

RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE BOVINOS VACINADOS COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE Ra92A DE *Rhipicephalus appendiculatus* EXPRESSA EM *Pichia pastoris*

DIEGO FEIJÓ POLVORA¹; RENATO ANDREOTTI²; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS¹; RODRIGO CASQUERO CUNHA¹; MARGARET SAIMO-KAHWA³; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – dfpolvora@gmail.com

²Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS-Brasil

³Universidade Makerere, Kampala-Uganda

⁴Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

1. INTRODUÇÃO

O ectoparasitismo causado por carrapatos e as doenças transmitidas por estes reduzem a produtividade dos animais. Estas reduções impactam na economia de um país, como é relatado por GRISI et al. (2014). A bovinocultura leiteira em Uganda (África) é uma das mais importantes atividades para economia e desenvolvimento do país. Problemas como a infestação por carrapatos, como *Rhipicephalus appendiculatus*, afetam diretamente a produção leiteira do país (NDAMBI et al., 2008).

O uso de vacinas destaca-se como uma ferramenta para o controle do carrapato. As pesquisas com alvos proteicos como imunógenos vacinais são crescentes e visam o desenvolvimento de imunógenos para o controle destes parasitas (CUNHA et al., 2013). A proteína Ra92A encontrada no intestino de *R. appendiculatus* é um alvo potencial como antígeno vacinal contra o carrapato (SAIMO et al., 2011).

As imunoglobulinas são glicoproteínas, altamente diversificadas e específicas na sua capacidade de reconhecer antígenos. A Imunoglobulina G (IgG) é encontrada em maior concentração no sangue, sendo a principal imunoglobulina associada com mecanismos de defesa humoral. Os bovinos apresentam 3 isotipos de IgG: IgG1; IgG2 e IgG3. A expressão de IgG1 é regulada pela interleucina 4 e a expressão de IgG2 é regulada pelo interferon gama. Os níveis de IgG1 e IgG2 estão relacionados, respectivamente, com o desenvolvimento de respostas imunes mediadas por linfócitos Th2 e Th1 (TIZARD, 2008). O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune humoral de bovinos vacinados com a proteína recombinante Ra92A de *R. appendiculatus* expressa na levedura *Pichia pastoris*.

2. METODOLOGIA

Para realização deste trabalho, o gene da proteína Ra92A foi sintetizado em códons usuais de *P. pastoris*. A rRa92A foi expressa e purificada conforme protocolos do manual do kit EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen), para expressão extracelular em clones Mut⁺.

Foram utilizados quatro bovinos da raça holandesa estabulados e mantidos na Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. Os animais foram vacinados com 200 µg de rRa92A em emulsão com o adjuvante Montanide ISA 61 VG (Seppic) em um volume de 2 mL/dose, e receberam duas doses da vacina pela via intra-muscular, com intervalo de 30 dias. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 14, 30, 51 e 85 após a vacinação, e o soro separado e armazenado a -20 °C.

Para avaliar os níveis de IgG totais e o perfil de isotipos de imunoglobulinas (IgG1 e IgG2), foi utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Microplacas de 96 poços (CRAL) foram sensibilizadas com 50 ng de rRa92A em cada poço e incubadas a 4 °C durante a noite. As placas foram bloqueadas com solução salina fosfatada acrescida de Tween 20 (PBS-T, pH 7,4) contendo 5% de leite em pó desnatado. Amostras de soro foram diluídas 1:100 em PBS-T e adicionadas 100 µL em cada poço. Após foi adicionado o anticorpo conjugado IgG anti-bovino (Sigma, Aldrich) diluído 1:5.000 em PBS-T. Para isotipagem foram utilizados anticorpos conjugados anti-IgG1 e anti-IgG2 bovinas diluídos 1:5.000 (Bethyl Laboratories). As incubações foram todas de 1 h a 37 °C em agitação leve, após cada etapa, as placas foram lavadas com PBS-T. Para revelar a reação foi utilizado substrato com 15 µL de H₂O₂ e 0,004 g de Ortho-Phenylenediamine (OPD), deixando reagir 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N. As absorbâncias foram medidas a 492nm usando um leitor de microplacas espectrofotômetro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os quatro bovinos responderam a vacina com a produção de anticorpos IgG totais contra a rRa92A após a administração das duas doses da vacina nos dias 0 e 30. O perfil de isotipos IgG1 e IgG2 anti-rRa92A foi observado após as duas doses da vacina. Os níveis de IgG1 e IgG2 apresentam-se crescentes e valores de absorbância semelhantes foram observados nos dias 51 e 85 (Figura 1).

