de ovos, sendo destacado que todas as sequências obtiveram eficácia superior a 60%. Com base nesses achados, destacam-se as sequências 3 e 5 com eficácia de 91% e 99%, respectivamente, em interferir em aspectos biológicos de *R. sanguineus*. Dessa forma, o presente estudo resultou na identificação de duas formulações vacinais que podem ser produzidas em larga escala pela indústria veterinária, dada a tecnologia utilizada e ao baixo custo de produção, e que apresentaram eficácia vacinal superior a 90%. Estes resultados apontam para a importância biotecnológica das formulações desenvolvidas e para a possibilidade de sua aplicação junto ao mercado veterinário de pequenos animais.

## 15. REFERÊNCIAS

ABINPET (*Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação*) (<http://abinpet.org.br/> - acessado em 25 de junho de 2019).

AGBEDE RI, KEMP DH. & HOYTE HM. Babesia bovis infection of secretory cells in the gut of the vector tick *Boophilus microplus*. *Int. J. Parasitol.* 16, 109–114 (1986).

AGBEDE RIS, KEMP DH. Digestion in the cattle-tick *Boophilus rneroplus* : light microscope study of the gut cells in nymphs and females. *Int. J. Parasitol.*, v. 15, no. 2, p. 147-157, 1985.

AGUIRRE ADE A, GARCIA MV, SZABÓ MP, BARROS JC, ANDREOTTI R. Formula to evaluate efficacy of vaccines and systemic substances against three-host ticks. *Int J Parasitol.* 2015 May;45(6):357-9.

AGYEI AD; RUNHAM NW. Studies on the morphological changes in the midguts of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v. 25, n. 1, p. 55–62, 1995.

ALA (*Atlas of Living Australia*) (<https://bie.ala.org.au/species/urn:lsid:biodiversity.org.au:afd.taxon:ea3c8bf5-04ae-4e17-9abb-30f254e805bc> – acessado em 25 de junho de 2019)

ARAMAN, SF. Protein digestion and synthesis in ixodid females. In: *Recent Advances in Aearology*, Vol. 1, Academic Press, New York, pp. 385—95 (1979).

ARAÚJO, FTM. Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ - Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório / FIOCRUZ (Dissertação – 2012, Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou.)

BECHARA, GH. *Rhipicephalus sanguineus* in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 4, n. 2, p. 61-66, (1995).

BECK Z, TORRES OB, MATYAS GR, LANAR DE, ALVING CR. Immune response to antigen adsorbed to aluminum hydroxide particles: Effects of co-adsorption of ALF or ALFQ adjuvant to the aluminum-antigen complex. *J Control Release.* 2018 Apr 10;275:12-19.

BELLATO, V e DAEMON, E. Influência da temperatura de manutenção de fase não parasitária sobre a fase parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 6, n.1, p 15-19, 1997.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida:Ixodidade) I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia*, v. 16, n. 1, p. 52-61 (1974).

BEN-YAKIR, D., J. C. FOX, J. T. HOMER, AND R.W.BARKER. 1986. Quantitative studies of host immunoglobulin G passage into the hemocoel of the ticks *Amblyomma americanum* and *Dermacentor variabilis*, pp. 329–341. In J. R. Sauer and J. A. Hair [eds.], *Morphology, physiology and behavioral biology of ticks*. Horwood, Chichester, England.

BOUCHARD KR, WIKEL SK. Care, maintenance, and experimental infestation of ticks in the laboratory setting. *Biology of Disease Vectors*. San Diego: Elsevier Academic Press; pp. 705–711 (2005).

BURAKOVA Y, MADERA R, MCVEY S, SCHLUP JR, SHI J. Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunol*. 2018; 31(1): 11-22.

BR1020130228052 - GIUNCHETTI, RC; BARTHOLOMEU, DC; GONTIJO, NF; MENDONCA, LZ; REIS, AB; CASTRO-BORGES, W; MARTINS-FILHO, OA; CORRÊA-OLIVEIRA, R. IMUNOBIOLOGICO PARA CONTROLE DO VETOR DA LEISHMANIOSE E SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO (Protocolo INPI nºBR1020130228052). 2013, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020130228052, título: "imunobiológico para controle do vetor da leishmaniose e seu processo de obtenção (Protocolo INPI nºBR1020130228052)", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 06/09/2013.

BR1020140220275 - GIUNCHETTI RC; MENDONCA, LZ; REIS, AB; BARTHOLOMEU, DC; GONTIJO, NF; CASTRO-BORGES, W; CORREA-OLIVEIRA, R; MARTINS-FILHO, OA. Imunobiológico para o controle do vetor da leishmaniose, processos de obtenção e usos. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140220275, título: "Imunobiológico para o controle do vetor da leishmaniose, processos de obtenção e usos", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 05/09/2014.

BR1020170229041 - GIUNCHETTI, RC; LEITE, JC; SILVEIRA, P; SILVEIRA-LEMOS, D; FUJIWARA, RICARDO T; BARTHOLOMEU, DC; GONTIJO, NF. Peptídeos, vacinas para controle de flebotomíneos e usos. 2017, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020170229041, título: "peptídeos, vacinas para controle de flebotomíneos e usos", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 24/10/2017.

BR1020170229068 - GIUNCHETTI, RC; LEITE, JC; SILVEIRA, P; SILVEIRA-LEMOS, D; FUJIWARA, RICARDO T; BARTHOLOMEU, DC; GONTIJO, NF. Peptídeos, vacinas para controle de flebotomíneos e usos. 2017, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020170229041, título: "PEPTÍDEOS, VACINAS PARA CONTROLE DE FLEBOTOMÍNEOS E USOS", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 24/10/2017.

BR1020170229033 - GIUNCHETTI, RC; LEITE, JC; SILVEIRA, P; SILVEIRA-LEMOS, D; FUJIWARA, RICARDO T; BARTHOLOMEU, DC; GONTIJO, NF. Peptídeos, vacinas para controle de flebotomíneos e usos. 2017, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020170229041, título: "PEPTÍDEOS, VACINAS PARA CONTROLE DE FLEBOTOMÍNEOS E USOS", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 24/10/2017.

BR1020170278859 - GIUNCHETTI, RC.; ALVES, MLR; DUTRA, WO ; FUJIWARA, RT; BARTHOLOMEU, DC; GONTIJO, NF; PEREIRA, MH; SANTANNA, MRV. ; ARAUJO, RN; MOREIRA, LA; CORRÊA-OLIVEIRA, R; SILVEIRA-LEMOS, D; HO, PL. Composição vacinal contendo extrato bruto de proteínas intestinais de mosquito e processo de obtenção. 2017, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020170278859, título: "COMPOSIÇÃO VACINAL CONTENDO EXTRATO BRUTO DE PROTEÍNAS INTESTINAIS DE MOSQUITO E PROCESSO

DE OBTENÇÃO", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 22/12/2017.

BR1020190103329 - GIUNCHETTI, RC; ALVES, MLR; SILVEIRA, P; LEITE, JC; FUJIWARA, RICARDO T; FERREIRA, N; MELO-JUNIOR, OAO; RESENDE, LA; DUTRA, W O; CORRÊA-OLIVEIRA, R; MOREIRA, LA; SILVEIRA-LEMONS, D. Peptídeo recombinante, composição vacinal para controle de aedes aegypti, e usos. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020190103329, título: "PEPTÍDEO RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO VACINAL PARA CONTROLE DE AEDES AEGYPTI, E USOS", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 21/05/2019.

CHANG J, PENG H, SHAFFER BC, BASKAR S, WECKEN IC, CYR MG, MARTINEZ GJ, SODEN J, FREETH J, WIESTNER A, RADER C. Siglec-6 on chronic lymphocytic leukemia cells is a target for post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation antibodies. *Cancer Immunol Res.* 2018; 7:6.

COONS LB, LAMOREAUX WJ, ROSELL-DAVIS R. & TARNOWSKI BI. Onset of vitellogenin production and vitellogenesis, and their relationship to changes in the midgut epithelium and oocytes in the tick *Dermacentor variabilis*. *Exp. Appl. Acarol.* 6, 291–305 (1989).

COSTA LE, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, MARTINS VT, *et al.* Phage-fused epitopes from *Leishmania infantum* used as immunogenic vaccines confer partial protection against *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology.* 2015; 142: 1335–1347.

