



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e do Comércio  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 9704150-5 A**

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>:  
C07K 14/435  
A61K 39/385

(22) Data de Depósito: 26/08/1997

(43) Data de Publicação: 15/06/1999  
(RPI 1484)

**(54) Título: Vacina contra o carrapato**

**(71) Depositante(s):** Universidade Federal do Rio Grande do Sul (BR/RS), Aoi Masuda (BR/RS), Carlos Jorge Logullo de Oliveira (BR/RJ), Itabajara da Silva Vaz Junior (BR/RS), João Carlos Gonzales (BR/RS), Marcos Henrique Ferreira Sorg:ne (BR/RJ), Pedro Lagerblad de Oliveira (BR/RJ)

**(72) Inventor(es):** Aoi Masuda, Aoi Masuda, Carlos Jorge Logullo de Oliveira, Carlos Jorge Logullo de Oliveira, Hatsaburo Masuda, Hatsaburo Masuda, Itabajara da Silva Vaz Junior, Itabajara da Silva Vaz Junior, João Carlos Gonzales, João Carlos Gonzales, Marcos Henrique Ferreira Sorg:ne, Marcos Henrique Ferreira Sorg:ne, Pedro Lagerblad de Oliveira

**(57) Resumo:** "Vacina Contra Carrapatos", caracterizada pelo isolamento de um antígeno do carrapato bovino, *Boophilus microplus*. Este antígeno isolado é um precursor de protease aspártica, mais abundante nos ovos do carrapato, mas também presente na hemolinfa e no aparelho digestivo, onde é sintetizada. O uso deste antígeno como imunógeno em bovino resultou em significativa redução da capacidade reprodutiva dos carrapatos de forma que o antígeno pode ser utilizado como vacina para prevenir a infestação, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos.

"Vacina Contra Carrapatos".

Refere-se o presente invento ao isolamento e caracterização de um antígeno do carrapato bovino, *Boophilus microplus*. O antígeno isolado, denominado EYC, é um precursor  
5 de protease aspartica, mais abundante nos ovos do carrapato, mas também presente na hemolinfa e no aparelho digestivo, onde é sintetizada. O uso deste antígeno como imunígeno em bovinos resulta em significativa redução da capacidade reprodutiva dos carrapatos, de forma que o antígeno pode ser  
10 utilizado como vacina para prevenir a infestação, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos já descritos ou a serem descritos.

A infestação de gado bovino por carrapatos implica em pesadas perdas econômicas, devido a espoliação (que pode  
15 chegar até 100 ml de sangue/dia em casos de parasitismo intensos) o que compromete a produtividade do gado e o desenvolvimento de animais jovens, assim como aos danos ao couro resultantes das lesões formadas pelo aparelho bucal do ectoparasita e as diversas doenças das quais este é vetor.  
20 Somando-se, às perdas diretas ao custo decorrente do uso de pesticidas convencionais chega-se a um prejuízo anual em todo o mundo estimado em aproximadamente US\$ 1,5 bilhão. Como consequência, diversas tentativas foram relatadas na literatura para obtenção de proteção imunológica de bovinos  
25 (ou outros animais experimentais) contra carrapatos. As

primeiras indicações de que isto seria possível baseavam-se na existência de um certo grau de imunidade natural adquirida pelo bovino após a exposição contínua ao carrapato em condições de campo. A imunidade natural, no entanto, resulta em níveis de proteção dentro dos quais as perdas econômicas ainda são extremamente significativas. A maioria das tentativas de imunização contra carrapatos descreve o uso de misturas complexas de antígenos, as quais impedem o desenvolvimento de uma vacina capaz de apresentar eficácia quando produzida em escala comercial. Além disso, em vários casos, os antígenos utilizados eram obtidos da glândula salivar do parasito. Deste modo, os níveis de proteção resultantes estavam dentro dos limites alcançados espontaneamente no campo.

Um avanço significativo foi conseguido com o uso de antígenos que normalmente não entram em contato com o sistema imune do hospedeiro por estarem no interior do organismo do ectoparasito. Foi isolada, caracterizada e clonada uma glicoproteína obtida de membranas do aparelho digestivo do carrapato, a Bm66, capaz de proporcionar um grau elevado de proteção em bovinos quando empregada em experimentos de vacinação. No entanto, o grau de proteção obtido não foi suficiente para constituir, isoladamente, uma vacina eficaz. Posteriormente, foi isolado pelo mesmo grupo de pesquisadores, um outro antígeno capaz de determinar proteção

significativa em bovinos, a Em91. Em 1995 foram lançadas para uso comercial duas vacinas contra carrapatos, sob o nome de TickGard® e Gavac®, ambas com o antígeno Em86. Apesar de resultar em níveis expressivos de redução da infestação, a  
5 vacina comercial ainda não oferece níveis de proteção que dispensem o uso de carrapaticidas convencionais. Deste modo, a obtenção de novos antígenos que possam funcionar como alternativa e/ou complementar a ação daqueles já descritos constitui avanço importante no desenvolvimento de vacinas  
10 eficazes.