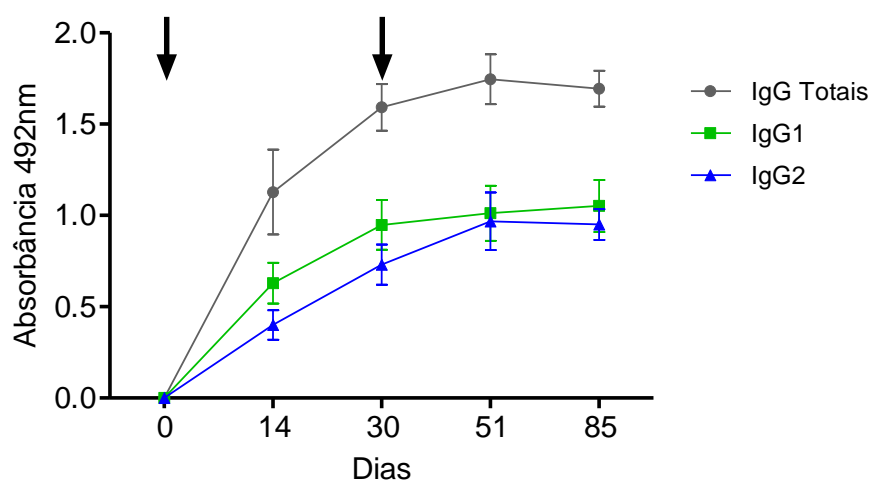


Figura 1. Níveis de IgG total, IgG1 e IgG2 em bovinos vacinados com rRa92A de *R. appendiculatus*. Os dados representam as médias (\pm erro padrão da média) dos valores das absorbâncias obtidas pelo ELISA indireto nos dias 0, 14, 30, 51 e 85. As setas representam o dia das vacinações no dia 0 e 30.

Os resultados mostram que a proteína rRa92A de *R. appendiculatus* expressa em *P. Pastoris* associado com o adjuvante Montanide foi capaz de estimular a produção de anticorpos em bovinos vacinados com este antígeno recombinante. Segundo SAIMO et al. (2011) a proteína Ra92A é homóloga a Bm86 de *Rhipicephalus microplus* que já é utilizada em uma vacina contra o carrapato, assim, a Ra92A tem potencial para ser utilizada como vacina no controle de *R. appendiculatus*.

As imunoglobulinas podem funcionar como opsoninas para aumentar a fagocitose por neutrófilos e macrófagos. Os isotipos IgG1 e IgG2 fixam

complemento, sendo que a IgG2 tem maior atividade opsonizante em relação à IgG1 (ESTES et al., 1995; MCGUIRE et al., 1979). A IgG2 pode iniciar a cascata do complemento pela via clássica em infecções bovinas por agentes extracelulares (BASTIDA-CORCUERA et al., 1999). A razão IgG2/IgG1 foi calculada e mostrou valores de 0.640 no dia 14 aumentando até 0.943 no dia 85 (Figura 2).

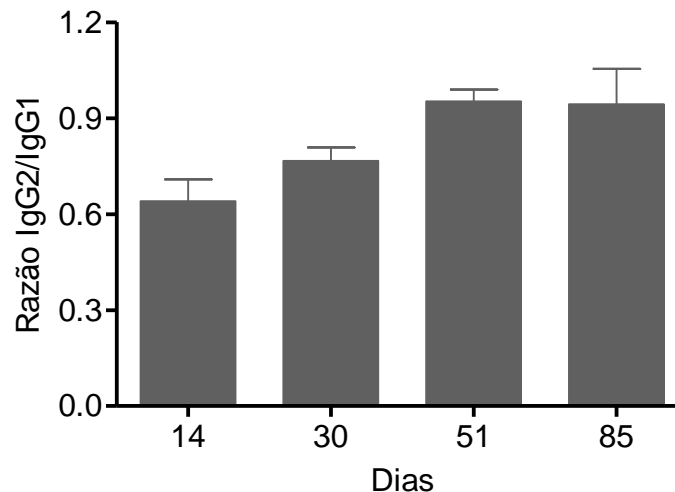


Figura 2. Razão IgG2/IgG1. Os dados representam as médias (\pm erro padrão da média) da razão IgG2/IgG1 de bovinos vacinados com a rRa92A de *R. appendiculatus*. Amostras de soro coletadas nos dias 14, 30, 51 e 85.

Os níveis de IgG1 sugerem o desenvolvimento inicial de uma resposta imune tipo Th2. No entanto, após a segunda dose da vacina, o aumento dos níveis de IgG2, considerados altos em relação aos de IgG1, indicam o desenvolvimento da resposta imune tipo Th1. A estimulação de altos níveis de IgG2 são desejáveis para uma vacina contra o carrapato, uma vez que esta é mais eficiente para a opsonização de antígenos na parede celular das células intestinais, podendo lisar as células pela ativação do complemento pela via clássica (KEMP et al. 1986).

O aumento da razão IgG2/IgG1 ao longo do tempo (próximo a 1.0) é devido ao aumento relativo na produção de IgG2, o que sugere que os bovinos vacinados com rRa92A desenvolveram, inicialmente, uma resposta imune balanceada Th2/Th1 que sofreu modulação ao longo do tempo tendendo a Th1. Neste experimento foram utilizados apenas 4 animais, sendo que as observações aqui apresentadas podem ter sido influenciadas por características genéticas dos animais selecionados, assim como pela formulação apresentada, balanceando os efeitos do antígeno e do adjuvante. Os resultados aqui observados são preliminares, mais estudos estão sendo realizados com diferentes formulações do antígeno e adjuvantes e com um número maior de animais.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo indica que a rRa92A de *R. appendiculatus* expressa em *P. pastoris* estimulou o desenvolvimento da resposta imune humoral, demonstrando que este antígeno recombinante tem potencial como futuro candidato para formulação de uma vacina para ser utilizada no controle do *R. appendiculatus* em Uganda.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTIDA-CORCUERA, F.D.; BUTLER, J.E.; YAHIRO, S.; CORBEIL, L.B. Differential complement activation by bovine IgG2 allotypes. **Vet. Immunol. Immunopathol**, n. 71, p.115-123, 1999.

CUNHA, R.C.; ANDREOTTI R; LEIVAS LEITE, F.P. Vacinas contra o carrapato-do-boi. In: ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W. **Carrapatos no Brasil: Biologia, Controle e Doenças Transmitidas**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. Cap.7, p.105-118.

ESTES, D.M.; HIRANO, A.; HEUSSELER, V.T.; DOBBELAERE, D.A.E.; BROW, W.C. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. **Cellular Immunology**, v.163, p.268-279, 1995.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; MEDEIROS DE BARROS, A.T.; ANDREOTTI, R. CANÇADO, P.H.D.; PÉREZ DE LEÓN, A.A.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 150-156, abr.-jun. 2014.

KEMP, D.H.; AGBEDE, R.I.S.; JOHNSTON, L.A.Y.; GOUGH, J.M. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. **International Journal for Parasitology**, Australia, v. 16, n. 2, p. 115-120, 1986.

McGUIRE, T.C.; MUSOKE, A.J.; KURTTI, T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. **Immunol**, v. 38, p. 249-256, 1979.

NDAMBI, O.A.; GARCIA, O.; BALIKOWA, D.; KICONCO, D.; HEMME, T.; LATACZ-LOHMANN, U. Milk production systems in Central Uganda: a farm economic analysis. **Tropical Animal Health and Production**, 40: p. 269–279 2008.

SAIMO, M.; ODONGO D.O.; MWAURA, S.; VLAK, J.M.; MUSOKE, A.J.; LUBEGA, G.W.; BISHOP, R.P.; OERS, M.M.V. Recombinant *Rhipicephalus appendiculatus* gut (Ra86) and salivary gland cement (Trp64) proteins as candidate antigens for inclusion in tick vaccines: protective effects of Ra86 on infestation with adult R. appendiculatus. **Dove press journal: Vaccine: Development and Therapy**, n. 1, p. 15-23, 2011.

TIZARD, I.R. [tradução Renata Scavone de Oliveira]. **Imunologia Veterinária**. Rio de Janeiro-RJ: Elsevier, 2008.