COSTA LE, GOULART LR, PEREIRA NC, *et al.* Mimotope-based vaccines of *Leishmania infantum* antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. *PLoS One.* 2014; 15;9(10): e110014.

DE LA FUENTE J, KOCAN K. M. Development of Vaccines for Control of Tick Infestations and Interruption of Pathogen Transmission. In: *Biology of Ticks*. 2nd Edition. Sonenshine D, Roe M, Eds Oxford University Press; Newyork (2014).

DE LA FUENTE J, ALMAZÁN C, BLAS-MACHADO U, NARANJO V, MANGOLD AJ, BLOUIN EF, GORTAZAR C, KOCAN KM. The tickprotectiveantigen,4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick blood ingestion and reproduction. *Vaccine* 24, 4082–4095 (2006a).

DE LA FUENTE, J. ALMAZÁN, C. BLOUIN, E. F. NARANJO, V. & KOCAN, K. M. Reductionof tick infectionswith *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* by targeting the tick protective antigen subolesin. *Parasitol.Res.* 100, 85–91 (2006b).

DE LA FUENTE J, ALMAZÁN C, CANALES M, PÉREZ DE LA LASTRA JM, KOCAN KM, WILLADSEN P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res Rev* 2007; 8(1): 23-28.

DE VOS S, ZEINSTRAL, TAOUFIK O, WILLADSEN P, JONGEJAN F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Exp Appl Acarol.* 001;25(3):245-61.

Demma, L. J. *et al.* Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *N Engl J Med.* 11;353(6):587-94 (2005).

- DENG L, IBAÑEZ LI, VAN DEN BOSSCHE V, *et al.* Protection against Influenza A Virus Challenge with M2e-Displaying Filamentous Escherichia coli Phages. *PLoS One*. 2015; 14;10(5): e0126650.
- DIEHL PA, AESCHLIMANN A. & OBENCHAIN FD. Tick reproduction: oogenesis and oviposition. In F.D. Obenchain and R. Galun (Eds.), *Physiology of Ticks*. New York: Pergamon Press, 277–350 (1982).
- DOMÍNGUEZ-FLORES T, ROMERO-BOSQUET MD, GANTIVA-DÍAZ DM, *et al.* Using phage display technology to obtain Crybodies active against non-target insects. *Sci Rep*. 2017; 2; 7(1): 14922.
- EIDEN AL, KAUFMAN PE, OI FM, ALLAN SA, MILLER RJ. Detection of Permethrin Resistance and Fipronil Tolerance in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the United States. *J Med Entomol*. 2015 May;52(3):429-36.
- EIDEN AL, KAUFMAN PE., ALLAN SA. & OI F. Establishing the discriminating concentration for permethrin and fipronil resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae), the brown dog tick. *Pest Manag. Sci.* (2016).
- EIDEN AL, KAUFMAN PE, OI FM, DARK MJ, BLOOMQUIST JR, MILLER RJ. Determination of metabolic resistance mechanisms in pyrethroid-resistant and fipronil-tolerant brown dog ticks. *Med. Vet. Entomol*. 31, 243–251 (2017).
- ELVIN CM, KEMP DH. Generic approaches to obtaining efficacious antigens from vector arthropods. *Int J Parasitol*. 24(1):67-79 (1994).
- FELDMAN-MUHSAM B, BORUT S. Copulation in ixodid ticks. *J Parasitol*., 57:630-634 (1971).
- FERNANDES KM, NEVES CA, SERRÃO JE, *et al.* *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitol Int*. 2014; 63(3): 506-12.
- FERNÁNDEZ LE, PÉREZ C, SEGOVIA L, *et al.* Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop alpha-8 of domain II. *FEBS Lett*. 2005; 4; 579(17): 3508-14.
- FERNÁNDEZ LE, GÓMEZ I, PACHECO S. Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Peptides*. 2008; 29(2): 324–329.
- FERRIERES, G., VILLARD, S., PUGNIERE, M., MANI, J.-C., NAVARRO-TEULON, I., RHARBAOUI, F., LAUNE, D., LORET, E., PAU, B., GRANIER, C., 2000. Affinity for the cognate monoclonal antibody of synthetic peptides derived from selection by phage display. *Eur. J. Biochem* 267, 1819–1829.
- FERROLHO J, ANTUNES S, SANCHES GS, COUTO J, ÉVORA PM, ROSA C, ANDRÉ MR, MACHADO RZ, BECHARA GH, DOMINGOS A. Ferritin 1 silencing effect in *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) during experimental infection with *Ehrlichia canis*. *Ticks Tick. Borne. Dis*. 8, 174–184 (2017).
- FLECHTMANN CH. W. *Ácaros de importância médico-veterinária*. Livraria Nobel S.A., São Paulo, (1973).
- FOLGORI A, TAFI R, MEOLA A, FELICI F, GALFRE G, CORTESE R, MONACI P AND NICOSIA A (1994) A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J* 13:2236-2243.