O antígeno isolado é uma proteína relativamente abundante no ovo do *Boophilus microplus*, representando aproximadamente 9,8% das proteínas totais, determinado por SDS-PAGE seguido de densitometria.

15 A proteína EYC é isolada a partir de ovos de *Boophilus microplus* por cromatografia de troca iônica seguida de filtração em gel. Os ovos são homogeneizados, em coquetel de inibidores de proteases, contendo SBTI, leupeptina, antipaina e benzamidina. O homogeneizado é centrifugado a 10.000 g por  
20 2 minutos, descartando-se o material sedimentado. O sobrenadante é diluído 5 vezes com tampão Tris-HCl 10mM, pH 8,4 e aplicado em uma coluna de troca iônica DEAE-cyocpearl (10 X 3 cm), equilibrada no mesmo tampão com que a amostra é diluída. A eluição é feita com gradientes de NaCl (0 - 75 mM,  
25 75 - 150 mM, 150 - 400 mM e 1M), empregando-se um fluxo de

100 ml/hora. As frações contendo o antígeno de interesse são identificadas, reunidas, concentradas e recromatografadas em uma coluna de filtração em gel de Sephacryl S-100 (120 X 2,4 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 contendo 5 NaCl 0,15 M, com um fluxo de 24 ml/hora.

A seqüência amino-terminal da nova proteína descoberta foi obtida por degradação automatizada de Edman em um microsequenciador de aminoácidos FORTON, modelo 2095, e resultou na seqüência amino-terminal: NH<sub>2</sub>-K-I-R-I-F-L-R-K-D-  
10 R-I-I-M-X-N-L-F-H.

A medida do teor de açúcares redutores da EYC pela reação de DuBois demonstra que é uma glicoproteína, correspondendo os carboidratos por aproximadamente 15% do peso da proteína nativa.

15 A análise das seqüências da extremidade amino-terminal, revela homologias consistentes com precursores de proteases asparticas. Com aquelas proteases que apresentaram o maior grau de homologia, foi possível alinhar o seguimento amino-terminal com uma região de clivagem para o peptídeo sinal  
20 (entre os resíduos 20 - 26). Foi também identificado um sítio de clivagem conservado 253-L-G-G-I-258, ponto este que após a quebra, descrito para outras catepsinas, gera a forma ativa de aproximadamente 30 kDa. Os percentuais de identidade e similaridade foram determinados através do programa BESTFIT,  
25 para representantes das principais sub-classes de proteases

asparticas, escolhidas dentre aquelas que apresentaram homologia. Observou-se um significativo percentual de identidade e similaridade destas proteínas com a sequência peptídica amino-terminal. A composição de aminoácidos da  
5 proteína apresenta uma abundância relativa de glicina, leucina e treonina, apresentando um padrão geral semelhante ao de outras catepsinas do tipo D.

Em pH ácido a proteína sofre auto-proteólise e hidrólise hemoglobina, estas atividades são inibidas por pepstatina.

10 A proteína foi identificada no ovo e na hemolinfa por Western Blot. Sua presença na hemolinfa indica um sítio de síntese extraovariano. Sua presença em outros tecidos que não o ovo, indica que estes também podem ser utilizados como fonte para purificação do antígeno.

15 Para testar a capacidade da BYC induzir uma resposta imunológica protetora, bezerros com idade de 6 meses foram inoculados por via intramuscular por 4 vezes com intervalos de 10 dias entre cada inoculação com 100 µg de BYC suspensa no adjuvante Quil A. Após 15 dias da última inoculação os 8  
20 bezerros imunizados e 8 bezerros controles (inoculados apenas com o adjuvante) foram infestados com 30.000 larvas de *Eoophylus microplus*. Os animais foram mantidos em baias individuais e os carrapatos que completavam o ciclo biológico no hospedeiro eram coletados, contados e pesados. Uma amostra  
25 de 5 g de fêmeas ingurgitadas, obtidas de cada bovino eram

colocadas e mantidas em câmara a 28° C com 65% de umidade relativa do ar para realizarem a postura, a massa de ovos posta foi pesada e os ovos incubados.