FRAGOSO H, RAD PH, ORTIZ M, RODRÍGUEZ M, REDONDO M, HERRERA L, DE LA FUENTE J. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *off. Vaccine*. 1998 Dec;16(20):1990-2.

GALAY RL, AUNG KM, UMEMIYA-SHIRAFUJI R, MAEDA H, MATSUO T, KAWAGUCHI H, MIYOSHI N, SUZUKI H, XUAN X, MOCHIZUKI M, FUJISAKI K, TANAKA T. Multiple ferritins are vital to successful blood feeding and reproduction of the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *J Exp Biol*. 2013 May 15;216(Pt 10):1905-15.

GALAY RL, MIYATA T, UMEMIYA-SHIRAFUJI R, MAEDA H, KUSAKISAKO K, TSUJI N, MOCHIZUKI M, FUJISAKI K, TANAKA T. Evaluation and comparison of the potential of two ferritins as anti-tick vaccines against *Haemaphysalis longicornis*. *Parasit Vectors*. 2014 Oct 12;7:482.

GAUBIN M, FANUTTI C, MISHAL Z, DURRBACH A, DE BERARDINIS P, SARTORIUS R, DEL POZZO G, GUARDIOLA J, PERHAM RN, PIATIER-TONNEAU D. Processing filamentous bacteriophage virions in antigen-presenting cells targets both HLA class I and class II peptide loading compartments. *DNA Cell Biol*. 2003;22(1):11–8.

GBIF (*Global Biodiversity Information Facility*)  
(<https://www.gbif.org/pt/species/109435413> - acessado em 25 de junho de 2019)

GODDARD, J. Ticks of medical importance occurring in the western hemisphere. Texas: USAF School of Aerospace Medicine, (1987).

GONZÁLEZ, A., CASTRO, D. D. C. & GONZÁLEZ, S. Ectoparasitic species from *Canis familiaris* (Linné) in Buenos Aires province, Argentina. *Vet. Parasitol.* 120, 123–129 (2004).

GRZEDA, E. *et al.* Effects of acaricide treatment and host intrinsic factors on tick acquisition and mortality in Boran cattle. *Parasitol. Res.* (2017).

GUERRERO, F. D., MILLER, R. J. & PÉREZ DE LEÓN, A. A. Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *Int. J. Parasitol.* 42, 421–427 (2012).

HADANI A. RECHAV Y. Tick-host relationships. 1. The existence of a circadian rhythm of "drop-off" of engorged ticks from their hosts. *Acta Trop.* 26(2):173-9 (1969).

HADI UK. & ADVENTINI M. Fecundity, Oviposition and Egg Incubation Period of Female *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Acari: Ixodidae) Ticks in Indonesia. *J Vet Med Res* 2(5): 1036 (2015).

HAJDUSEK, O. *et al.* Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1033–1038 (2009).

HATFIELD PR. Anti-mosquito antibodies and their effects on feeding, fecundity and mortality of *Aedes aegypti*. *Med Vet Entomol.* 1988; 2(4): 331-8.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and Nuttalliellid Ticks as Parasites and Vectors. *Adv. Parasitol.* 24, 135-238 (1985).

IBGE - População de Animais de Estimação no Brasil – 2013  
(<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/> documentos)

/camaras-tematicas/insumos-agropecuarios/anos-anteriores/ibge-populacao-de-animais-de-estimacao-no-brasil-2013-abinpet-79.pdf/view - acessado em 25 de junho de 2019)

INOKUMA H, TAMURA K, ONISHI T. Seasonal occurrence of *Rhipicephalus sanguineus* in Okayama Prefecture, Japan and effect of temperature on development of the tick. *J Vet Med Sci.* 1996 Mar;58(3):225-8.

JACOBS PAH. et al. Diversity, seasonality and sites of attachment of adults ticks on dogs in the central region of the Free State Province , South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v.68, n.4, p.281-290, 2001.

JITTAPALAPONG, S. STICH, R. W. GORDON, J. C. WITTUM, T. E. BARRIGA, O. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. *J Med Entomol.* 37(4):601-11 (2000).

JO G, JEONG MS, WI J, et al. Generation and characterization of a neutralizing human monoclonal antibody to hepatitis B virus preS1 from *phage*-displayed human synthetic Fab library. *J Microbiol Biotechnol.* 2018; 5; 25.

JOHNSTON LA., KEMP DH, PEARSON, RD, 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on tick populations. *Int. J. Parasitol.* 16, 27-34.

JONGEJAN F, UILENBERG G. The global importance of ticks. *Parasitology.*129 Suppl:S3-14. R (2004)

Jonsson NN. et al. Evaluation of tickGARD(PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Vet Parasitol.* 1;88(3-4):275-85 (2000).

KITOKA, S. Physiological and ecological studies on some ticks. V. Nitrogen and iron excretion and amount of blood meal ingested during the blood sucking process in the tick. *Nat. Inst. Anim. Health Quart.* 1: 96-104 (1961).

KNOWLES BH E ELLAR DJ. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*-endotoxins with different insect specificity. *Biochim Biophys Acta.* 1987; 924: 509–518.

KOCH HG. TUCK MD. Molting and survival of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) under different temperatures and humidities. *Annals of the Entomological Society of America*, Lanham, v. 79, n. 1, p. 11-14, (1986).

KOCH HG. Oviposition of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) in the laboratory. *Ann Entomol Soc Am*, 75:583-586 (1982)

KOSHY TJ. RAJAVELU G. LALITHA C. M. On the life cycle of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Cheiron*, v. 12, n. 6, p. 337-338 (1983).

LABRUNA MB. PEREIRA MC. Carrapato em cães no Brasil. *Clín Vet*, São Paulo, v.30, p.24-32. (2001).

LABRUNA MB. Biologica-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 13, 123–124 (2004).

LACKIE, AM, GAVIN, S.. Uptake and persistence of ingested antibody in the mosquito *Anopheles stephensi*. *Med. Vet. Entomol.* 3, 225–230 (1989)

LARA FA. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Exp. Biol.* 208, 3093–3101 (2005).

LOULY CCB, FONSECAI IN; OLIVEIRA VF; LINHARES GFC; MENEZES LB; BORGES LMF. Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs from a police unit in Goiânia, Goiás, Brazil. *Cienc. Rural* [online]., vol.37, n.2 (2007).

LU H, REN Q, LI Y, LIU J, NIU Q, YIN H, MENG Q, GUAN G, LUO J. The efficacies of 5 insecticides against hard ticks *Hyalomma asiaticum*, *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Exp Parasitol.* 2015 Oct;157:44-7.

MARCELINO, I. *et al.* Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccines. *J. Proteomics* 75, 4232–4250 (2012).

MARCONDES, C. B. Doenças transmitidas e causadas por artrópodes. 93, 580 (2009).

MATSUMOTO, K. BROUQUI, P. RAOULT, D. PAROLA, P. Experimental infection models of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group with *Rickettsia conorii*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* Winter;5(4):363-72 (2005).

NAGAO T, HIROKAWA M. Diagnosis and treatment of macrocytic anemias in adults. *J Gen Fam Med.* 2017 Apr 13;18(5):200-204. OLIVER JH. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annu Ver Ecol Syst.* 20:397-430 (1989).

OPDEBEECK JP, WONG JYM, JACKSON LA, *et al.* Vaccines to Hereford cattle against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Immunology.* 1988; 63: 363-367.

Palmas C, *et al.* Study on immunobiology in ectoparasites of public health interest: *Rhipicephalus sanguineus*. *Parassitologia.* Dec;43 Suppl 1:29-35 (2001).

Parizi LF. *et al.* The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. *Vet. J.* 194, 158–165 (2012).

PARMLEY SF E SMITH GP. Antibody-selectable filamentous fd *Phage* vectors: affinity purification of target genes. *Genes.* 1988; 73:305-318.

PAZ GF, LABRUNA MB. & LEITE RC. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de cães artificialmente infestados. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 139–144 (2008).

PEGRAM RG, CLIFFORD CM. WALKER JB. KEIRANS JE. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. *Systematic Parasitology, Netherlands*, v. 10, n. 1, p. 27-44, (1987).

PETBRASIL (<http://www.petbrasil.org.br/mercado-brasileiro> - acesso em 25 de junho de 2019).

PETROVA-PIONTKOVSKAYA SP. Comparative data on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* Latr. and *Rhipicephalus turanicus* Pom. under laboratory conditions. *Zoologicheskii Zhurnal, Moscow*, v. 25, n. 2, p. 173-176, (1947).



RADWAŃSKA MJ, JASKÓŁOWSKI M, DAVYDOVA E, *et al.* The structure of the C-terminal domain of the nucleoprotein from the Bundibugyo strain of the Ebola virus in complex with a pan-specific synthetic Fab. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 2018; 1;74(Pt 7): 681-689.

RECHAV, Y. NUTTALL, P. A. The effect of male ticks on the feeding performance of immature stages of *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma americanum* (Acari:Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* (7):569-78 (2000)

Remedio, R. N. *et al.* Morphology of the midgut of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) adult ticks in different feeding stages. *Parasitol. Res.* 112, 415–425 (2013).

RODRIGUES-ALVES ML IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE ALVOS ANTIGÊNICOS PARA COMPOR A PRIMEIRA VACINA CONTRA O *Aedes aegypti* (Tese- 2018, Universidade Federal de Minas Gerais)

RODRIGUEZ-VIVAS, RI, OJEDA-CHI MM, TRINIDAD-MARTINEZ I & PÉREZ DE LEÓN AA. First documentation of ivermectin resistance in *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* (2017a).

RODRIGUEZ-VIVAS, RI, OJEDA-CHI MM, TRINIDAD-MARTINEZ I & BOLIO-GONZÁLEZ ME. First report of amitraz and cypermethrin resistance in *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* infesting dogs in Mexico. *Med. Vet. Entomol.* (2017b).

RODRÍGUEZ, M. *et al.* Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet. Parasitol.* 57, 339–349 (1995).

SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLENK DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76-85.

SOARES TS, RODRIGUEZ GONZALEZ BL, TORQUATO RJS, *et al.* Functional characterization of a serine protease inhibitor modulated in the infection of the *Aedes aegypti* with dengue virus. *Biochimie.* 2018; 144: 160-168.

SOARES TS, TORQUATO RJS, ALVES LEMOS FJ, *et al.* Selective inhibitors of digestive enzymes from *Aedes aegypti* larvae identified by phage display. *Insect Biochem Mol Biol.* 2013; 43(1): 9-16.

SOARES TS, TORQUATO RJS, GONZALEZ YG, *et al.* Production of serine protease inhibitors by mutagenesis and their effects on the mortality of *Aedes aegypti* L. larvae. *Parasit Vectors.* 2015; 8: 511.

SOARES TS, WATANABE RM, LEMOS FJ, *et al.* Molecular characterization of genes encoding trypsin-like enzymes from *Aedes aegypti* larvae and identification of digestive enzymes. *Gene.* 2011; 10; 489(2): 70-5.

SONENSHINE DE. *Biology of Ticks.* Oxford University Press, New York (1991).

SRIVASTAVA SC. VARMA MGR. The culture of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Ixodidae) in the laboratory. *J Med Entomol,* 1:154-157 (1964).

SWEATMAN GK. Physical and biological factors affecting the longevity and oviposition of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks. *J Parasitol.* 53(2):432-45 (1967).

SZABÓ MP & BECHARA GH. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. *Exp Appl Acarol.* (11):915-28 (1999).

SZABÓ MP., MARQUEZ CUNHA T, PINTER A & VICENTINI F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. *Exp. Appl. Acarol.* 25, 909–916 (2001).

TROUGHTON, D. R. LEVIN, M. L. Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. *J Med Entomol.* 44(5):732-40 (2007)

VACHON VMJ, PARADIS M, MARSOLAIS JL, *et al.* Ionic permeabilities induced by *Bacillus thuringiensis* in Sf9 cells. *J Membr Biol.* 1995; 148: 57–63.

VALLE MR, MÈNDEZ L, VALDEZ M, REDONDO M, ESPINOSA CM, VARGAS M, CRUZ RL, BARRIOS HP, SEOANE G, RAMIREZ ES, BOUE O, VIGIL JL, MACHADO H, NORDELO CB, PIÑEIRO MJ. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac. *Exp Appl Acarol.* 2004;34(3-4):375-82.

VAN HOUTEN NE, ZWICK MB, MENENDEZ A, SCOTT JK. Filamentous phage as a immunogenic carrier to elicit focused antibody responses against a synthetic peptide. *Vaccine.* 2006;24(19):4188–200.

VÍLCHEZ S, JACOBY J, ELLAR DJ. Display of biologically functional insecticidal toxin on the surface of lambda phage. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(11): 6587-94.

VILELA ML, SOUZA NA, OLIVEIRA SM, *et al.* Considerations on the effect of anti-sandfly antibodies on biological parameters of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Braz J Biol.* 2006; 66(1A): 175-83.

WALKER AR; FLETCHER JD. Histology of digestion in nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* fed on rabbits and cattle naive and resistant to the ticks. *International Journal for Parasitology, Oxford*, v. 17, n. 8, p. 1393–1411, 1987.

WALKER JB. KEIRANS JE, HORAK IG. The Genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae). A Guide to the Brown Ticks of the World. Cambridge University Press, London, (2000).

WANG H, AND NUTTALL PA. 1994. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* 109: 525D530.

WEISS BL & REUBEN KAUFMAN W. The relationship between 'critical weight' and 20-hydroxyecdysone in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *J. Insect Physiol.* 47, 1261–1267 (2001).

WEISS BL. & KAUFMAN WR. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5874–9 (2004).

WILLADSEN P, MCKENNA RV, RIDING GA. 1988. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *Int. J. Parasitol.* 18, 183-189.

WINDSOR IW e RAINES RT. A substrate selected by *phage display* exhibits enhanced side-chain hydrogen bonding to HIV-1 protease. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 2018; 1;74(Pt 7): 690-694.

YODER, J. A. *et al.* Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, *Rhipicephalus sanguineus*. *Medical and Veterinary Entomology*, London, v. 20, n. 4, p. 365-372, (2006).

ZANGANEH S, ROUHANI NEJAD H, MEHRABADI JF, *et al.* Rapid and Sensitive Detection of Staphylococcal Enterotoxin B by Recombinant Nanobody Using *Phage display* Technology. *Appl Biochem Biotechnol.* 2018; 7: 9.

## 16. ANEXOS

### 16.1 Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais 389/ 2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

#### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 389 / 2015, relativo ao projeto intitulado “Desenvolvimento tecnológico aplicado a identificação e seleção de alvos vacinais para atuar no controle do carrapato marrom de cães”, que tem como responsável Rodolfo Cordeiro Giunchetti, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 09/12/2015. Este certificado espira-se em 09/12/2020.

#### **CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 389 / 2015, related to the Project entitled “Technological development applied to identification and selection of vaccinal targets to act to control the brown dog tick”, under the supervision of RodolfoCordeiro Giunchetti, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 09/12/2015. This certificates expires in 09/12/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
 Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
 Belo Horizonte, 09/12/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG  
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## 16.2 Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais 95/ 2017



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:** 95/2017

**Título do projeto:** Elaboração de uma vacina multicomponente anti-carrapatos para cães

**Finalidade:** Pesquisa

**Pesquisador responsável:** Ricardo Toshio Fujiwara

**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas

**Departamento:** Departamento de Parasitologia

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

Aprovado na reunião do dia 22/05/2017. Validade: 22/05/2017 à 21/05/2022

Belo Horizonte, 23/05/2017.

## 16.3 Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais 95/ 2017



20/12/2018 870180165685  
11:58  
  
29409161811979024

## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 076657 0

### Dados do Depositante (71)

---

#### Depositante 1 de 2

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 17217985000104

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:** 31270-901

**País:** Brasil

**Telefone:** (31) 3409-6430

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

---

### **PETICIONAMENTO ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 20/12/2018 às 11:58, Petição 870180165685

Petição 870180165685, de 20/12/2018, pág. 1/34