A eficácia da EVC em induzir uma resposta imunológica protetora em bovinos foi calculada segundo a fórmula:

eficácia (%) =  $100[1 - (CRT \times CRO \times CEF)]$ , onde:

CRT: corresponde ao coeficiente de redução do número de teleoginas;

CRO: corresponde ao coeficiente de redução da ovopostura e;

CEF: corresponde ao coeficiente de redução da fertilidade dos ovos.

O coeficiente de redução do número de fêmeas ingurgitadas é calculado como a razão entre o número médio de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos vacinados e o número de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos não vacinados (controle). O coeficiente de redução de ovoposição é calculado como a razão entre o peso médio da postura de todas as fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos vacinados e o peso médio da postura de todas as fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos não vacinados. O coeficiente de redução de fertilidade dos ovos é calculado como a razão entre a média da soma do peso de ovos férteis obtidos de 5,0 gramas de ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo

em animais vacinados e a média da soma do peso de ovos férteis obtidos de 5,0 gramas de ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo em bovinos não vacinados.

5 O número de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo em cada bovino, o peso da postura feita pelas fêmeas ingurgitadas, tomadas como amostra, que completaram o ciclo em cada bovino (5,0 gramas de fêmeas ingurgitadas) e a soma  
10 do peso de ovos férteis provenientes da postura das teleoginas tomadas como amostra que completaram o ciclo em cada bovino estão colocados na tabela I. A eficiência do antígeno, calculada com base na definição acima e nos dados apresentados na tabela 1 foi 38% quando os bovinos foram desafiados com larvas de 10 dias e 29% quando os bovinos  
15 foram desafiados com larvas de 17 dias.



Tabela I: Resultado da vacinação de bovinos e desafio com carrapatos.

Ani mal	Numero de carrapatos (%)		Peso (%)		
	Parcial- mente	Fêmea	Ovo	Larva	
	Injurçi- tada	Injurçi- tada			
<b>Experimento I</b>					
Controle	1	42	1.164	16,2	13,0
	2	107	1.230	20,2	17,9
	3	67	1.211	19,0	17,1
	4	33	1.617	20,5	18,2
Média±EP		62	1.556	18,9	16,6
		±17	±247	±1,0	±1,2
Vacinado	5	191	1.490	16,5	13,3
	6	45	1.397	15,9	12,7
	7	42	1.209	15,9	13,0
	8	74	1.776	18,1	15,0
Média±EP		68	1.595	16,6	13,5
		±55	±154	±0,5	±0,5
Diferença (%)*		-41	-3	12,0	18,7
<b>Experimento II</b>					
Controle	9	12	505	15,3	11,3
	10	15	659	17,4	15,4
	11	37	1.352	13,3	9,2
	12	21	1.280	18,9	15,4
Média±EP		21	949	16,2	13,0
		±6	±215	±1,2	±1,5
Vacinado	13	19	915	16,2	11,0
	14	54	665	14,7	10,3
	15	79	922	17,9	12,4
	16	25	459	13,7	9,3
Média±EP		44	740	15,6	10,8
		±14	±111	±0,9	±0,7
Diferença (%)		-110	22	3,7	16,9

\* Diferença (%) =  $100 \times (1 - (\text{valor medio do grupo vacinado} / \text{valor medio do grupo controle}))$

5 E.P. = Erro Padrão.

**ABREVIATURAS UTILIZADAS**

DEAE - dietilaminoetil

kDa - quilo Dalton

SBTI - inibidor de tripsina de soja

5 SDS - dodecil-sulfato de sodio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Tris - trihidroximetil aminometano

K - lisina

I - isoleucina

10 R - arginina

P - prolina

L - leucina

D - acido aspartico

M - metionina

15 X - qualquer aminoácido

N - asparagina

F - fenilalanina

H - histidina

G - glicina

## REIVINDICAÇÃO

i-"Vacina Contra Carrapatos", caracterizada pelo uso, em qualquer dosagem da mistura, de antígeno do precursor de protease aspártica, denominado BYC, do carrapato bovino, *5 Boophilus microplus*, pelo uso de partes do antígeno obtido por extração e cromatografia de carrapatos, por extração e cromatografia de órgãos de carrapatos ou produzidos em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante.

**RESUMO**

"Vacina Contra Carrapatos", caracterizada pelo isolamento de um antígeno do carrapato bovino, *Boophilus microplus*. Este antígeno isolado é um precursor de protease aspártica, mais abundante nos ovos do carrapato, mas também presente na hemolinfa e no aparelho digestivo, onde é sintetizada. O uso deste antígeno como imunógeno em bovino resultou em significativa redução da capacidade reprodutiva dos carrapatos de forma que o antígeno pode ser utilizado como vacina para prevenir a infestação, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos.