

POLICARPO ADEMAR SALES JUNIOR

**UTILIZAÇÃO DE MICROESFERAS BIODEGRADÁVEIS PLGA COMO
SISTEMA DE LIBERAÇÃO PARA A VACINA SINTÉTICA SBm7462 NO
CONTROLE DO *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): MODELO
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003**

POLICARPO ADEMAR SALES JUNIOR

UTILIZAÇÃO DE MICROESFERAS BIODEGRADÁVEIS PLGA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO PARA A VACINA SINTÉTICA SBm7462 NO CONTROLE DO *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): MODELO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”

APROVADA: 19 de dezembro de 2003.

Prof^a Marlene I. Vargas Vilória
(Conselheira)

Prof. Antônio M. Guimarães

Prof. Luiz Carlos Crocco Afonso

Prof. Tomás Aroldo Mota Santos

Prof. Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo
(Orientador)

*À minha mãe, Josefa,
ao meu pai,
Policarpo, a minha
avó, Albertina e a tia
Iêda.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, pela amizade, orientação e confiança em mim depositados.

À professora Marlene Isabel Vargas Villoria, pela orientação, amizade e pela grande ajuda nas análises histológicas.

A Fundación Instituto de Immunologia de Colombia (FIDIC), nas pessoas do Dr. Jaiver Rosas e da Dr^a. Fanny Guzman, tanto pelas técnicas realizadas em seus laboratórios, quanto pelas opiniões de inestimável valor.

A Aline Prates e Márcio Mendes pela amizade, boa convivência, e sugestões de grande valia nas técnicas laboratoriais.

À professora Tânia Toledo, por ter gentilmente cedido seu laboratório à permanência dos camundongos, como também por ceder seus equipamentos para os testes de função hepática e ao Zé por ter realizado as análises.

Ao professor Carlos Orlategui Chaves da UFMG, por ter cedido-nos os camundongos.

Ao professor Múcio Flávio Ribeiro pelas fotos de microscopia eletrônica.

Com especial carinho aos amigos das “noites de segunda” da Vila Gianetti: Pri, Gi e Sidi . Valeu de verdade!!!

Ao amigo Sidimar, pela grande ajuda nos ELISAS e na coleta de sangue dos camundongos.

A minhas amiguinhas Cláudia e Irma, pelos bons momentos vividos nestes dois anos de convivência. Foi bom conhecer vocês.

Aos colegas de laboratório: Sidimar, Cláudia, Irma, Dani, Carol, Ana Paula, Carlos, Jorge, Mayra, Larissa, Carla e Marcinho Oliveira.

Aos colegas de mestrado: Priscila, Gisele, Raul, Michelle, Renato, Flávia, Ramon, Fabi, Sandra, Fernanda.

À Valéria.

Aos amigos de república: Dimas, Tiago, Rafael e Arlindo.

Ao professor Eduardo Paulino pelas análises estatísticas.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo suporte financeiro fundamental para a execução deste trabalho.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

O meu muito obrigado!

BIOGRAFIA

Policarpo Ademar Sales Júnior, filho de Policarpo Ademar Sales e Josefa Maria de Jesus, nasceu a 13 de novembro de 1977 no município de Quixelô, Estado do Ceará.

Na Escola de Primeiro Grau Filgueiras Lima concluiu o ensino primário. No ano de 1992 ingressou na Escola Agrotécnica Federal de Iguatu, onde em 1994 concluiu o curso de Técnico em Agropecuária.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Escola Superior de Agricultura de Mossoró – ESAM no segundo semestre de 1996, onde no decorrer do curso estagiou no Laboratório de Parasitologia, foi monitor voluntário da disciplina Parasitologia Veterinária, desenvolvendo atividades relacionadas tanto a endo como a ectoparasitas e foi bolsista do PIBIC – CNPq. Graduou-se em Medicina Veterinária no primeiro semestre de 2001.

Iniciou o curso de mestrado em Medicina Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa em agosto de 2001.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE QUADROS.....	Ix
LISTA DE FIGURAS.....	Xi
RESUMO.....	Xiii
ABSTRACT.....	Xv
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	3
3 - REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 – O carrapato <i>Boophilus microplus</i>	5
3.2 – A vacina.....	8
3.3 – Adjuvantes.....	12
3.3.1 – Mecanismo de ação dos adjuvantes.....	14
3.3.1.1 – Geração de depósito.....	14
3.3.1.2 – “Targeting”.....	15
3.3.1.3 – Interface de superfície.....	15
3.3.1.4 – Imunomodulação.....	15
3.3.1.5 – Efeitos na expressão do MHC classe II.....	16
3.3.1.6 – Função co-estimulatória.....	16

3.3.1.7 – Mudanças no tráfego celular.....	17
3.3.1.8 – Capacidade de apresentação.....	17
3.3.1.9 – Ativação do complemento.....	17
3.3.1.10 – Indução de resposta T citotóxica por células CD8+ (CTL).....	18
3.3.1.11 – Ação sobre receptores da resposta imune inata.....	18
3.3.2 – Classificação.....	19
3.3.3. – A saponina como adjuvante.....	21
3.3.4 – Microesferas biodegradáveis como sistema de liberação lenta.....	20
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 – Peptídeo sintético SBm7462.....	27
4.2 – Peptídeo sintético SPf66.....	27
4.3 – Adjuvante.....	28
4.4 – Liberador lento.....	28
4.5 – Animais utilizados.....	28
4.6 – Local de estudo.....	29
4.7 – Preparação das microesferas.....	29
4.8 – Microscopia eletrônica.....	30
4.9 – Determinação do tamanho das microesferas.....	30
4.10 – Mensuração da eficácia da microencapsulação.....	30
4.11 – Estudos de liberação <i>in vitro</i>	31
4.12 – Análise da Integridade dos peptídeos SBm7462 e SPf66 por HPLC-SEC e por HPLC-RP.....	31
4.13 – Análise da estabilidade do peptídeo SBm7462 por dicroísmo circular.....	32
4.14 – Estabilidade do peptídeo SBm7462 a diferentes pHs.....	33
4.15 – Protocolo de imunização.....	33

4.16 – Coleta do sangue dos animais.....	34
4.17 – Detecção de IgGs anti-SBm7462 e anti-SPf66 por meio da técnica de ELISA indireto.....	34
4.18 – Testes de função hepática.....	36
4.19 – Coleta dos baços.....	36
4.20 – Histologia dos baços.....	36
4.21 – Análise estatística.....	37
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 – Preparação das microesferas.....	38
5.2 – Mensuração da eficácia da microencapsulação.....	40
5.2.1 – Peptídeo SBm7462.....	40
5.2.2 – Peptídeo SPf66.....	41
5.3 – Tamanho das microesferas.....	42
5.4 – Estudos de liberação <i>in vitro</i> do peptídeo SBm7462.....	43
5.5 – Estudos de liberação <i>in vitro</i> do peptídeo SPf66.....	45
5.6 – Integridade dos peptídeos SBm7462 e SPf66.....	45
5.7 – Análise da estabilidade do peptídeo SBm7462 por dicroísmo circular.....	47
5.8 – Cinética de anticorpos da classe IgG anti-peptídeos sintéticos SBm7462 e SPf66.....	48
5.9 – Provas de função hepática.....	57
5.10 – Avaliação histológica dos baços murinos inoculados com os peptídeos SBm7462 e SPf66.....	60
6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
7 – CONCLUSÕES.....	65
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE QUADROS

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quadro 1 - Médias de absorvância óptica (492nm) obtidas no ELISA indireto para os grupos I, II, III, IV e V. Os números representam as médias de absorvância semanais, sendo que para cada soro de cada amostra foram feitas duas repetições. Letras diferentes (a, b, c) seguindo os resultados, na mesma linha, significam diferença estatística no Teste de Kruskal – Wallis ($p < 0,05$). As inoculações foram realizadas nas semanas 0, 3 e 6. Legenda: saponina (I); água milliQ (II); SBm7462 + saponina (III); PLGA vazia (IV); SBm7462 + PLGA (V).....52

Quadro 2 - Comparação das médias de absorvância óptica (492nm) obtidas no ELISA indireto para os grupos em que foi utilizada PLGA como sistema de liberação: IV, V e VI. Os números representam as médias de absorvância para cada semana, sendo que para cada soro de cada amostra foram feitas duas repetições. Letras diferentes (a, b, c) seguindo os resultados, na mesma linha, significam diferença estatística no Teste de Kruskal – Wallis ($p < 0,05$). As inoculações foram realizadas nas semanas 0, 3 e 6. Legenda: PLGA vazia (IV); SBm7462 + PLGA (V); SPf66 + PLGA (VI).....53

Quadro 3 - dados de função hepática dos animais dos grupos I, II, III, IV, V e VI. Os parâmetros avaliados foram: proteínas totais (PT), albumina (ALB), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Os números representam os parâmetros médios para cada fator avaliado. Letras diferentes (a, b, c) seguindo os resultados, na mesma coluna, significam diferença estatística no Teste de Kruskal – Wallis ($p < 0,05$). Legenda: saponina (I); água milliQ (II); SBm7462 + saponina (III); PLGA vazia (IV); SBm7462 + PLGA (V); SPf66 + PLGA (VI).....59

LISTA DE FIGURAS

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 1: Eletronmicrografia de varredura das microesferas PLGA contendo o peptídeo SPf66 encapsulado. Aumento de 25.000X.....39

Figura 2: Perfil de liberação *in vitro* dos peptídeos SBm7462 e SPf66 em tampão fosfato salino 20mM pH 7,4. O tempo de ensaio foi de 59 dias para o SBm7462 e de 63 dias para o SPf66.....44

Figura 3: Peptídeo SBm7462 analisado por HPLC-RP. Perfil cromatográfico do peptídeo SBm7462 antes da microencapsulação (A); perfil cromatográfico após extração das microesferas (B); Perfil cromatográfico após extração das microesferas e diálise em membrana de 1000 Da em água deionizada (C).....46

Figura 4: Análises de dicroísmo circular em TFE 30% para o peptídeo SBm7462 antes da encapsulação nas microesferas PLGA.....49

Figura 5: Análises de dicroísmo circular em TFE 30% para o peptídeo SBm7462 extraído das microesferas PLGA.....50

Figura 6: Cinética de produção de IgGs em camundongos inoculados com SBm7452 emulsificado com o adjuvante saponina (grupo III) e encapsulado em PLGA (grupo V), e com os controles saponina (grupo II), água milli Q (grupo I) e PLGA vazia (grupo IV) . As setas indicam as inoculações e as barras em T o desvio padrão para mais e para menos.....54

Figura 7: Cinética de produção de IgGs em camundongos inoculados com SBm7462 (grupo V) e SPf66 (grupo VI) encapsulados em microesferas PLGA, como também com microesferas vazias (grupo IV). As setas indicam as inoculações e as barras em T o desvio padrão para mais e para menos.....55

Figura 8: Baços de camundongos imunizados com SBm7462 emulsificado com saponina (A) e encapsulado em microesferas PLGA (B); imunizados com o peptídeo SPf66 encapsulado em microesferas PLGA (C); imunizados com PLGA vazia (D). Quatro dias após a terceira inoculação. Hiperplasia reacional antígeno-específica de folículos linfóides (FL) com formação de centros germinais (CG). Hiperplasia dos cordões de Billroth (CB). Hiperplasia das bainhas periarteriolares (PALS). Coloração H&E, 100X (lâmina A) e 200X (lâminas B, C e D).....62

RESUMO

SALES-JUNIOR, Policarpo Ademar M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2003. **Utilização de microesferas biodegradáveis PLGA como sistema de liberação para a vacina sintética SBm7462 no controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): modelo experimental em camundongos.** Orientador: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Conselheiros: Marlene Isabel Vargas Vilória e Jackson Victor de Araújo.

Foi avaliada a resposta imunológica do peptídeo sintético SBm7462 emulsificado com o adjuvante saponina ou encapsulado em microesferas biodegradáveis PLGA; bem como, a do peptídeo sintético SPf66 encapsulado no referido sistema de liberação. O estudo foi realizado com camundongos Balb/c, fêmeas, utilizando-se uma dose de 100 µg de peptídeo por animal. Os camundongos foram separados em seis grupos de vinte: grupo I: animais em que foram inoculados 75µg de saponina; grupo II: inoculados com 100 µL de água milli Q; grupo III: imunizados com o peptídeo SBm7462 emulsificado com o adjuvante saponina (75µg de saponina para 100µg de peptídeo); grupo IV: inoculados com as microesferas vazias; grupo V: imunizados com o peptídeo SBm7462 encapsulado nas microesferas PLGA; grupo VI: imunizados com o peptídeo sintético SPf66 encapsulado nas microesferas PLGA. As três inoculações foram efetuadas no dia

zero e depois a cada três semanas. Os camundongos foram sangrados antes da primeira imunização e a intervalos periódicos (a cada sete dias) até 21^a semana, sendo o soro utilizado para a realização de ELISA indireto para detecção de IgGs anti-SBm7462, como também para a realização de testes de função hepática. O peptídeo sintético SBm7462 mostrou uma melhor resposta humoral quando emulsificado com o adjuvante saponina. Já o SPf66 mostrou uma resposta similar à encontrada por outros autores quando encapsulado em microesferas PLGA e utilizado em camundongos. Os testes de função hepática foram realizados em equipamento multiparamétrico de bioquímica Alisé e, não se observou evidências de efeitos hepatotóxicos quando foram avaliados parâmetros como proteínas totais, albumina, AST e ALT. Foram também coletados baços de camundongos para verificação das alterações histológicas pós-imunização, para cada tratamento, no dia zero, três, seis e nove dias após a segunda e dois, quatro e seis dias após a terceira inoculação. Os resultados obtidos revelam que a saponina potencializa uma melhor resposta imune do peptídeo SBm7462, tendo sido também esta resposta mais precoce e que, as microesferas PLGA mostram-se viáveis a serem utilizadas como sistema de liberação para este peptídeo, necessitando-se, porém, de estudos adicionais para promoção de uma melhor eficácia de encapsulação.

ABSTRACT

SALES-JUNIOR, Policarpo Ademar M.S., Universidade Federal de Viçosa, december, 2003. **Utilization of biodegradable PLGA microspheres as a delivery system for synthetic vaccine SBm7462 on control of the *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): experimental model in mice.** Adviser: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Committee Members: Marlene Isabel Vargas Vilória and Jackson Victor de Araújo.

Was evaluated the immunological response of synthetic peptide SBm7462 emulsified with the adjuvant saponin or encapsulated in biodegradable PLGA microspheres; as well as, the response of synthetic peptide SPf66 encapsulated on cited delivery system. Mice Balb/c, female, were utilized on study, with a dose of 100µg of peptide for each animal. The mice were separated in six groups of twenty: group I: animals inoculated with 75µg of saponin; group II: inoculated with 100µL of water milliQ; group III: immunized with the peptide SBm7462 emulsified on saponin, 75µg of saponin for 100µg of peptide; group IV: inoculated with empty microspheres; group V: immunized with the peptide SBm7462 enclausured in PLGA microspheres; group VI: immunized with the synthetic peptide SPf66 enclausured in PLGA microspheres. The three inoculations was executed on day zero and latter on third and sixth weeks after the first inoculation. The mice were

bled prior of first immunisation and at periodic intervals (of seven days) until week 21. The serum was assayed by indirect ELISA for detection of specific IgGs anti-SBm7462, and for realization of tests of hepatic function. The synthetic peptide SBm7462 showed a better immune response emulsified with saponin adjuvant. The peptide SPf66 showed a similar response when compared with the obtained for others authors when encapsulated in PLGA microspheres and utilized in mice. The tests of hepatic function were realized in equipament multiparametric of bioquimic Alisé, and no evidence of hepatotoxic effects was viewed, when was evaluated the parameters: total proteins, albumin, AST and ALT. In order to verification of histologic alterations post-immunization, were colleted spleen of mice, for each treatment, on day zero, three, six and nine days post the second inoculation and two, four and six days post the third inoculation. The results obtained showed the saponin potentiate a better immune response of peptide SBm7462, and this response was more precoce than the obtained with the PLGA microspheres. This delivery system show itself as a good approach for utilization with the synthetic peptide SBm7462, nevertheless more studies are necessary for promotion of a better efficacy of encapsulation.

1 – INTRODUÇÃO

O carrapato comum dos bovinos, *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) é o principal ectoparasita da pecuária dos países compreendidos entre os paralelos 32° de latitude norte e 35° de latitude sul. No Brasil, está amplamente disseminado nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, como também em toda costa brasileira. Os prejuízos são decorrentes, principalmente, da espoliação sanguínea, da queda na produção leiteira, do dano nos couros e na transmissão de agentes patogênicos. Entre outros, atualmente o método mais utilizado no seu controle é baseado na utilização de produtos químicos. Apesar da sua relativa eficácia, este método apresenta graves limitações, como o aparecimento crescente de resistência dos carrapatos às diversas bases químicas, a contaminação dos alimentos de origem bovina, do meio ambiente e o aumento dos custos de produção, devido à necessidade da utilização de quantidades cada vez maiores de carrapaticidas para gerar controle.

A utilização de vacinas se destaca como uma tecnologia promissora alternativa ao método de controle tradicional devido a vantagens como as citadas por WILLADSEN (1997) e PRUET (1999): longa duração da imunidade, ausência de resíduos, segurança ambiental, especificidade e o fato de que a resistência dos artrópodes às vacinas seja mais difícil de ocorrer. E dentro dessa tendência, o uso de peptídeos sintéticos se mostra bastante vantajoso devido à vantagens como as

citadas por NEURATH & KENT (1986) e PATARROYO *et al.* (1995): alto grau de pureza, completa caracterização química, ausência de contaminantes, completa reprodutibilidade, baixo custo de produção, estabilidade e ausência de mecanismos supressores, alérgicos e/ou auto-ímmunes.

SBm7462, um peptídeo sintético derivado da Bm86, uma proteína do intestino do carrapato *B. microplus*, foi testado experimentalmente em bovinos da raça Jersey e mestiços Gir + Holandês, com média de grau de sangue de 91,16% (H/Z), em testes de estábulo e misto (campo e estábulo), sendo capaz de induzir uma resposta imune protetora quando foram analisados parâmetros como redução do número e peso de teleóginas, queda no peso dos ovos e diminuição da fertilidade, de acordo com as fórmulas descritas por DE LA FUENTE (1995).

A eficácia de uma vacina pode ser definida como a habilidade específica ou capacidade do produto biológico alcançar o resultado para o qual é oferecido, sob as condições recomendadas pelo fabricante (BROWNLIE *et al.*, 1984). Uma forma efetiva de aumentar-se a eficácia de uma vacina é por meio da utilização de adjuvantes, os quais são utilizados juntamente com as vacinas e que, podem ser definidos como substâncias que agem não especificamente para aumentar a resposta a um antígeno (ALEXANDER & BREWER, 1995). Muitos antígenos potencialmente protetores são fracamente imunogênicos. Antígenos protéicos injetados juntamente com solução salina produzem uma fraca e transitória resposta humoral, diferentemente de quando são aplicados com um adjuvante efetivo, onde produzem uma resposta forte e duradoura (HUNTER, 2002). Dentro da tecnologia de adjuvantes, destacam-se como promissores os polímeros biodegradáveis derivados dos ácidos láctico e glicólico (PLGA). São, geralmente, utilizados como microesferas ou nanoesferas e apresentam como vantagens principais a geração de uma forte resposta celular e humoral, a não toxicidade e a redução do número de inoculações requeridas para gerar uma resposta protetora adequada.

2 – OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar a resposta imunológica de camundongos imunizados com o peptídeo SBm7462 encapsulado em microesferas biodegradáveis PLGA e emulsificado com o adjuvante saponina, como também a resposta do peptídeo SPf66 encapsulado em PLGA, mediante detecção de IgGs reativas com esses peptídeos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar, comparativamente, a eficiência da microencapsulação, o perfil de liberação e a integridade dos peptídeos SBm7462 e SPf66 após encapsulação em microesferas PLGA;
- Avaliar, comparativamente, a resposta imune induzida pelo peptídeo SBm7462 encapsulado em microsferas PLGA ou emulsificado com o adjuvante saponina, como também a resposta do peptídeo SPf66 encapsulado em PLGA;
- Verificar se os peptídeos/adjuvantes têm capacidade de provocar efeitos hepatotóxicos;

- Verificar a dinâmica das alterações microscópicas a nível de baço induzida pelos diferentes tratamentos.

3 – REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O carrapato *Boophilus microplus*

Boophilus microplus (Canestrini, 1887), o carrapato comum dos bovinos, distribui-se por praticamente todos os países compreendidos entre os paralelos 32° de latitude norte e 35° de latitude sul, onde é o principal ectoparasita na pecuária desses países (NUÑEZ *et al.*, 1982). No Brasil, a sua importância se dá com mais ênfase nas regiões Sudeste e Centro-Oeste e toda a costa brasileira (ESTRADA-PEÑA, 1999), devido às boas condições de umidade e temperatura e pela exploração pecuária mais intensa (PIMENTEL, 2002).

Considera-se que acima de 75% da população bovina mundial é parasitada por este carrapato (CORDOVÉS, 1997). No Brasil, dados do Ministério da Agricultura de 1983, relatam que o *B. microplus* está presente em 73,37% dos municípios brasileiros, sendo que em 80% deles é muito frequente (VERÍSSIMO, 1993).

Os prejuízos causados podem ser classificados como diretos e indiretos. Os danos diretos são causados pela hematofagia intensa realizada principalmente pelas fêmeas, podendo chegar a uma quantidade de 0,6 a 3 ml por teleógina (ARTHUR, 1960), levando a perdas na produção, sendo proporcional à intensidade

e frequência das infestações (CORDOVÉS,1997). Na Austrália, JONSSON *et al.* (1998) estimaram que cada teleógina seria responsável pela queda de produção diária de 8,9 ml de leite e de 1,0g de peso corporal. No Brasil, FURLONG *et al.* (1996), constataram um pequeno declínio na produção de leite em infestações crescentes sucessivas. Já os prejuízos indiretos estão relacionados com a transmissão de agentes patogênicos, principalmente hematozoários; no Brasil, os mais importantes são *Babesia bovis* e *B. bigemina*, tendo também participação na epidemiologia de *Anaplasma marginale* (PATARROYO, 1994) e na transmissão de *B. equi* (GUIMARÃES *et al.*, 1998).

No Brasil, HORN & ARTECHE (1985) estimaram em 800 milhões de dólares os prejuízos diretos e indiretos. Já o Ministério da Agricultura, em um trabalho realizado no biênio 1983/1984, elevou esse valor à cifra de um bilhão de dólares anuais, sendo que 40% desse montante é relativo à perdas na produção leiteira.

O controle desse carrapato, atualmente, se dá principalmente por meio de produtos químicos. É de 1895 o primeiro relato do uso de compostos arsenicais na Austrália (NEWTON, 1967). Estes, inicialmente foram muito efetivos, porém após 40 anos de uso houve o aparecimento de resistência nos carrapatos. Posteriormente, em 1939, se descobriram as propriedades ixodicidas dos organoclorados (DDT e BHC), produtos com poderes residuais, até então, nunca vistos, com grande impacto ambiental e resíduos altamente tóxicos (NUÑEZ *et al.*, 1982), dos quais já se tinha relatos de resistência dezoito meses após a sua implantação (GRILLO, 1976), razão pela qual nos anos 60 foram impostas restrições ao seu uso. Em meados dos anos 40 surgiram os organofosforados (derivados do ácido fosfórico), os quais levaram a grandes conquistas na luta contra insetos e artrópodes, embora não tenha tardado o aparecimento de resistência (WHARTON, 1974). Na década de 70 entraram no mercado outros compostos como as formamidinas, as ciclomidinas e os piretróides, que mostraram um período ainda mais curto de eficiência (LODOS *et al.*, 1999). Na década de 90 novas moléculas como o fipronil e os inibidores de ecdise, começaram

a ser empregadas e para as quais os estudos de resistência estão em desenvolvimento (DAVEY *et al.*, 1998). Atualmente, novas drogas estão sendo testadas, como o “spinosad”, um produto derivado da fermentação da levedura *Saccharopolyspora spinosa*, composto de spinosad A e D, com modo de ação semelhante aos piretróides, com rápida degradação e baixa resistência cruzada, mas com eficácia ainda variável (DAVEY *et al.*, 2001).

Quanto à resistência aos carrapaticidas no Brasil, são muitos os relatos de populações resistentes, como demonstrado no Sul de Minas Gerais (PATARROYO & COSTA, 1980), Garanhuns no Estado de Pernambuco (FAUSTINO & OLIVEIRA, 1996) e na região de Ilhéus, no Estado da Bahia (CAMPOS JÚNIOR, 2001).

Além dos problemas relacionados à emergência de resistência, o controle químico também merece atenção no que se refere aos custos de produção. Segundo PEGRAM *et al.* (1991) e CHEMA(1990), há uma evidência crescente de que as presentes estratégias baseadas no uso de acaricidas não são custo-rentáveis. Esses fatos combinados com o interesse público em relação à segurança dos resíduos nos produtos agropecuários e dos efeitos indesejáveis dos produtos químicos no ambiente em geral, têm levado a pesquisa por métodos alternativos de controle (FRISCH, 1999).

Para WILLADSEN (1999) um controle de ectoparasitas que fizesse uso da combinação de tecnologias, tais como a utilização simultânea de vacinas e controle químico, seria mais bem sucedido e mais sustentável do que uma única abordagem.

3.2. A vacina

As vacinas oferecem um vasto número de vantagens sobre o controle químico tradicional dos artrópodes. PRUET (1999) cita a longa duração da imunização, a ausência de resíduos, a segurança ambiental e a especificidade. WILLADSEN (1997) acrescenta ainda que, a resistência dos artrópodes às vacinas por meio de adaptação seletiva seja mais difícil de ocorrer.

Nas duas últimas décadas houve um considerável aumento do número de pesquisas sobre isolamento e caracterização de proteínas que atuam como imunógenos, técnicas imunológicas e métodos de clonagem de genes para o desenvolvimento de vacinas (DALTON & MULCAHY, 2001). Tais pesquisas buscam, principalmente proteínas conservadas durante os diversos estádios de desenvolvimento do parasita, as quais podem estar envolvidas nos mecanismos de evasão da resposta imune inata e adaptativa de muitos parasitas. Estes mecanismos de evasão explicariam a persistência do agente por longo tempo e a imunopatologia causada por infecções crônicas que estimulam continuamente o sistema imune (COX, 1997). Entretanto, este fator dificulta o desenvolvimento e implementação de vacinas na área da parasitologia, sendo que a maioria dos imunógenos é proveniente de parasitas atenuados.

O uso de peptídeos sintéticos tem se mostrado uma ferramenta promissora na produção de vacinas. Vantagens significativas no uso dos peptídeos sintéticos são citadas por NEURATH & KENT (1986), tais como alto grau de pureza, completa caracterização química, ausência de contaminantes, completa reprodutibilidade e baixo custo de produção e estabilidade, uma vez que não há enzimas proteolíticas originárias de material biológico. PATARROYO *et al* (1995) citam também a ausência de mecanismos supressores, alérgicos e/ou auto-imunes.

O desenho para uma vacina sintética eficiente requer informações baseadas nos detalhes estruturais da molécula protéica nativa. A partir da seqüência da Bm86, uma proteína do intestino do carrapato *B. microplus*, escolheram-se alguns

peptídeos com possíveis características antigênicas. A escolha de tais peptídeos dentro da estrutura da proteína íntegra se baseou em estudos de predição computacional de sítios imunogênicos, com base nas propriedades de proteínas, tais como: antigenicidade (HOOP & WOODS, 1981), potencialidade de alfa e beta hélice e Beta Sheet (CHOU & FASMAN, 1978), hidrofobicidade e hidrofiliabilidade (KYTE & DOOLITTLE, 1982). A partir dessas análises, foram escolhidas três seqüências definidas contendo alguns dos possíveis determinantes imunogênicos para a Bm86. Estas seqüências foram desenhadas no LBCH/BIOAGRO/DVT da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, e sintetizadas com o auxílio do "Instituto de Inmunologia del Hospital San Juan de Dios", hoje chamado "Fundación Instituto de Inmunologia de Colômbia (FIDIC)", em Bogotá, Colômbia. Estes peptídeos foram catalogados pelo livro de seqüências como 4822 (a.a. 398-411), 4823 (a.a. 21-35) e 4824 (a.a. 132-145), os quais foram hibridizados para obter um só peptídeo, listado como SBm4912¹ (seqüência 4822-4823-4824), que tem duas cisteínas nos terminais para polimerização do mesmo, evitando assim, o uso de moléculas carreadoras para ativação da resposta imunológica.

O peptídeo sintético SBm4912 foi avaliado, experimentalmente, como imunógeno para o controle de *B. microplus* em bovinos da raça Hereford estabulados, por OLIVEIRA (1998) no LBCH/DVT/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, utilizando-se três doses de 2,0 mg do peptídeo e 1,5 mg de saponina, obtendo-se 23,45% de redução no número de teleóginas, 8,4% na queda do peso médio das teleóginas e 10,32% do peso médio da oviposição, segundo as fórmulas descritas por DE LA FUENTE (1995). Também foram demonstradas as interações *in situ* dos anticorpos no epitélio intestinal das teleóginas e as lesões produzidas por essas interações.

Devido a problemas com hidrossolubilidade e procurando-se aumentar a imunogenicidade, os mesmos laboratórios desenvolveram outros dois peptídeos,

¹ Pedido de Patente Nacional = PI 0001717-5. Pedido de Patente Internacional = PCT/BR01/00057

denominados Sbm7462² (sequência 4822-4824-4823) e SBm19733 (sequência 4822-4823-4824), contendo pontes KEK entre as referidas sequências, também baseado na estrutura da Bm86. PATARROYO *et al* (2002), compararam a eficiência dos peptídeos sintéticos SBm4912, SBm7462 e SBm19733, adicionados ao adjuvante saponina, inoculando-os em animais da raça Jersey, seguindo o modelo experimental de OLIVEIRA (1998), obtendo as seguintes eficácias ($p < 0,01$): 72,4% para o peptídeo SBm4912, 81,05% para o SBm7462 e 35,87% para o SBm19733, analisando-se a redução no número e peso das teleóginas, queda no peso dos ovos e diminuição da fertilidade, segundo as fórmulas de DE LA FUENTE (1995):

$$\mathbf{DT (\%) = 100 [1-(NTV/NTC)]}$$

Sendo:

DT (%) = porcentagem de redução do número de teleóginas;

NTV = número de teleóginas para cada grupo vacinal;

NTC = número de teleóginas no grupo controle.

$$\mathbf{DR (\%) = 100 [1-(PMTV/PMTC)]}$$

Sendo:

DR (%) = porcentagem de redução do peso médio das teleóginas;

PMTV = peso médio das teleóginas para cada grupo vacinal;

PMTC = peso médio das teleóginas no grupo controle.

$$\mathbf{DO (\%) = 100 [1-(PMOV/PMOC)]}$$

Sendo:

DO (%) = porcentagem de redução do peso médio dos ovos;

² Pedido de Patente Nacional = PI 0001717-5. Pedido de Patente Internacional = PCT/BR01/00057

PMOV (%) = peso médio dos ovos para cada grupo vacinal;

PMOC(%) = peso médio dos ovos no grupo controle.

$$DF (\%) = 100 [1-(PPLOV/PPLOC)]$$

Sendo:

DF (%) = redução na fertilidade dos ovos;

PPLOV = peso médio das larvas por grama de ovos em cada grupo vacinal;

PPLOC = peso médio das larvas por grama de ovos no grupo controle.

$$EF (\%) = 100 [1-(CRT \times CRO \times CRF)]$$

Sendo:

EF (%) = eficácia do imunógeno;

CRT = redução no número de fêmeas adultas (1 – DT)

CRO = redução na capacidade de ovipostura (1 – DO)

CRF = redução na fertilidade (1 – DF).

Tanto as interações *in situ* dos anticorpos produzidos no intestino dos carrapatos, quanto as lesões produzidas pelos mesmos, foram confirmadas para os peptídeos SBm4912 e SBm7462.

PIMENTEL (2002) analisou o peptídeo SBm7462 em bovinos jovens *Bos taurus taurus* mestiços Gir-Holandês, com média de grau de sangue de 91,16% (H/Z), por meio de teste misto, campo e estábulo, adicionado ao adjuvante saponina, e encontrou uma eficácia de 53,29% para a dose de 2 mg e de 15,8% para a dose de 1 mg, segundo as fórmulas de DE LA FUENTE (1995). A cinética de anticorpos para os referidos peptídeos foi mensurada pelo ELISA adaptado para uso com peptídeos sintéticos, o qual demonstrou que logo após a segunda inoculação o SBm7462 adicionado à saponina (nas doses de 1,0 e 2,0 mg) elicitou uma produção de anticorpos estatisticamente superior aos grupos controles. A resposta imune

humoral se mostrou com maiores níveis de IgG em resposta secundária, o que foi muito evidente após a terceira inoculação e com uma manutenção desses anticorpos a níveis estatisticamente diferentes até a 19ª semana entre os grupos vacinados e o controle e, estatisticamente iguais para 1,0 mg e 2,0 mg em quase todos os pontos de coleta.

3.3. Adjuvantes

Adjuvante, do latim *adjuvare*, ajudar. Como definiu EDELMAN (1998), adjuvante é uma substância usada em combinação com um antígeno específico de modo que se produz mais imunidade do que usando-se somente o antígeno. Segundo ALEXANDER & BREWER (1995), num sentido amplo, um adjuvante imunológico pode ser descrito como uma substância que age não especificamente para aumentar a resposta a um antígeno. Segundo AUCOUTURIER *et al.* (2001), muitos adjuvantes têm sido usados desde 1925, quando RAMON (1925) demonstrou a possibilidade de se aumentar artificialmente a resposta imune contra antígenos específicos, ao conseguir elevar artificialmente os níveis das antitoxinas diftéricas e tetânicas adicionando substâncias como ágar, sais metálicos, lecitina ou saponina

A função dos adjuvantes é aumentar a resposta imune específica a antígenos vacinais e, principalmente para vacinas anti-parasitárias, estes podem seletivamente aumentar diferentes componentes da resposta imune tais como um isotipo particular de anticorpos ou imunidade mediada por células (BOMFORD, 1989).

Até recentemente os únicos adjuvantes aprovados para uso eram os compostos de alumínio em seres humanos (MEN *et al.*, 1996), e os compostos de alumínio e os óleos minerais em Medicina Veterinária (Veterinary Formulary, 1994). Apesar de serem bons estimuladores da produção de anticorpos, esses adjuvantes são, geralmente, pobres estimuladores de linfócitos T. Uma boa resposta

imune celular é, contudo, essencial para o sucesso no controle de um grande número de doenças, particularmente as causadas por parasitas e viroses (BOMFORD, 1989). Adjuvante completo de Freund (FCA), uma emulsão de água em óleo contendo micobactérias mortas, é ideal neste sentido, gerando um vasto espectro de respostas imunológicas aos antígenos (BOMFORD, 1980). Contudo, FCA é inadequado até para vacinas veterinárias já que é elevadamente tóxico, podendo causar inflamação crônica e complicações autoimunes (EDELMAN, 1980; WARREN & CHEDID, 1988). Portanto, em anos recentes um grande número de pesquisas têm sido direcionadas ao desenvolvimento de novos adjuvantes, que tenham a eficácia mas não os efeitos adversos do FCA (ALEXANDER & BREWER, 1995). Mais recentemente, dois novos adjuvantes passaram a ser utilizados clinicamente no homem. Detox foi aprovado para uso em seres humanos no Canadá, como um componente de uma vacina contra o melanoma, a Corixa's Melacine®. Trata-se de uma combinação de CWS e MPL® (um adjuvante derivado de lipolissacarídeos da *Salmonella minnesona*, que juntamente com o Detox são descritos como uma nova classe de adjuvantes sintéticos, coletivamente chamados aminoalkyl glucosaminide phosphates – APGs) (KENNEY *et al.*, 2002). O segundo trata-se do MF59, uma emulsão adjuvante composta de esqualeno, polisorbato 80 (Tween 80) e sorbitan trioleate (Span 85) que, por ter mostrado um potente efeito adjuvante, juntamente com um bom perfil de segurança, em grupos variando de idosos a recém-nascidos, foi licenciado na Europa para uso com a primeira vacina para influenza com adjuvante a ser utilizada em idosos. (ENGERS *et al.*, 2003).

Para AUCOUTURIER *et al.* (2001), os adjuvantes exercem uma importante função na eficácia das vacinas à medida que os antígenos tornam-se mais e mais purificados. De fato, proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos são mais seguros que microrganismos íntegros inativados, porém menos imunogênicos. Observação semelhante é feita por AGUADO *et al.* (1999) ao afirmarem que, a necessidade de novos adjuvantes torna-se clara com a introdução de peptídeos recombinantes e sintéticos candidatos à vacinas, muitos dos quais provaram ser

pobrememente imunogênicos, e com a constatação de que os adjuvantes de alumínio são pobrememente indutores de Th1 e resposta por células T citotóxicas.

3.3.1. Mecanismos de ação dos adjuvantes:

Suas ações não são ainda muito claras e se baseiam em diferentes mecanismos (AUCOUTURIER *et al.*, 2001).

3.3.1.1. Geração de depósito

Teoria bastante antiga proposta por GLENNY *et al* (1931). De acordo com SCHINJS (2002), adjuvantes tais como emulsões de óleo, sais de alumínio e partículas de polímeros ou lipídeos retêm o antígeno no local da injeção, fazendo com que diminutas quantidades de antígeno sejam liberadas por um prolongado período, o que resulta na manutenção de ativação de células T prevenindo uma resposta de curta duração.

Para COX & COULTER (1997) este depósito pode ser de curta ou de longa duração. O primeiro pode ser representado pelos sais de alumínio e pelas emulsões w/o. Acredita-se que este tipo de adjuvante libera o imunógeno por um período não superior a oito-dez dias. Adjuvantes de longa duração são elaborados usando-se polímeros sintéticos, tais como as microesferas PLGA, gerando tempos de liberação que variam de um-seis meses.

3.3.1.2. “ Targeting ”

É definida como a habilidade de um adjuvante em liberar um imunógeno para células efectoras, geralmente via células apresentadoras de antígeno (APCs) (COX & COULTER, 1997). Segundo MARCIANI (2003), adjuvantes particulados ligam-se aos antígenos, formando agregados que são englobados por APCs via endocitose para formar endossomos. Mais efetivo “targeting” é conseguido usando-se adjuvantes com resíduos que são reconhecidos por receptores nas APCs, como por exemplo os resíduos de manose.

3.3.1.3. Interface de superfície

Outra forma de ação dos adjuvantes está relacionada à propriedade de que alguns têm uma atividade de superfície ou a posse de uma interface de superfície. Trabalhos recentes com polímeros surfactantes bloqueadores preparados em emulsões óleo em água reforçam a íntima associação entre superfície e adjuvanticidade. Essa superfície relativamente hidrofóbica concentra antígenos e proteínas hospedeiras (imunoglobulinas) e efetivamente exhibe-as às células do sistema imune (HUNTER *et al.*, 1981; HUNTER & BENNET, 1984).

3.3.1.4. Imunomodulação

A imunomodulação refere-se à habilidade de muitos adjuvantes em modificar a rede de citocinas, podendo resultar em um aumento geral da função do sistema imune; porém, mais comumente resulta no aumento dos níveis de certas citocinas e a concomitante diminuição de outras (COX & COULTER, 1997).

3.3.1.5. Efeitos na expressão do MHC classe II

Neste caso, há a potencialização da resposta imune por meio de ações na expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) em células apresentadoras profissionais (células dendríticas e células de langerhans), em células B e, possivelmente também em macrófagos (COX & COULTER, 1997), em que certos adjuvantes podem agir por meio de aumento na regulação da expressão de MHC II, aumentando a apresentação de antígenos às células T (ALEXANDER & BREWER, 1995).

3.3.1.6. Função co-estimulatória

Esta refere-se a uma importante função co-estimulatória na ativação de células T, sendo esta atividade não específica ao antígeno (ALEXANDER & BREWER, 1995). É conseguida utilizando-se adjuvantes produzidos com citocinas, onde podem ser citadas as interleucinas IL-1, IL-4, IL-5 e IL-12. IL-1, por exemplo, é um co-estimulador essencial para a proliferação de células CD4+ subtipo Th2, associadas com uma maior produção de anticorpos. Já a IL-12 está envolvida na geração de células CD4+ subtipo Th1, que está associado com a geração de uma imunidade mediada por células. Apesar dos estudos encorajadores com vacinas veterinárias, o uso dessas substâncias apresenta o inconveniente de que *in vivo* a sua meia-vida seja bastante curta. Uma alternativa seria utilizá-las juntamente com sistemas de liberação lenta (ALEXANDER & BREWER, 1995).

3.3.1.7. Mudanças no tráfego celular

Muitos adjuvantes atraem células mononucleares para o local de injeção (formação de granuloma) e fazem com que se acumulem linfócitos no linfonodo drenante (confinamento linfocítico). Essas ações teoricamente aumentariam a probabilidade de efetiva interação entre antígeno e APCs ou linfócitos antígeno-específicos. O aumento de recrutamento destas células é devido à capacidade que alguns adjuvantes têm em ativar complemento. (BOMFORD, 1989; ALEXANDER & BREWER, 1995).

3.3.1.8. Capacidade de apresentação

É definida como a habilidade de um adjuvante em preservar a integridade conformacional de um antígeno e apresentá-lo a células imunes efectoras apropriadas. Ocorre quando um adjuvante é capaz de interagir com um antígeno de tal forma que os epítomos conformacionais são mais efetivamente mantidos, aumentando assim, a atividade *in vivo* e o tempo de estocagem. Essa apresentação antigênica confere três principais benefícios: maximização da quantidade de anticorpos conformacionalmente relevantes (neutralizantes), influência na afinidade dos anticorpos e na duração da resposta imune (COX & COULTER, 1997).

3.3.1.9. Ativação do complemento

Adjuvantes como o hidróxido de alumínio ativam complemento, o que poderia contribuir para a quimioatração de monócitos e sua ativação, e também facilitar a deposição de antígeno nas células dendríticas dos folículos linfóides que

exibem receptores para complemento e são responsáveis pela geração de células B de memória (BOMFORD, 1989; HUNTER, 2002).

3.3.1.10. Indução de resposta T citotóxica por células CD8+ (CTL)

Para um adjuvante ser útil para indução de CTL, ele deve facilitar a incorporação ou persistência de peptídeos apropriados a nível de MHC-I. Isso pode ser conseguido de duas formas: o adjuvante interagir de alguma forma com a membrana celular de modo que o antígeno associado com o adjuvante seja depositado dentro do citosol em uma forma adequada para processamento no proteossoma. Isso pode ocorrer por fusão com a membrana externa ou por endocitose/pinocitose seguida de fusão da membrana endossômica ou ruptura (escape endossomal) (COX & COULTER, 1997). Alternativamente, PARTIDOS *et al.* (1996) sugerem a possibilidade de indução de CTL por direta ligação do antígeno ao MHC-I vazio externamente exposto.

3.3.1.11. Ação sobre receptores da resposta imune inata

O DNA pode também ser utilizado como adjuvante. De acordo com KRIEG *et al.* (1999) apesar do DNA ser mais comumente conhecido como a “planta da vida”, ele pode também ter outras atividades biológicas distintas da sua capacidade para codificar genes. Diferentemente do DNA de vertebrados, o bacteriano induz proliferação de células B e secreção de imunoglobulinas e citocinas. A ativação linfocítica é causada por dinucleotídeos CpG não metilados, que estão presentes em uma frequência esperada de 1:16 (um por dezesseis) dinucleotídeos no DNA bacteriano, porém subrepresentados (supressão da CpG) e metilados no DNA dos vertebrados. Ativação de células B pode também ser

desencadeada por oligodeoxynucleotídeos sintéticos (ODNs), que contém um dinucleotídeo CpG não metilado no contexto de uma sequência específica. As moléculas CpG têm sido usadas a nível experimental tanto com vacinas baseadas em antígenos convencionais, quanto com as vacinas de DNA (KRIEG *et al.*, 1998).

3.3.2. Classificação

Diferentes critérios são usados para agrupar os adjuvantes (COX & COULTER, 1997). Neste mesmo trabalho, os autores propuseram dividi-los em particulados e não particulados. Os primeiros existem como partículas microscópicas e devem parte da sua atividade adjuvante a esta propriedade. Como exemplos principais podemos citar os sais de alumínio, as emulsões w/o e o/w, ISCOMs, lipossomos e micropartículas. Já os adjuvantes não particulados geralmente são imunomoduladores, apesar de possuírem alguma habilidade em liberar um imunógeno para células efectoras (capacidade de “targeting”). Muramyl dipeptide (MDP) e derivados, blocos copolímeros não-iônicos, saponinas, lipídio A, citocinas, polímeros carboidratos, toxinas bacterianas são alguns exemplos.

Para ALEXANDER & BREWER (1995) a mais lógica classificação dos adjuvantes seria a proposta por WOODARD (1990), em que os adjuvantes seriam divididos, com base em suas características físicas, em três principais grupos: adjuvantes surfactantes, adjuvantes vesiculares e adjuvantes solúveis em água. Hidróxido de alumínio, saponina, ISCOMs são classificados como adjuvantes surfactantes. No grupo dos adjuvantes vesiculares podemos citar as emulsões w/o como os adjuvantes completo (FCA) e incompleto (FIA) de Freund e as emulsões w/o.

MARCIANI (2003) propõe duas novas alternativas para classificação dos adjuvantes. Em vez de classificá-los com base em suas propriedades químicas e físicas, propõe classificá-los de acordo com a resposta imunológica que

proporcionam. Na primeira alternativa, os adjuvantes seriam classificados de acordo com a sua capacidade em estimular uma imunidade Th1 ou Th2, sendo depois subclassificados de acordo com a sua estrutura química. Na segunda alternativa, os adjuvantes poderiam ser classificados de acordo com a sua capacidade em estimular uma imunidade inata ou adaptativa, sendo isso demonstrado por diferenças significantes em seus receptores celulares e mecanismos de ação.

3.3.3. A saponina como adjuvante

Saponinas é um grupo heterogêneo de esteróis glicosídeos e triterpenóides glicosídeos que estão presentes em uma ampla variedade de plantas, distribuídas pela casca, folhas, caule, raízes e flores (MILGARTE & ROBERTS, 1995). As comercialmente obtidas são de quatro fontes principais: *Smilax ornata*, *Gypsophila paniculata*, *Saponaria officianalis* e *Quillaia saponaria* (BARR *et al.*, 1998).

A moderna tendência no desenvolvimento de vacinas em direção ao uso de proteínas recombinantes altamente purificadas, as quais são pobremente imunogênicas quando administradas de forma isolada ou em combinação com sais de alumínio, tem direcionado a pesquisa ao adjuvante saponina, o qual tem a habilidade de estimular a resposta mediada por células, assim como aumentar a produção de anticorpos (BARR *et al.*, 1998). As saponinas são estimuladores de linfócitos B “*in vitro*” (DALSGAARD *et al.*, 1999) e, “*in vivo*” há evidências de efeito imunoestimulatório inespecífico; a administração oral de saponina em cobaios elicitou efeito imunoestimulatório inespecífico, assim como cobaios vacinados intraperitonealmente contra raiva mostraram maior resistência a desafios após administração oral de saponina (CHAVAL & CAMPBELL, 1987).

Quanto ao seu modo de ação, BAR *et al.* (1998) citam “targeting”, apresentação antigênica, a imunomodulação e a indução de resposta T citotóxica.

SCOTT *et al.* (1985) acrescentam ainda o aumento da retenção do antígeno no local da inoculação (geração de depósito).

3.3.4. Microesferas biodegradáveis como sistemas de liberação lenta

Para serem usados a campo, os adjuvantes devem aumentar a resposta imune específica contra patógenos e melhorar a proteção; devem ser estáveis e seguros já que efeitos secundários podem ter impacto no crescimento e conforto dos animais, no índice de reprodução, ou causar danos nas carcaças; devem também ser fáceis de usar e terem uma boa relação custo-benefício; um bom adjuvante deve permitir uma redução da dose ou da concentração antigênica, diminuindo o custo da vacina. (AUCOUTURIER, 2001).

O'HAGAN *et al.* (2001) afirmaram: “O mais apropriado adjuvante para uso com um determinado antígeno vacinal depende em grande parte do tipo de resposta imune que é requerida para a imunidade protetora.”

“Antígenos encondidos” podem ser definidos como proteínas que ficam normalmente fora do alcance do sistema imune do hospedeiro, quando da relação hospedeiro-parasita, mas que, ao serem inoculadas neste, elicitam uma resposta imune protetora contra o parasita (ACKERMAN *et al.*, 1980). Para estes tipos de antígeno, a provável falta de reforço durante a exposição natural aos parasitas acarreta um problema imunológico, a saber a manutenção da resposta protetora. Uma vez que nos poucos casos estudados esta resposta é puramente anticorpo (e possivelmente complemento) dependente, e a eficácia da vacina depende da manutenção de elevados e constantes níveis de anticorpos. Atualmente, isso só pode ser feito por meio do uso de adjuvantes e algum progresso na tecnologia adjuvante aumentaria a eficácia das vacinas. (WILLADSEN, 1999).

Uma promissora tecnologia para potencializar características imunogênicas de antígenos é a microencapsulação em polímeros biodegradáveis

(HILBERT *et al.*, 1999). Sistemas de liberação poliméricos consistem de polímeros que liberam seu conteúdo de forma contínua através do tempo. Sistemas de liberação controlada permitem uma liberação contínua ou pulsátil de antígenos encapsulados, promovendo benefícios como a liberação para um local específico, a proteção do antígeno da degradação, o maior conforto para o paciente, desde que há uma diminuição do número de doses requeridas, e dose antigênica mais eficiente, o que pode eliminar a necessidade de “boosters” (LIMA & RODRIGUES JUNIOR, 1999; PEREZ *et al.*, 2002). Isso é especialmente aplicável à produção pecuária, onde a administração de vacinas para um vasto número de animais é logisticamente desafiadora, trabalhosa, estressante, e portanto contra-produtiva para os animais (BOWERSOCK & MARTIN, 1999).

PRELS & LANGER (1979) introduziram a tecnologia dos liberadores lentos no campo da imunização, quando demonstraram, experimentalmente em camundongos, que uma única dose de um antígeno encapsulado em um polímero inerte, com menos de 1mm de diâmetro, promovia títulos humorais comparáveis aos elicitados pelo mesmo antígeno emulsificado com adjuvante completo de Freund. Estes títulos mantiveram-se por mais de seis meses.

Dentre os polímeros biodegradáveis comercialmente disponíveis, destacam-se os poliésteres derivados dos ácidos láctico e glicólico (PLGA) (LIMA & RODRIGUES JUNIOR, 1999). Esses polímeros são quase sempre utilizados como nanoesferas ou microesferas (MURAKAMI *et al.*, 2000). As primeiras apresentam um diâmetro que varia de 10nm a 1000nm, enquanto as microesferas variam de 1 μ m a 100 μ m segundo COX & COULTER (1997), 1 μ m a 200 μ m por BOWERSOCK & MARTIN (1999) e 1 μ m a 250 μ m de acordo com LIMA & RODRIGUES JUNIOR (1999).

Microesferas PLGA são formadas principalmente de dois modos. Emulsificação simples (o/w) ou múltipla emulsão água – em – óleo – em – água (w/o/w) seguida de eliminação por solvente, sendo este último método o mais empregado para encapsulação de proteínas (PEREZ *et al.*, 2002). Trata-se de um

método simples, de fácil transposição para escala industrial e cuja realização em condições assépticas garante a estabilidade final do produto (LIMA *et al.*, 2000). THOMASIN *et al.* (1998) define os vários estágios desse processo microscopicamente. Os dados deste trabalho sugerem que as interações moleculares entre polímeros, solventes e o agente acumulador dirigem a formação das microesferas. Microesferas secas podem ser ressuspensas em um meio aquoso viscoso e injetadas pelas vias parenteral, oral e intranasal. Microesferas desse tipo provêm vantajosa liberação pulsátil de proteínas usadas como vacinas e podem induzir elevados títulos de anticorpos os quais persistem por mais de um ano após a imunização.

No que diz respeito a resposta imune estimulada, a adjuvanticidade das microesferas provou ser muito eficiente em termos de resposta Th1 e Th2, assim como em prolongar a apresentação antigênica e a manutenção da proteção em modelos animais. Além da estimulação da proliferação de células T específicas, há a indução de um forte resposta por anticorpos (ENGERS, 2003). A capacidade adjuvante das microesferas é devida principalmente à sua habilidade de formar depósitos de antígenos, de onde são lentamente liberados durante um longo período de tempo, em comparação com o antígeno que é administrado na forma livre; capacidade de “targeting” e a proteção do antígeno por armazenamento, com uma lenta liberação dos antígenos restantes, o qual podem eliminar a necessidade de um “booster” (GANDER *et al.*, 1997; KISSEL *et al.*, 1991; LIMA & RODRIGUES JUNIOR, 1999).

Inúmeras são as suas vantagens. Podem estabilizar proteínas; podem ser preparadas com diâmetros que facilitem sua fagocitose por macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno; por proteger o imunógeno microencapsulado da degradação, podem ser administradas oralmente, oferecendo a possibilidade de induzir imunidade mucosal específica (JONES *et al.*, 1995).

Outra grande vantagem desses adjuvantes é quanto à sua segurança. De acordo com DENG *et al.* (1999), polylactide (PLA) e seu copolímero polylactide-

co-glycolide (PLGA) são largamente conhecidos como polímeros biodegradáveis que não causam efeitos adversos significantes no sangue e tecidos, assim como os produtos de degradação são eliminados ou metabolizados facilmente. São também muito estáveis após produzidas e liofilizadas, o que faz com que possam ser utilizadas em situações onde a refrigeração não é facilmente disponível. Outra vantagem que pode ser citada seria o fato destes polímeros terem sido aprovados pelo FDA para uso em seres humanos como suturas absorvíveis (BOWERSOCK & MARTIN, 1999). Também, por serem quimicamente definidas, a liberação do antígeno é uniforme e reproduzível (LIMA & RODRIGUES JUNIOR, 1999).

Quanto à resposta imunológica, apresentam vantagens que incluem potencialização da resposta imune, redução no número de inoculações requeridas, assim como da quantidade total de imunógeno necessária para gerar uma boa resposta imune (ROSAS *et al.*, 2001). Estes mesmos autores, utilizando como antígeno o peptídeo sintético SPf66, derivado de merozoítos e circunsporozoítos de *Plasmodium falciparum*, encapsulado em microesferas PLGA, verificaram um aumento da resposta imune humoral induzida pelo SPf66 quando encapsulado em microesferas PLGA, mesmo com uma simples imunização, sugerindo a possibilidade de simplificação dos esquemas de imunização. Neste trabalho verificaram também que a resposta foi similar a do adjuvante completo de Freund.

IGARTUA *et al.* (1998), utilizaram BSA (soro albumina bovina) como imunógeno nas seguintes formulações: enclausurado em microsferas PLGA, em solução salina, emulsificado com adjuvante completo de Freund (FCA), e ainda um grupo controle com as microsferas vazias. Verificaram que os níveis de IgG BSA-específicos para o BSA encapsulado nas microsferas PLGA foram significativamente maiores do que aqueles da proteína em solução, mesmo quando a dose administrada foi dez vezes menor, quando da administração destes por via subcutânea. Ainda os mesmos autores concluíram que a atividade adjuvante das microsferas encontrada foi comparada a do FCA, porém, ao contrário deste, estas são biocompatíveis e não induzem nenhuma reação adversa no local da injeção.

Acrescentam, também, que após 20 semanas a resposta desapareceu em alguns camundongos e em outros houve um significativo decréscimo nos níveis de anticorpos para o BSA solúvel, tendo sido mantida a resposta ao antígeno microencapsulado. Estes resultados estão de acordo com os de O' HAGAN *et al.* (1993), que trabalhando com ovoalbumina (OVA) encapsulada em microesferas PLGA, verificou que os níveis de IgG OVA-específicos permaneceram altos durante todo o decorrer do estudo (1 ano).

PARTIDOS *et al.* (1996) demonstraram, experimentalmente, a capacidade das microesferas PLGA em promoverem uma forte resposta celular. Os resultados deste estudo demonstram que uma simples imunização parenteral com um epítipo de células T citolíticas (CTL) em microesferas PLGA pode preparar *in vivo* células efectoras capazes de matar células-alvo marcadas com peptídeo ou infectadas com o vírus do sarampo, por um período de quatro meses após a imunização. MEN *et al.* (1997) também encontrou um potente efeito adjuvante e/ou imunoestimulante com microesferas biodegradáveis na eliciação de uma resposta imune mediada por células.

Os excelentes resultados proporcionados pelas microesferas PLGA não se limitam à administração parenteral. CARCABOSO *et al.* (2003), trabalhando com o peptídeo sintético SPf66, em camundongos, verificaram haver significantes títulos de IgG, superiores às soluções vacinais por via oral e similares à vacinação por via parenteral utilizando-se sais de alumínio como adjuvante.

Diversos outros estudos demonstram uma forte resposta imune utilizando-se diferentes antígenos microencapsulados em microesferas biodegradáveis: ELDRIDGE *et al.* (1991), ALONSO *et al.* (1994), JONES *et al.* (1995), MEN *et al.* (1995), MEN *et al.* (1996), PARTIDOS *et al.* (1996), AUDRAN *et al.* (1998), McKEEVER *et al.* (2002).

As vacinas utilizadas contra carrapatos promovem redução na número de teleóginas, no peso destas e dos seus ovos e na taxa de eclodibilidade. A principal hipótese para explicar essas alterações seria a interação de fatores existentes no

sangue dos animais inoculados, os quais poderiam ser representados pelos anticorpos, por proteínas do complemento e, provavelmente por citocinas, com as proteínas de membrana das células digestivas, reduzindo a capacidade digestiva do carrapato, seu ingurgitamento e consequente conversão de componentes sanguíneos em vitelogenina (BALASHOV, 1972; SONENSHINE, 1991), a substância que é responsável pela nutrição do embrião e da larva; sua falta seria o principal fator de diminuição do peso dos ovos e da eficiência de eclodibilidade (PORTELA, 2000). Portanto, se poderia deduzir que um adjuvante que promova elevados e constantes níveis de anticorpos anti-SBm7462 potencializaria a eficácia deste peptídeo no controle do *B. microplus*.

Baseado no anteriormente exposto: altos níveis de anticorpos requeridos pelos “antígenos escondidos”, juntamente com as hipóteses para o mecanismo de ação das vacinas contra o *B. microplus* se basearem, principalmente, na ação de anticorpos - em contrapartida altos níveis de anticorpos conferidos pelas PLGA em diversos experimentos; além de outras vantagens deste sistema de liberação como: diminuição do número de doses/quantidade; aumento da imunogenicidade; e não toxicidade; é que se propôs testar as microesferas PLGA em camundongos, esperando-se que no futuro este sistema de liberação possa ser adicionado em uma formulação comercial ao peptídeo sintético SBm7462, potencializando a sua eficácia no combate ao carrapato *B. microplus*.

Assim, este trabalho visou verificar se é possível aumentar a eficácia do peptídeo SBm7462, utilizando as microesferas PLGA, em termos de produção de anticorpos, em camundongos utilizados como modelo experimental

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Peptídeo SBm7462

Como imunógeno foi utilizado o peptídeo sintético SBm7462. Este peptídeo é constituído de 47 resíduos de aminoácidos e é derivado da estrutura da proteína Bm86. Foi desenhado no LBCH/BIOAGRO/DVT da Universidade Federal de Viçosa e sintetizado com o auxílio da “Fundação Instituto de Imunologia da Colômbia (FIDIC)” em Bogotá, Colômbia, sob condições GMP (“Good Manufacture Procedure”), empregando a técnica de síntese em fase sólida descrita por MERREFIELD (1963) e modificada por HOUGHTEN (1985), de acordo com a técnica t-Boc.

4.2. Peptídeo SPf66

Este peptídeo foi utilizado para se comparar a resposta do SBm7462 encapsulado em microsferas PLGA com outro peptídeo sintético já testado com o referido liberador. O SPf66 é constituído de 45 aminoácidos e é derivado de sequências de fragmentos protéicos de merozoítos e circunsporozoítos de

Plasmodium falciparum. Foi produzido sob condições GMP na “Fundação Instituto de Imunologia da Colômbia (FIDIC)” em Bogotá, Colômbia, utilizando a técnica de síntese em fase sólida descrita por MERREFIELD (1963) e modificada por HOUGHTEN (1985), de acordo com a técnica t-Boc.

4.3. Adjuvante

O adjuvante utilizado para comparação com as PLGA foi a saponina (Saponine®¹) na dose de 75µg/animal diluída em água milli Q estéril. Esta mesma quantidade de saponina foi adicionada a 100 µg do peptídeo SBm7462 para inoculação no grupo que recebeu o peptídeo SBm7462 emulsificado com este adjuvante.

4.4. Liberador lento

Foi utilizado o polímero PLGA (poly-D,L-lactide-co-glycolide) Resomer®RG 506 PLGA² com um índice copolimérico 50:50 (porcentagem ácido láctico/glicólico) e uma viscosidade intrínseca de 0,8 dl/g.

4.5. Animais utilizados

Foram utilizados 120 camundongos BALB/c, com oito a dez semanas de idade, pesando em torno de 20 gramas. Os animais foram gentilmente cedidos pelo professor Carlos Orlategui Chaves e obtidos do biotério da Universidade Federal de

¹ Saponine® UCB Leuven-Belgium

² Boehringer Ingelheim K.G. (Ingelheim, Germany)

Minas Gerais (UFMG). Estes receberam *ad libitum* água e ração comercial peletizada com composição nutricional adequada para esta espécie animal durante o decorrer do estudo.

4.6. Local do estudo

Durante todo o decorrer do experimento, os animais permaneceram em uma sala totalmente climatizada de forma a proporcionar um maior conforto térmico (20-24°C) e de umidade (45-75%). Os 120 animais foram divididos em seis grupos de 20, cada grupo em uma gaiola, com um regime diário de luz artificial de 12 horas.

4.7. Preparação das microesferas

As microesferas contendo os peptídeos SBm7462 e SPf66 foram preparadas a partir de PLGA 50:50 (% ácido láctico/glicólico) por meio da técnica de extração por solventes/emulsão dupla (w/o/w) utilizando PVA (álcool polivinílico) como um estabilizador. Em síntese, 250 mg de PLGA foram dissolvidos em 5 mL de diclorometano e emulsificados com 250 mL de uma solução aquosa 10% dos referidos peptídeos por sonicação durante 30 segundos a 50 W. A emulsão resultante foi vertida em 25 mL de solução aquosa de PVA 8% em 1mM de tampão HEPES pH 7,5 e emulsificada durante 5 minutos a 9500 rpm utilizando uma turbina homogeneizadora para formar a emulsão dupla (w/o/w). Finalmente, 50 mL de uma solução de isopropanol a 2% foi adicionada e agitou-se por uma hora. As microesferas foram coletadas por centrifugação a 10000g, e ressuspensas em água destilada, sendo este último procedimento repetido três vezes. As microesferas puras foram congeladas a seco.

4.8. Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para observar a morfologia e aparência da superfície das microesferas. Foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. O protocolo utilizado foi o da rotina deste instituto.

4.9. Determinação do tamanho médio das microesferas

O tamanho médio das microesferas foi determinado por difração de raios laser utilizando-se de um contador Coulter® LS130. A análise foi realizada na Faculdade de Farmácia da Universidade do País Basco - Espanha.

4.10. Mensuração da eficácia da microencapsulação

O total de peptídeo microencapsulado foi estimado por meio do teste do ácido bicinonínico (BCA), após a disrupção das microesferas com uma solução de NaOH 0,2 M. A eficiência da encapsulação (%) foi calculada por meio da carga peptídica obtida (w/w) e da carga teórica do peptídeo (10%) nas microesferas, utilizando a seguinte fórmula:

$$Ec (\%) = (L_A / L_T) \times 100$$

Onde:

Ec: eficiência de encapsulação

L_A: carga peptídica obtida das microesferas

L_T: carga teórica do peptídeo nas microesferas

O peptídeo associado à superfície foi avaliado por meio de suspensão das micropartículas em 20 Mm de solução salina fosfatada pH 7,4 e incubação a 37°C sob contínua rotação orbital por 30 minutos. As microesferas foram sedimentadas por centrifugação e o sobrenadante analisado para pesquisa do SBm7462 e do SPf66 pelo teste do ácido bicinconínico. O peptídeo associado à superfície representa a porcentagem de peptídeo total acumulado, o qual está presente na superfície das microesferas e, conseqüentemente, disponível para liberação inicial.

4.11. Estudos de liberação *in vitro*

Foram feitos para verificar a liberação dos peptídeos das microesferas. Resumidamente, 20 mg de microesferas foram colocados em tubos de teste contendo 2 mL de solução salina fosfatada 20 mM, pH 7,4 e incubadas a 37°C sob contínua rotação orbital. A intervalos de tempo de sete dias, até 59 dias para o SBm7462 e até 63 dias para o SPF66, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e quantificado usando o teste do ácido bicinconínico. O estudo da liberação do peptídeo foi continuado depois da substituição com o mesmo volume de solução nova. Padrões de liberação do peptídeo foram gerados para cada formulação das microesferas em termos de liberação cumulativa versus tempo.

O peptídeo associado à superfície, o qual está disponível para liberação inicial, foi determinado como descrito no ítem 4.9.

4.12. Análise da integridade dos peptídeos SBm7462 e SPf66 por HPLC-SEC e por HPLC-RP

Para confirmar a integridade dos peptídeos após o processo de microencapsulação, as microesferas congeladas foram dissolvidas em cloreto de

metileno e os peptídeos foram extraídos com tampão fosfato salino (SPf66) e NaOH 0,2 N (SBm7462) para que fossem comparados com os peptídeos nativos. No caso do SPf66, as análises foram feitas por exclusão cromatográfica (HPLC-SEC) na coluna Superdex® 75 HR 10/30 usando eluição isocrática com carbonato de amônia pH 7,7 durante 40 minutos a um índice de escoamento de 1 mL/minuto, com detecção a 210 nm (SPf66). Para o SBm7462, utilizou-se da cromatografia de fase reversa (HPLC-RP).

4.13. Análise da estabilidade do peptídeo SBm7462 por dicroísmo circular

Esta técnica foi utilizada para verificar a conformação estrutural do peptídeo SBm7462 nativo e após encapsulação. Resumidamente, foi executada da seguinte forma: preparou-se uma solução mãe (2 mM) do peptídeo em água-acetonitrilo (1:1), solvente em que este peptídeo é completamente solúvel. A partir desta solução foram preparadas diluições do peptídeo (μM) em água e em trifluoroetanol/água (TFE/água a 30% v/v). Os espectros foram tomados utilizando-se os seguintes parâmetros:

Temperatura: 20°C	Sensibilidade: alta
Inclinação de dados: 0,2 nm	Comprimento de onda: 260 –190 nm
Largura de banda: 1nm	Velocidade de varredura: 20 nm/minuto
Resposta: 2 segundos	Acumulação: 3

Para análise do peptídeo encapsulado, se fez necessário sua liberação das microesferas com NaOH 0,2 N.

O equipamento utilizado para as análises foi um espectropolarímetro JASCO J-810, da “Fundación Instituto de Inmunologia da Colômbia (FIDIC)”, provido de uma portacubetas termoestável conectada a um banho refrigerante

Neslab. Os espectros foram medidos em cubetas de quartzo cilíndricas (Hellma) de 0,01 cm de passagem de luz; calibrado com ácido d-10-camforsulfônico, com correção da linha base e análise dos resultados mediante um programa Jasco.

4.14. Estabilidade do peptídeo SBm7462 a diferentes pHs

A técnica de dicroísmo circular foi realizada para verificação da estabilidade deste peptídeo a diferentes pHs. O peptídeo foi dissolvido em água destilada-deionizada, ajustando-se o pH com NaOH e HCl. Para observar a estabilidade do peptídeo, a diferentes pHs, se tomou a parte solúvel de cada solução (pH 0,5, pH 12,0 e pH 6,0) e se determinou sua estrutura por dicroísmo circular (como descrito no ítem anterior).

4.15. Protocolo de imunização

Foram utilizados seis grupos de 20 animais, tendo cada grupo mais cinco animais de reserva para reposição. Os animais foram inoculados subcutaneamente, no dorso, a cada três semanas, em um número total de doses igual a três, de acordo com os seguintes tratamentos:

- Grupo I (controle do adjuvante saponina): animais em que foram inoculados 75µg de saponina diluídos em 100µL de água milliQ;
- Grupo II (controle): animais inoculados com 100 µL de água milliQ;
- Grupo III: inoculados com o peptídeo SBm7462 emulsificado com o adjuvante saponina numa proporção de 75µg de saponina para 100µg de peptídeo diluídos em 100µL de água milliQ;
- Grupo IV (controle da PLGA): inoculados com as microesferas vazias;

- Grupo V: animais imunizados com o peptídeo SBm7462 encapsulado nas microesferas PLGA;
- Grupo VI: animais imunizados com o peptídeo sintético SPf66 encapsulado nas microesferas PLGA.

As formulações contendo PLGA eram reconstituídas com PBS pH 7,2 antes do uso e esta solução era administrada em uma dose de 100µL por camundongo (nos tratamentos V e VI esta solução continha 100µg de peptídeo).

4.16. Coleta do sangue dos animais

Os camundongos foram sangrados antes da primeira imunização e a intervalos periódicos (a cada sete dias) durante 21 semanas, através do plexo retro-orbital, sob anestesia com éter. As amostras de sangue foram coletadas sem uso de anticoagulante e depois centrifugadas para a separação do soro, o qual era armazenado a -20°C até a realização de ELISA indireto para detecção de IgGs anti-peptídeos, como também para a realização dos testes de função hepática.

4.17. Detecção de IgGs anti-Sbm7462 e anti-SPf66 por meio da técnica de ELISA indireto

Anticorpos da classe IgG anti-SBm7462 e anti-SPf66 foram detectados pelo ELISA adaptado para peptídeos sintéticos. Resumidamente, as placas de ELISA foram sensibilizadas com uma solução de tampão carbonato pH 9,6 (0,159g Na₂CO₃; 0,293g NaHCO₃; H₂O milli Q q.s.p. 100mL), na qual os peptídeos foram diluídos na quantidade de 1µg/well, deixando-se adsorver a temperatura ambiente por um tempo médio de 12 h. Decorrido este período, as placas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem (9,0g de NaCl; 0,5mL Tween 20, H₂O dd q.s.p.

1000mL), sendo em seguida armazenadas em geladeira por quatro a cinco dias. Passado este período, as placas foram retiradas da geladeira e, após atingirem a temperatura ambiente, foi adicionada a solução de bloqueio – caseína 2% em PBS pH 7,6 (4,25g NaCl; 0,64g Na₂HPO₄; 0,068g NaH₂PO₄.H₂O; H₂O milli Q q.s.p. 500mL) por uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas duas vezes e, posteriormente, adicionou-se 200µl/well dos soros dos animais do experimento diluídos 1:100 em tampão de incubação (87,5 mL de PBS pH 7,6; 12,5 mL de caseína 2% em PBS pH 7,6; 50µL de Tween 20), deixando-se incubar por duas horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem e procedeu-se a incubação, por duas horas, à temperatura ambiente, do anticorpo secundário – IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (Sigma®⁴ título 1:40.000), diluída em tampão de incubação, no volume de 100µL/well. As placas foram lavadas seis vezes com tampão de lavagem e adicionou-se a solução reveladora no volume de 100µL/well, composta de 20mL de tampão substrato (7,19g Na₂HPO₄, 5,19g ácido cítrico e H₂O milli Q q.s.p. 1000mL), 4mg de O. P. D. (θ- fenildiaminobenzeno) e 2,5µL de H₂O₂, por um período de 20 minutos em local escuro. A reação foi parada com 30µL/well de ácido sulfúrico 1:20. A leitura foi realizada em leitor de ELISA⁵ a 492nm.

Para discriminar o ponto de corte entre positivo e negativo para a resposta sorológica mensurada no teste de ELISA, foi usada a adição de dois desvios padrões aos controles negativos. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão (DV) para cada grupo de camundongos.

⁴ Anti Mice Peroxidase Conjugate (Antibody Developed in Rabbit) 1:40.000-Sigma, USA

⁵ Titertek Multiskan Plus – USA

4.18. Testes de função hepática

Para verificar a ocorrência de possíveis distúrbios funcionais hepáticos, nos diferentes tratamentos, foram realizados testes para dosagem das proteínas totais e da albumina, além das enzimas AST (aspartato aminotransferase, denominada na nomenclatura antiga TGO – transaminase glutâmico-oxalacética) e ALT (alanina aminotransferase, antigamente denominada TGP – transaminase glutâmico-pirúvica). Foram utilizadas amostras de soro de seis animais por tratamento, no dia zero e depois a cada três semanas, até a décima quinta semana. Os resultados foram expressos a partir da média aritmética dos valores encontrados para os camundongos utilizados na amostragem. As análises eram realizadas com o equipamento de dosagens multiparamétrico de bioquímica Alisé e “kits” da marca Biolab.

4.19. Coleta dos baços

Foram coletados os baços para verificação da resposta imune e outras alterações histológicas decorrentes da imunização com os diferentes tratamentos. Foi realizada necrópsia em um camundongo de cada tratamento no dia zero, três, seis e nove dias após a segunda e dois, quatro e seis dias após a terceira inoculação. Os animais para a coleta foram escolhidos aleatoriamente.

4.20. Histologia dos baços

Os fragmentos dos baços foram fixados em formol 10%, neutro tamponado (pH 7,2) por 24 horas. Após fixação, os fragmentos foram armazenados em álcool 70% até a posterior desidratação e inclusão. A desidratação procedeu-se em soluções alcólicas crescentes (70%, 80%, 90% e 100% I e II), permanecendo

durante 1 h em cada solução alcoólica. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast (PROPHET *et al.*, 1992).

Realizaram-se cortes histológicos seriados de 5µm de espessura em micrótomo de rotação SPENCER⁶, os quais foram corados segundo a técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E).

As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio óptico binocular ECLIPSE E600⁷.

4.21. Análise estatística

Inicialmente, todas as variáveis, da resposta humoral e dos testes de função hepática, foram submetidas aos testes de Lilliefors e de Cochran e Bartlett.

Como as variáveis não atenderam aos pré-requisitos de normalidade e homocedasticidade, mesmo após transformação, foi feita a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis a um nível de 5% de probabilidade.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SAEG versão 8.X.

⁶ American Optical Company

⁷ Microscópio Óptico Eclipse E600 – Nikon - Japan

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Preparação das microesferas

Consistiu na dispersão de uma solução aquosa do imunógeno (w) a ser encapsulado em uma solução de polímero em solvente orgânico (diclorometano) (o). Esta primeira solução w/o foi novamente emulsificada com uma solução aquosa que continha um agente tensoativo adequado, o álcool polivinílico, formando uma dupla emulsão w/o/w. A posterior extração do solvente orgânico fez a fase externa aquosa dar lugar a formação das microesferas, que quando observadas sob microscopia eletrônica de varredura (Figura 1), mostraram-se lisas e esféricas, sem observação de poros em sua superfície, sendo estes fatores demonstradores do sucesso da técnica de encapsulação. IGARTUA *et al.* (1997b) trabalhando com albumina bovina encapsulada em microesferas PLGA encontraram resultados semelhantes.

A técnica de encapsulação-extração do solvente, também chamada emulsão água-em óleo-em água (w/o/w) (VAN DE WEERT *et al.* 2000; PEREZ *et al.*, 2002), tem sido amplamente utilizada devido a sua simplicidade (IGARTUA *et al.*, 1997a). Esta técnica é a mais comumente empregada para promover encapsulação de proteínas em matrizes poliméricas (PEREZ *et al.*, 2002).

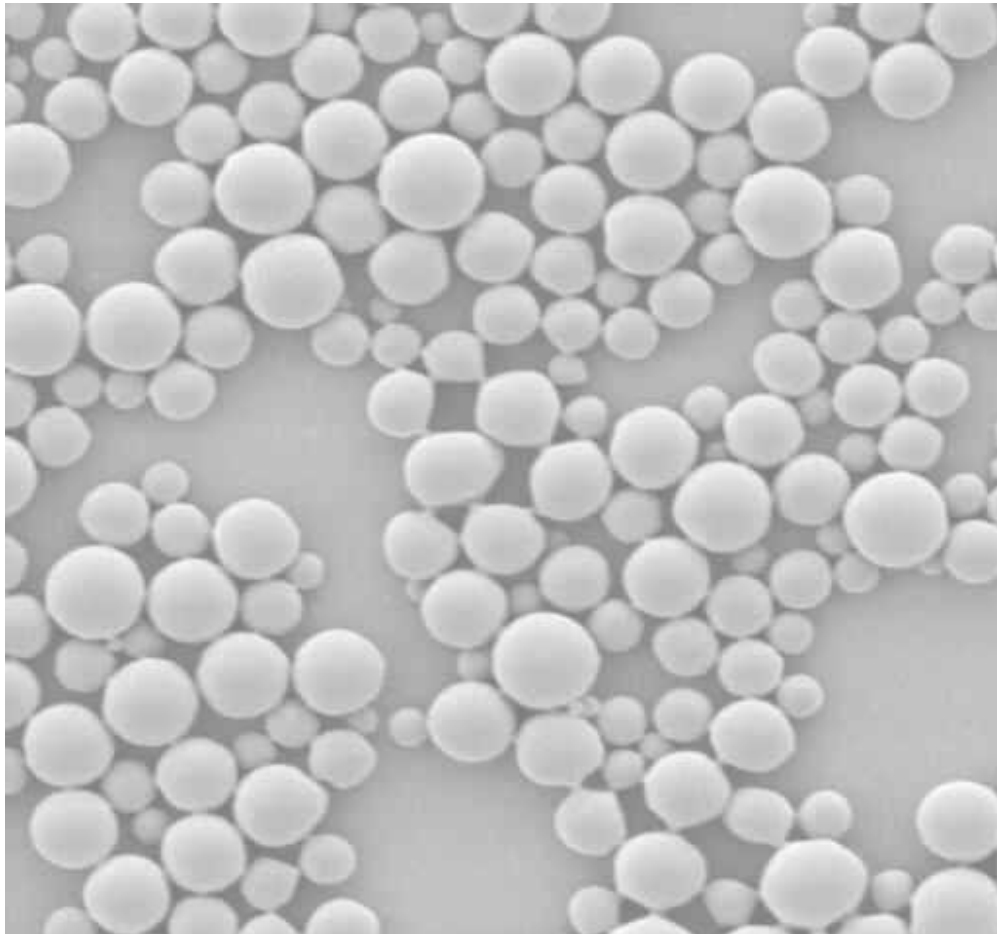


Figura 1: Eletronmicrografia de varredura das microesferas PLGA contendo o peptídeo SBm7462 encapsulado. Aumento de 25.000X

5.2. Mensuração da eficácia da microencapsulação

5.2.1. Peptídeo SBm7462

Após a ruptura com NaOH das microesferas contendo o peptídeo e posterior quantificação por meio do teste do ácido bicinconínico, utilizou-se da fórmula citada por CASTELLANOS *et al* (2001) para calcular a sua eficácia de encapsulação, que foi da ordem de 60%.

De acordo com PORTELA (2000), o peptídeo SBm7462 apresenta um alto grau de hidrofobicidade. Este fator pode ser apontado como um dos responsáveis pela sua baixa eficiência de encapsulação, uma vez que o peptídeo é diluído em uma solução aquosa na primeira fase do processo de emulsão dupla (w/o/w). Além deste, diversos fatores determinam a eficiência da encapsulação de antígenos em microesferas biodegradáveis PLGA. CASTELLANOS *et al.* (2001) verificaram que a elevada intensidade do processo de homogeneização na emulsão w/o promove uma diminuição no tamanho das microesferas e um aumento na eficiência de encapsulação. Ainda segundo estes autores, MAA & HSU (1997) reportaram que a eficiência de encapsulação depende do tamanho da partícula da proteína usada na encapsulação. Esses autores, trabalhando com soroalbumina bovina (BSA) encapsulada em microesferas PLGA, observaram que quanto maior a relação tamanho das partículas protéicas/tamanho final das microesferas, menor a eficiência de encapsulação. O peptídeo SBm7462 é bastante similar em tamanho ao SPf66, diferindo deste apenas em dois aminoácidos, permitindo concluir que, o tamanho do peptídeo não interferiu na eficiência de encapsulação, discordando com o encontrado por MAA & HSU (1997), que trabalharam com proteínas íntegras e de alto peso molecular como a BSA.

O peptídeo associado à superfície é um indicador da eficiência da encapsulação (ALONSO *et al.*, 1994) e é equivalente ao peptídeo liberado no primeiro dia dos estudos de liberação *in vitro*. Como pode ser observado na Figura

2, representa 40,6% do peptídeo total encapsulado, o que pode vir a explicar os baixos resultados na resposta humoral quando comparam-se os mesmos com os obtidos com o peptídeo emulsificado com o adjuvante saponina. Disto coligimos que o peptídeo associado à superfície foi rapidamente liberado e conseqüentemente degradado, tendo como resultado uma menor resposta imunológica no que se refere à produção de IgGs SBm7462-específicas.

5.2.2. Peptídeo SPf66

Utilizando-se da metodologia já descrita para o SBm7462, verificou-se que este peptídeo apresentou uma eficácia de encapsulação de 85%, a qual é considerada muito boa. Este peptídeo apresenta uma alta hidrofiliçidade, como verificado quando da sua diluição em soluções aquosas, o que explica sua alta eficiência de encapsulação. Como verificado na resposta imunológica obtida, tanto no que se refere à produção de imunoglobulinas específicas a este peptídeo, quanto às alterações histológicas dos baços dos camundongos com este imunizados, como também pelos resultados mostrados em experimentos anteriores (ROSAS *et al.*, 2001, ROSAS *et al.*, 2002; CARCABOSO *et al.*, 2003), este sistema de liberação se mostra bastante apropriado à encapsulação deste peptídeo sintético.

Este peptídeo foi utilizado como um controle das microesferas PLGA, no sentido de demonstrar que este sistema de liberação é eficaz quando usado para encapsulação de peptídeos sintéticos. Foi escolhido em razão da sua grande similaridade com o SBm7462, no que se refere a tamanho e modo de confecção, como também por já ter mostrado bons resultados com as PLGA no que se refere à elicitacão de uma forte resposta imunológica.

5.3. Tamanho das microesferas

Por meio de difração por raios laser se determinou o tamanho das microesferas. As que continham o peptídeo SBm7462 mostraram tamanhos que variaram entre 0,96 μm e 2,82 μm , sendo 1,63 μm o tamanho médio. As microesferas contendo o SPf66 mostraram um tamanho médio de 1,3 μm .

O tamanho das partículas é influenciado por vários fatores, tais como a concentração do polímero, a concentração do agente emulsificante e o método de homogeneização para preparar a primeira emulsão w/o. IGARTUA *et al.* (1997a) trabalhando com BSA encapsulada em microesferas PLGA observou que havia uma diminuição da partícula à medida que se reduzia a concentração da solução do polímero. Efeito inverso foi observado quanto à concentração do agente emulsificante. Ao aumentar sua concentração se verificou uma diminuição do tamanho da partícula. Quanto ao método de homogeneização, IGARTUA *et al.* (1997b) verificaram que microesferas preparadas por homogeneização com vortex foram significativamente maiores que as homogeneizadas por sonicação.

O diâmetro das microesferas tem uma importante função na interação com células fagocíticas. De acordo com RODRIGUES *et al.* (1994) e TABATA & IKADA (1988), a fagocitose de partículas biodegradáveis e não biodegradáveis tem sido reportada ser dependente do seu tamanho, carga superficial e hidrofobicidade. Após administração subcutânea, microesferas PLGA com diâmetro entre 1 μm e 10 μm são rapidamente fagocitadas por monócitos recrutados para o local da injeção, desse modo provendo uma liberação intracelular do antígeno. Partículas com diâmetro superior a 10 μm poderão permanecer como um depósito no local da injeção, provendo uma liberação contínua do antígeno (LIMA & RODRIGUES JUNIOR, 1999). Ainda segundo estes autores, o diâmetro das partículas mostra uma importante função na indução de proteção por imunização parenteral. O' HAGAN *et al.* (1993), trabalhando com soroalbumina bovina encapsulada em microesferas

PLGA, observaram que houve uma resposta mais significativa com partículas de 1,5µm do que com as acima de 73µm.

Provavelmente os diâmetros das microesferas contendo os peptídeos sintéticos SBm7462 e SPf66 são os que proporcionam uma melhor resposta imunológica, quando se leva em consideração os resultados encontrados por O' HAGAN *et al.* (1993).

5.4. Estudos de liberação *in vitro* do peptídeo SBm7462

Como pode ser observado na Figura 2, o peptídeo mostrou um pico de liberação inicial de 40,6% (efeito “burst”), seguindo-se uma segunda fase de liberação lenta até o 37º dia de mais 33% do peptídeo. O' HAGAN *et al.* (1994), MEN *et al.* (1996) e IGARTUA *et al.* (1997b), encontraram resultados semelhantes. IGARTUA *et al.* (1997b) creditaram este efeito “burst” à liberação da proteína adsorvida à superfície das microesferas. Segundo estes mesmos autores, este efeito é consequência de uma elevada quantidade de proteína presente na superfície das micropartículas, devido a uma incompleta microencapsulação. Esta hipótese é ratificada quando comparamos o perfil de liberação do peptídeo SBm7462 com o perfil do SPf66, em que a eficiência de encapsulação é da ordem de 85% e o efeito “burst” observado foi em torno de 25% (Figura 2). A segunda fase deve-se à liberação da proteína por meio de difusão pelos poros preenchidos com água, e tem sido associada à degradação do polímero e subsequente erosão da matriz polimérica (ALONSO *et al.*, 1994).

Quando compara-se o perfil de liberação do peptídeo SPf66 com o do SBm7462, observa-se que o SBm7462 apresentou um perfil de liberação mais precoce. Aos cinquenta e um dias observou-se uma porcentagem de liberação total de 98%, contrastando com os 80% do SPf66 no mesmo período, o que pode ser explicado pela grande quantidade de SBm7462 liberada inicialmente (efeito

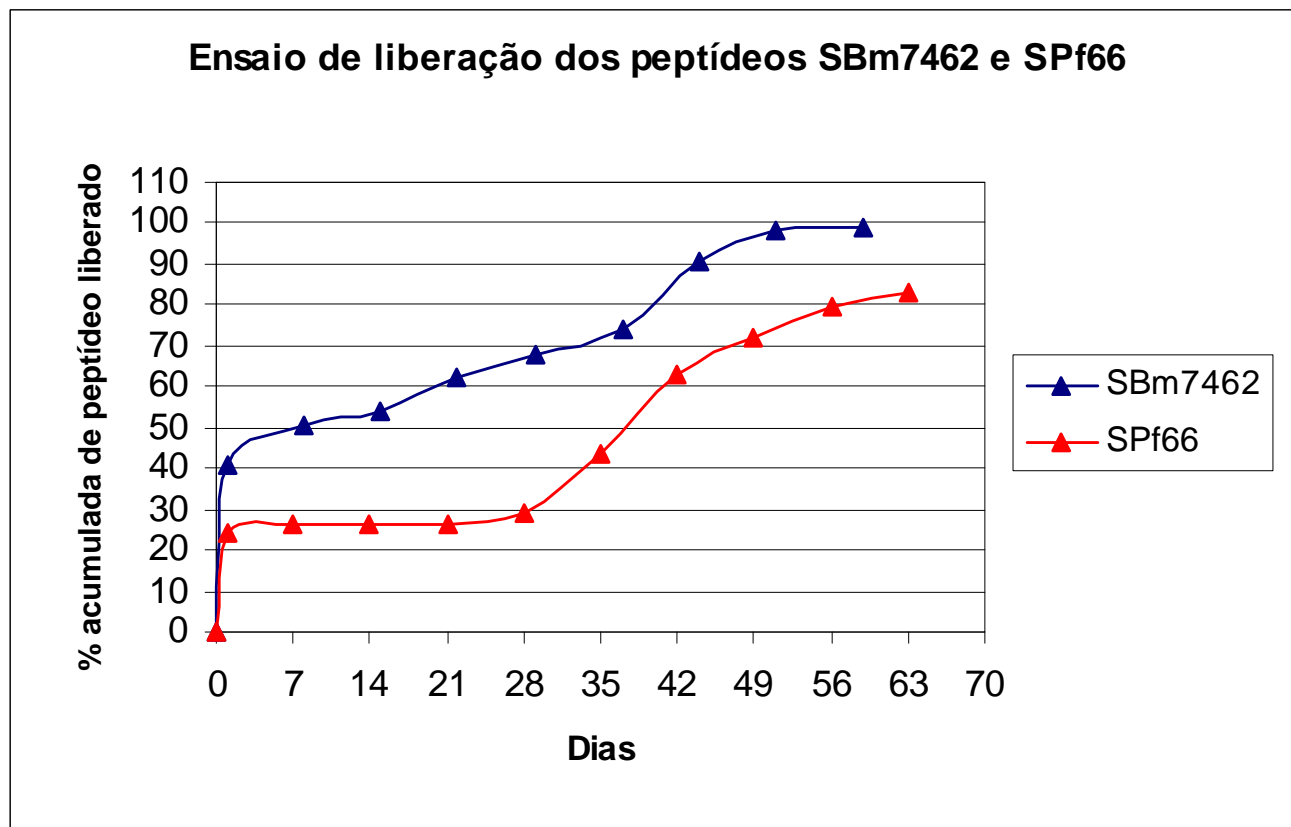


Figura 2: Liberação *in vitro* dos peptídeos SBm7462 e SPf66 de microesferas PLGA em tampão fosfato salino 20mM pH 7,4. O período de ensaio foi de 59 dias para o SBm7462 e de 63 dias para o SPf66.

“burst”). Estas observações podem ajudar a explicar a resposta imunológica significativamente maior do SPf66 em relação ao SBm7462, acreditando-se que, por este último ter sido mais rapidamente liberado foi também mais rapidamente degradado. Contudo, é importante levar em consideração que este é um ensaio *in vitro*, tentando simular condições fisiológicas que nos permitem ter um indício da cinética de liberação *in vivo*, não podendo, portanto, estes dados serem completamente extrapolados (ROSAS, comunicação pessoal).

5.5. Estudos de liberação *in vitro* do peptídeo SPf66

Foi observado um perfil de liberação trifásico (Figura 2) para este peptídeo, concordando com resultados anteriores (ROSAS *et al.*, 2001). Após um “burst” inicial de 25%, seguiu-se uma fase lenta de liberação por um período de vinte e nove dias. Por último, observou-se uma terceira fase, de liberação crescente, por um período de trinta e quatro dias. Após sessenta e três dias, aproximadamente 80% havia sido liberado.

5.6. Integridade dos peptídeos SBm7462 e SPf66

Após a disrupção das microesferas contendo o peptídeo SBm7462, este foi analisado por HPLC-RP. A Figura 3B mostra o perfil cromatográfico do SBm7462 após o processo de microencapsulação. Pode-se observar um grande sinal com tempo de retenção entre 1 e 2 minutos que são atribuídos a sais ou produtos de degradação do polímero das microesferas. Esta solução foi dializada para obtenção de um perfil cromatográfico mais límpido e posteriormente analisada por HPLC-RP (Figura 3C). Nesta figura podemos observar um sinal principal com tempo de retenção de aproximadamente 21 minutos, correspondente ao peptídeo nativo

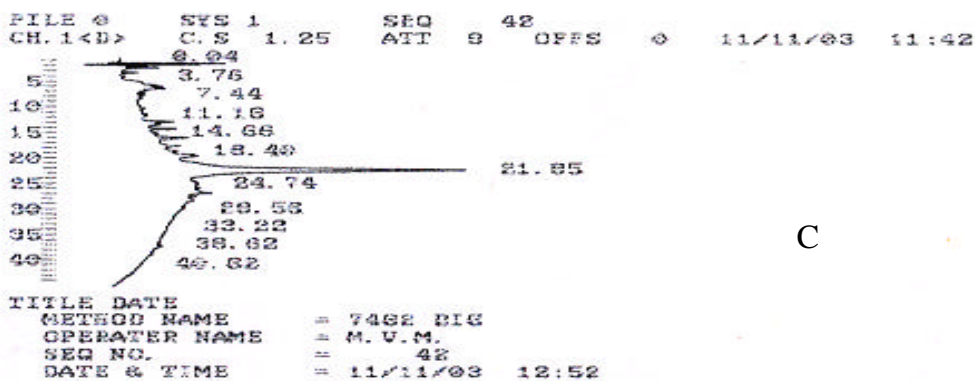
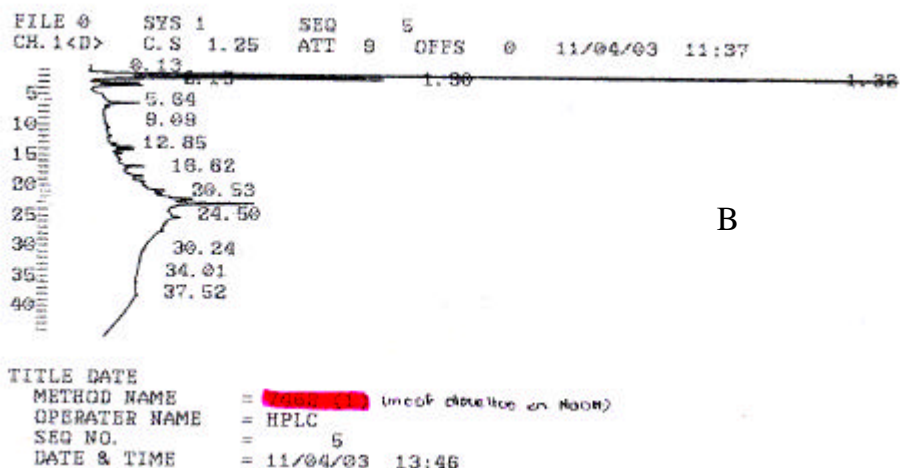
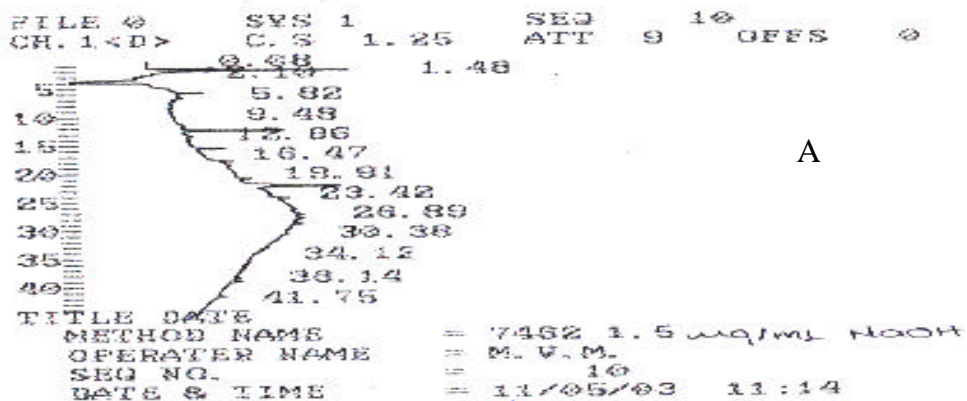


Figura 3: Peptídeo SBm7462 analisado por HPLC-RP. Perfil cromatográfico do peptídeo SBm7462 antes da microencapsulação (A); perfil cromatográfico após extração das microesferas (B); Perfil cromatográfico após extração das microesferas e diálise em membrana de 1000 Da em água deionizada (C).

(comparar com a Figura 3A referente ao perfil cromatográfico do peptídeo antes da encapsulação), o que faz concluir que este peptídeo não sofreu nenhum tipo de alteração após o processo de microencapsulação.

Quanto a análise da integridade do peptídeo SPf66 após a microencapsulação, foi similar à encontrada por ROSAS *et al.* (2001), ao analisá-lo por exclusão cromatográfica (SEC-HPLC) e também por eletroforese capilar (CE). Comparando-se o peptídeo nativo, o peptídeo liberado no primeiro dia e o peptídeo extraído das microesferas, verificou-se que os perfis cromatográficos e eletroforéticos destes dois últimos são similares aos do peptídeo nativo, sugerindo que a sua integridade não foi afetada pelo processo de encapsulação.

Durante a formulação das microesferas, pelo processo de evaporação por solvente, as proteínas são frequentemente expostas a várias condições desfavoráveis, especialmente a sonicação e a exposição ao solvente orgânico (diclorometano) (IGARTUA *et al.*, 1998), além da tensão superficial (ROSAS *et al.*, 2001). No caso do solvente orgânico, as proteínas por terem atividade de superfície tendem a adsorver a interface água/solvente orgânico; esta adsorção causa desdobramento protéico, inativação e agregação irreversível na primeira etapa do processo de emulsão (PEREZ *et al.*, 2002). Contudo, como verificado, não se observou degradação peptídica em nenhum dos peptídeos. ROSAS *et al.* (2001), trabalhando com o SPf66, creditou este fato à origem do peptídeo (síntese em fase sólida), onde solventes orgânicos e tensão superficial são usados para obter o imunógeno sintético. Os achados acima inferidos poderiam ser aplicados ao SBm7462, posto que também sua síntese foi em fase sólida.

5.7. Análise da estabilidade do peptídeo SBm7462 por dicroísmo circular

Esta técnica é aplicada para análise de conformação de peptídeos, e tem uma alta sensibilidade de conformação molecular e relação estereoquímica, o que a

faz ideal para a detecção de diferenças e mudanças conformacionais. As análises de dicroísmo foram realizadas com o peptídeo nativo (Figura 4) e com o peptídeo após desencapsulação (Figura 5). O espectro obtido por estas análises demonstra que o peptídeo extraído das microesferas mostra uma conformação helicoidal, o que demonstra que não houve alteração conformacional após o processo de microencapsulação.

Quando se empregou esta técnica para verificação da estabilidade do peptídeo SBm7462 quando submetido a diferentes pHs, observou-se que este peptídeo conserva sua conformação helicoidal nos três pHs ensaiados. Uma conclusão adicional é que o peptídeo é mais solúvel em pHs ácidos do que em básicos. Esta característica é desejável, já que, de acordo com BOWERSOCK & MARTIN (1999), em Medicina Veterinária, além do custo da tecnologia, os principais fatores limitantes são a estabilidade do antígeno durante o processo de fabricação e o fato de que a quebra do polímero *in vivo* cria um ambiente ácido que pode alterar os epítomos antigênicos tornando a vacina inefectiva.

Os resultados de dicroísmo circular e HPLC-RP nos permitem concluir que o peptídeo SBm7462 é resistente ao processo de microencapsulação em partículas biodegradáveis PLGA, como também a técnica de dicroísmo dá evidências que seja estável após microencapsulado e introduzido num organismo animal (*in vivo*), mostrando-se desta forma apropriado à encapsulação neste sistema de liberação.

5.8. Cinética de anticorpos da classe IgG anti-peptídeos sintéticos SBm7462 e SPf66

Foi utilizado o ELISA devido à boa sensibilidade e especificidade apresentadas em experimentos anteriores com o SBm7462 (PIMENTEL, 2002 e PATARROYO *et al.*, 2002), como também ao seu baixo custo e praticidade. Outro

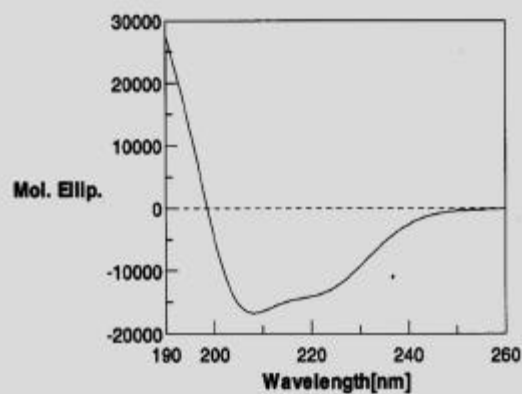
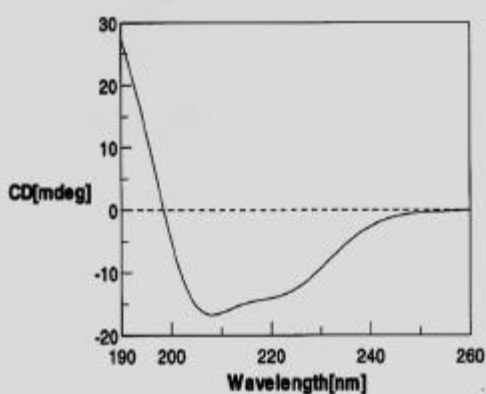
FUNDACION INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA

FIDIC

Fecha	Noviembre de 2003		
Concentración	0,1 mM	Solvente	Agua
Celda	1 cm		
Temperatura	20°C		

EQUIPO JASCO	Data pitch	0,2 nm
	Band width	1 nm
	Response	2 seg
	Sensitivity	High
	Measurement range	260-190 nm
	Scanning speed	10 nm/min
	Accumulation	3

7462 30% TFE



7462 (8) (5058 g/mol)

CLSKHVLRLQLQACEHCDCGEWGAMNMTTRSSICSDFGNEFCRNAC

PEPTIDO ANTES DE MICROENCAPSULAR

Figura 4: Análises de dicroísmo circular em TFE 30% para o peptídeo SBm7462 antes da encapsulação nas microesferas PLGA.

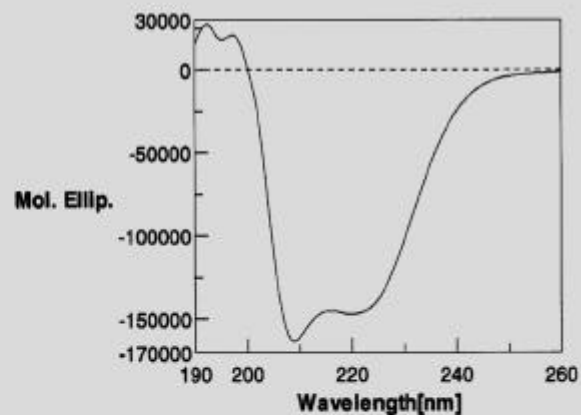
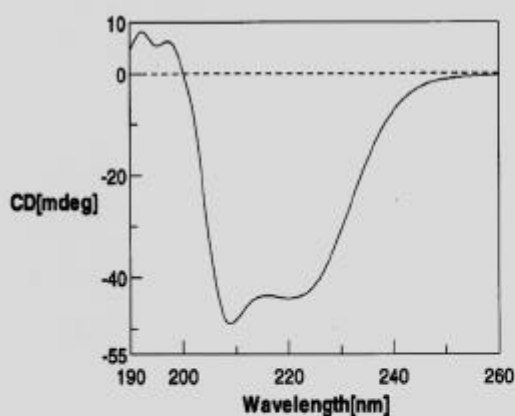
FUNDACION INSTITUTO DE INMUNOLOGIA DE COLOMBIA

FIDIC

Fecha	Noviembre de 2003		
Concentración	0,1 mM	Solvente	Agua
Celda	1 cm		
Temperatura	20°C		

EQUIPO JASCO	Data pitch	0,2 nm
	Band width	1 nm
	Response	2 seg
	Sensitivity	High
	Measurement range	260-190 nm
	Scanning speed	10 nm/min
	Accumulation	3

7462 30% TFE



7462 (8) (5058 g/mol)

CLSKHVLRLQACEHCDCGEWGAMNMTTRSSICSDFGNEFCRNAC

PEPTIDO DIGERIDO DESPUES DE MICROENCAPSULAR

Figura 5: Análises de dicroísmo circular em TFE 30% para o peptídeo SBm7462 extraído das microesferas PLGA.

fator importante que pode ser citado é o fato desta técnica já ter sido testada por vários autores com antígenos derivados de carrapatos (KEMP *et al.*, 1986; OPDEBEECK *et al.*, 1989; WILLADSEN *et al.*, 1989; JACKSON & OPDEBEECK, 1994; KIMARO & OPDEBEECK, 1994; VAZ JUNIOR *et al.*, 1994; PENICHET, 1994; EHRENHOFER & OPDEBEECK, 1995), formas recombinantes da proteína Bm86 (WILLADSEN & MCKENNA, 1991) e peptídeos sintéticos baseados na estrutura de Bm86 (SHARP *et al.*, 1990, OLIVEIRA, 1998).

O peptídeo sintético SBm7462 mostrou resultados estatisticamente significantes em relação aos controles (água, saponina e PLGA vazia) tanto emulsificado com a saponina quanto encapsulado com as microesferas PLGA (Quadros 1 e 2). As diferenças estatísticas entre os tratamentos com o SBm7462 (tanto encapsulado com PLGA quanto emulsificado com a saponina) começaram a evidenciar-se após a quarta semana e perduraram até a décima terceira semana para a associação peptídeo-microesferas e até o final do experimento para a peptídeo-saponina. Estes dados estão em desacordo com os encontrados por PIMENTEL (2002) e PATARROYO *et al.* (2002), em que as diferenças estatísticas começaram a ser evidenciadas após a segunda inoculação. Acredita-se que este fato seja devido a espécie animal utilizada, visto não ter havido diferença estatística entre o grupo imunizado com o peptídeo emulsificado com saponina e o grupo imunizado com o peptídeo encapsulado nas microesferas. Não detecção de níveis significativos de imunoglobulinas da classe IgG até a quarta semana, deve-se ao fato de que a resposta, após a primeira inoculação, corresponde a uma resposta imune primária, em que se tem a estimulação dos clones de linfócitos B reativos aos epítomos dos peptídeos pela primeira vez, com produção indetectável destas imunoglobulinas (PORTELA, 2000).

Como evidenciado pelas Figuras 6 e 7, foi observada uma melhor resposta humoral em termos de produção de IgG total quando o SBm7462 foi emulsificado com o adjuvante saponina. A resposta a ambos os peptídeos encapsulados nas microesferas atingiu o pico máximo na décima semana. Resultado semelhante foi

Quadro 1 - Médias de absorvância óptica (492nm) obtidas no ELISA indireto para os grupos I, II, III, IV e V. Os números representam as médias de absorvância semanais, sendo que para cada soro de cada amostra foram feitas duas repetições. Letras diferentes (a, b, c) seguindo os resultados, na mesma linha, significam diferença estatística no Teste de Kruskal – Wallis ($p < 0,05$). As inoculações foram realizadas nas semanas 0, 3 e 6. Legenda: saponina (I); água milliQ (II); SBm7462 + saponina (III); PLGA vazia (IV); SBm7462 + PLGA (V).

SEMANA	GRUPOS				
	I	II	III	IV	V
0	0,021 ^a	0,021 ^a	0,022 ^a	0,062 ^b	0,072 ^b
1	0,057 ^b	0,051 ^a	0,061 ^b	0,048 ^a	0,057 ^b
2	0,053 ^a	0,059 ^{ab}	0,053 ^a	0,055 ^{ab}	0,062 ^b
3	0,055 ^b	0,056 ^b	0,065 ^b	0,041 ^a	0,051 ^{ab}
4	0,186 ^c	0,133 ^b	0,245 ^c	0,039 ^a	0,073 ^{ab}
5	0,042 ^a	0,038 ^a	0,160 ^b	0,086 ^b	0,219 ^b
6	0,050 ^a	0,041 ^a	0,123 ^{bc}	0,090 ^b	0,265 ^c
7	0,143 ^a	0,156 ^{ab}	0,350 ^c	0,116 ^a	0,245 ^c
8	0,043 ^a	0,041 ^a	0,249 ^b	0,042 ^a	0,227 ^b
9	0,113 ^{bc}	0,111 ^b	1,130 ^d	0,049 ^a	0,254 ^{cd}
10	0,034 ^a	0,035 ^a	0,242 ^{bc}	0,099 ^b	0,322 ^c
11	0,065 ^a	0,075 ^a	0,390 ^b	0,072 ^a	0,276 ^b
12	0,089 ^b	0,101 ^b	0,341 ^c	0,033 ^a	0,162 ^{bc}
13	0,057 ^a	0,065 ^a	0,345 ^b	0,049 ^a	0,202 ^b
14	0,058 ^a	0,065 ^{ab}	0,363 ^c	0,043 ^a	0,100 ^b
15	0,062 ^b	0,064 ^b	0,344 ^c	0,028 ^a	0,080 ^b
16	0,051 ^b	0,055 ^b	0,278 ^c	0,027 ^a	0,075 ^{bc}
17	0,111 ^{ab}	0,133 ^b	0,466 ^c	0,018 ^a	0,068 ^a
18	0,110 ^b	0,119 ^b	0,421 ^c	0,026 ^a	0,070 ^{ab}
19	0,069 ^b	0,083 ^b	0,530 ^c	0,023 ^a	0,064 ^b
20	0,054 ^b	0,057 ^b	0,496 ^c	0,017 ^a	0,059 ^b
21	0,035 ^b	0,041 ^b	0,308 ^c	0,019 ^a	0,060 ^b

Quadro 2 - Comparação das médias de absorvância óptica (492nm) obtidas no ELISA indireto para os grupos em que foi utilizada PLGA como sistema de liberação: IV, V e VI. Os números representam as médias de absorvância para cada semana, sendo que para cada soro de cada amostra foram feitas duas repetições. Letras diferentes (a, b, c) seguindo os resultados, na mesma linha, significam diferença estatística no Teste de Kruskal – Wallis ($p < 0,05$). As inoculações foram realizadas nas semanas 0, 3 e 6. Legenda: PLGA vazia (IV); SBm7462 + PLGA (V); SPf66 + PLGA (VI).

SEMANA	GRUPOS		
	IV	V	VI
0	0,062 ^b	0,072 ^b	0,037 ^a
1	0,048 ^a	0,057 ^b	0,067 ^{ab}
2	0,055 ^a	0,062 ^a	0,259 ^b
3	0,041 ^a	0,051 ^a	0,451 ^b
4	0,039 ^a	0,073 ^b	0,523 ^c
5	0,086 ^a	0,219 ^b	0,494 ^c
6	0,090 ^a	0,265 ^b	0,561 ^c
7	0,116 ^a	0,245 ^b	0,607 ^c
8	0,042 ^a	0,227 ^b	0,537 ^c
9	0,049 ^a	0,254 ^b	0,537 ^c
10	0,099 ^a	0,322 ^b	0,716 ^c
11	0,072 ^a	0,276 ^b	0,634 ^c
12	0,033 ^a	0,162 ^b	0,318 ^c
13	0,049 ^a	0,202 ^b	0,325 ^c
14	0,043 ^a	0,100 ^b	0,349 ^c
15	0,028 ^a	0,080 ^b	0,345 ^c
16	0,027 ^a	0,075 ^b	0,476 ^c
17	0,018 ^a	0,068 ^b	0,440 ^c
18	0,026 ^a	0,070 ^b	0,425 ^c
19	0,023 ^a	0,064 ^b	0,335 ^c
20	0,017 ^a	0,059 ^b	0,311 ^c
21	0,019 ^a	0,060 ^b	0,309 ^c

Cinética de IgGs anti-SBm7462

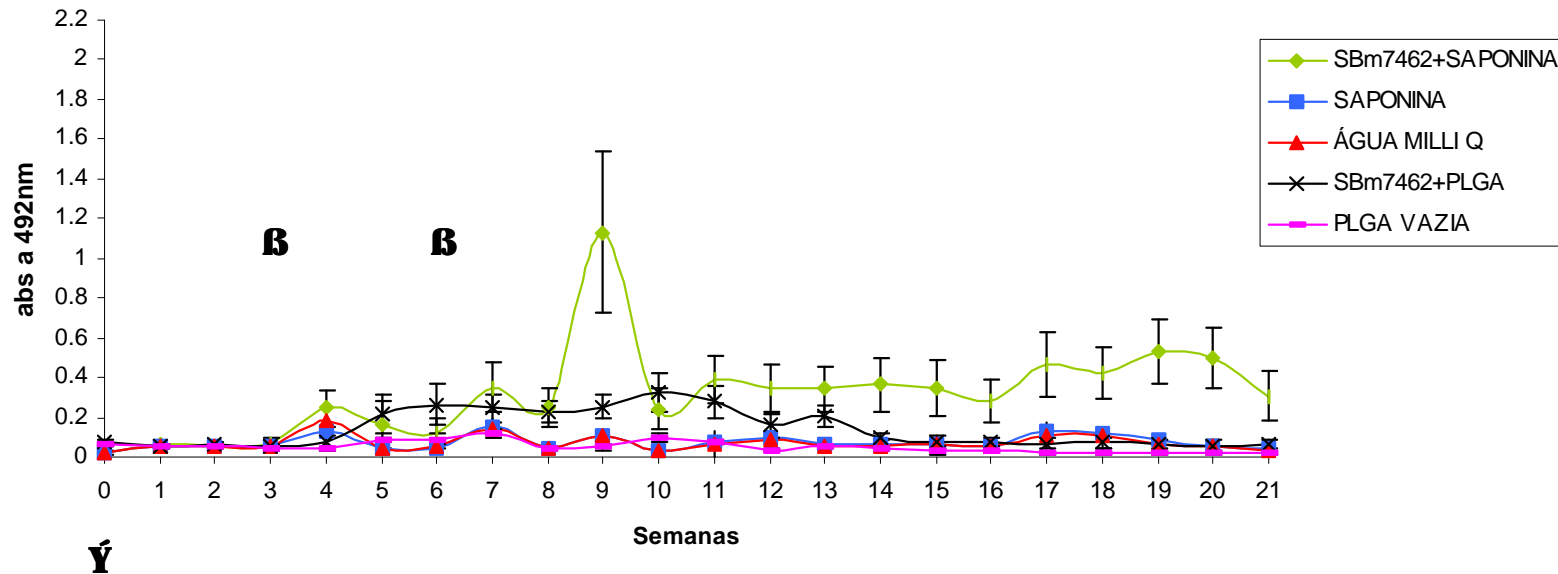


Figura 6: Cinética de produção de IgGs em camundongos inoculados com SBm7452 emulsificado com o adjuvante saponina (grupo III) e encapsulado em PLGA (grupo V), e com os controles saponina (grupo II), água milli Q (grupo I) e PLGA vazia (grupo IV) . As setas indicam as inoculações e as barras em T o desvio padrão para mais e para menos.

Cinética de IgGs anti-SBm7462 e anti-SPf66

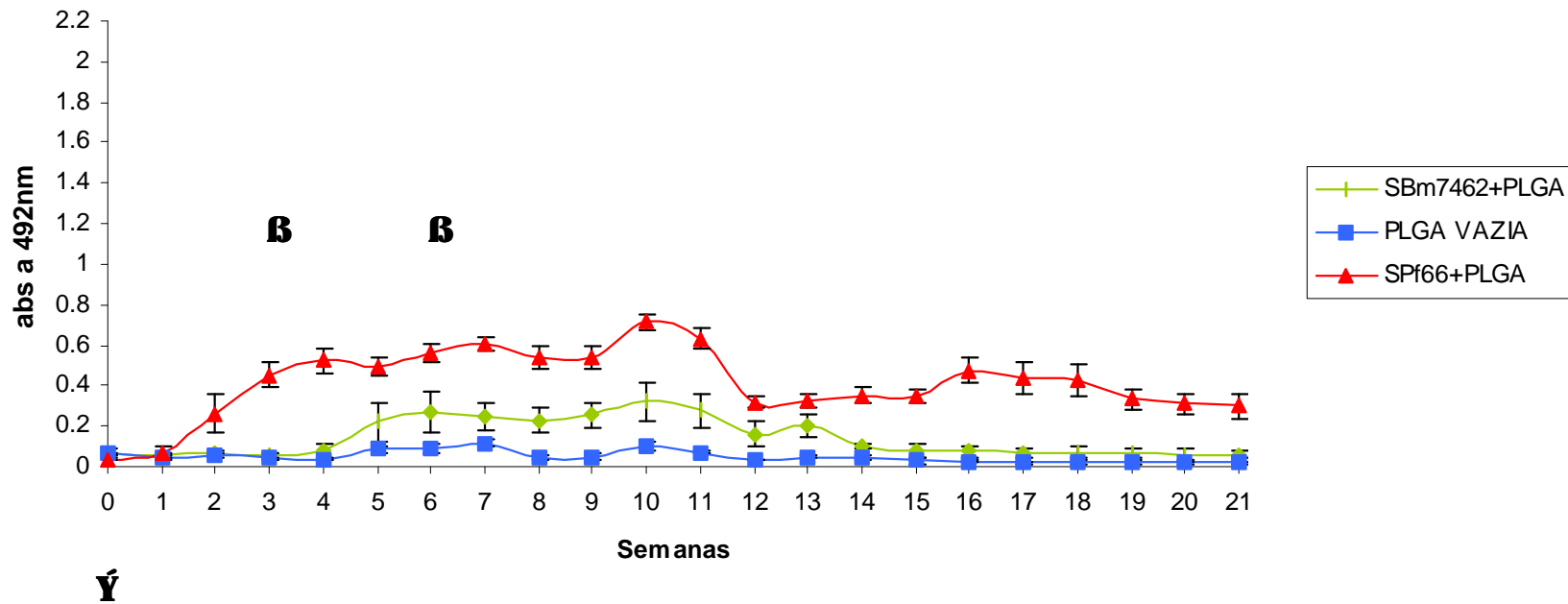


Figura 7: Cinética de produção de IgGs em camundongos inoculados com SBm7462 (grupo V) e SPf66 (grupo VI) encapsulados em microesferas PLGA, como também com microesferas vazias (grupo IV). As setas indicam as inoculações e as barras em T o desvio padrão para mais e para menos.

encontrado por O' HAGAN *et al.* (1993). O pico de produção máxima de IgGs se deu após a terceira inoculação, coincidindo com os resultados encontrados por PORTELA (2000), PIMENTEL (2001) e GONZALEZ (dados não publicados), ao utilizarem o SBm7462 juntamente com a saponina em bovinos. Contudo, o pico máximo de IgGs ocorreu um pouco mais tarde, na terceira semana após a terceira inoculação, tendo este pico, nos bovinos, aparecido na segunda semana após a segunda inoculação. Estes resultados estão em consonância com os encontrados por JACKSON & OPDEBEECK (1994). Estes autores, trabalhando com a proteína recombinante Bm86 adicionada à saponina, observaram níveis de proteção satisfatórios, assim como altos títulos de anticorpos, recomendando assim, este adjuvante como adequado para uso com antígeno de carrapatos.

Como citado por PORTELA (2000), o peptídeo sintético SBm7462 apresenta um alto grau de hidrofobicidade, o que pode ter levado a uma baixa eficiência de encapsulação (ROSAS, comunicação pessoal), que como citado, foi da ordem de 60% . Este fato pode vir a explicar a resposta significativamente menor do grupo SBm7462/PLGA em relação ao grupo SBm7462/saponina (Quadro 1, Figura 6).

Quanto aos controles (água milli Q, saponina e PLGA vazia) não foram observadas diferenças estatísticas significativas quando comparados. Resultados semelhantes, com água milli Q e saponina, foi observado por OLIVEIRA (1998) e PATARROYO *et al.* (2002) em bovinos.

O perfil da cinética de IgGs do peptídeo sintético SPf66 adotou a dinâmica encontrada por outros autores (ROSAS *et al.*, 2001) quando da sua utilização em camundongos juntamente com as microesferas PLGA.

A isotipagem dos anticorpos não foi realizada neste trabalho. Contudo, acredita-se que não haja mudanças consideráveis entre os tratamentos. MEN *et al.* (1996), testaram dois peptídeos sintéticos derivados do *Plasmodium falciparum* e do *P. berghei*, encapsulados em microesferas PLGA e emulsificados com adjuvante incompleto de Freund, tendo verificado a existência de similaridade entre os dois

adjuvantes no que se refere a especificidade de anticorpos, capacidade de ligação antígeno-anticorpo e distribuição de isótipo/subclasse, concluindo desta forma, que o processo de microencapsulação não modifica substancialmente a imunogenicidade dos antígenos usados.

5.9. Provas de função hepática

Para LIMA *et al.* (1985), os testes baseados no metabolismo e na excreção da bilirrubina, no metabolismo das proteínas, na excreção de corantes e na dosagem das enzimas séricas são os que atualmente fornecem maior subsídio às indagações sobre a rotina do comportamento funcional do fígado ou das suas condições orgânicas.

A albumina plasmática, o fibrinogênio, parte das globulinas e a protrombina são produzidas no fígado. A síntese de proteínas plasmáticas é reduzida significativamente nas lesões hepáticas graves ou em deficiências prolongadas de proteínas na dieta (SWENSON, 1988). A albumina é a mais importante proteína plasmática e corresponde a cerca de 60 % das proteínas plasmáticas totais. A sua síntese é afetada em uma série de moléstias, particularmente as do fígado (MURRAY *et al.*, 1994), único órgão a produzi-la (MEYER *et al.*, 1995).

As transaminases (ou aminotransferases) são enzimas que catalisam a transferência, reversível, de um grupo alfa-amino de um aminoácido para um alfa-cetoácido, com a formação de novos alfa-amino e alfa-cetoácidos. Estas enzimas, sobretudo a AST, estão presentes nas bactérias e em todos os tecidos animais, existindo em quantidades mais apreciáveis no miocárdio, fígado, músculos esqueléticos, cérebro, rins e testículos. Assim, qualquer lesão com destruição celular desses tecidos (com exceção do cérebro) provoca apreciável aumento dessas enzimas no sangue. No caso da ALT, por existir em maior quantidade no hepatócito do que em outros tecidos, o seu aumento, mesmo não sendo maior que o da AST,

tem maior significação clínica como sinal de lesão hepática. Nas lesões do hepatócito acompanhadas de necrose ou de simples aumento da permeabilidade celular, a dosagem das transaminases proporciona informações de grande utilidade. Tais lesões são acompanhadas de considerável aumento dessas enzimas no sangue. Admite-se que a necrose de apenas 1% do tecido hepático aumente duas a três vezes a atividade das transaminases sanguíneas (LIMA *et al.*, 1985).

Como observado no Quadro 3, não houve diferenças estatísticas significativas entre os diversos tratamentos, o que leva a concluir que nenhuma das formulações apresenta capacidade de promover efeitos hepatotóxicos, quando se lança mão de provas hepáticas como proteínas totais, albumina e dosagem das transaminases séricas AST e ALT. No caso dos tratamentos que utilizaram microesferas PLGA, este resultado era esperado com base na literatura afirmando a não hepatotoxicidade deste sistema de liberação (VISSCHER *et al.*, 1986; CHEUDHURY *et al.*, 1996). De acordo com LIMA & RODRIGUES (1999), após a hidrólise das cadeias terminais das microesferas PLGA, são produzidos monômeros de ácido lático e glicólico, os quais são inócuos ao organismo. Estes produtos degradados são eliminados pelo ciclo de Krebs como dióxido de carbono na urina (BAZILE *et al.*, 1992). PEREIRA (2001) trabalhando com nanoesferas PLGA *in vitro* não encontraram efeitos hepatotóxicos; contudo, em um experimento *ex vivo* verificaram haver indícios de hepatotoxicidade com base na diminuição da capacidade metabólica mitocondrial (MTT), depleção de glutatona, peroxidação de lipídeos e alteração da atividade das enzimas do sistema de metabolização das drogas.

Quadro 3: dados de função hepática dos animais dos grupos I, II, III, IV, V e VI. Os parâmetros avaliados foram: proteínas totais (PT), albumina (ALB), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Os números representam os parâmetros médios para cada fator avaliado. Letras diferentes (a,b,c) seguindo os resultados, na mesma coluna, significam diferença estatística no Teste de Kruskal – Wallis ($p < 0,05$). Legenda: saponina (I); água milliQ (II); SBm7462 + saponina (III); PLGA vazia (IV); SBm7462 + PLGA (V); SPf66 + PLGA (VI).

Parâmetros	Grupos	Semana					
		0	III	VI	IX	XII	XV
PT (g/DL)	I	63,60 ^a	104,83 ^b	91,50 ^a	86,16 ^a	58,41 ^a	61,35 ^a
	II	73,83 ^a	102,83 ^b	90,91 ^a	78,83 ^a	60,50 ^a	60,14 ^a
	III	82,16 ^a	81,58 ^{ab}	86,50 ^a	81,66 ^a	64,25 ^a	54,56 ^a
	IV	69,50 ^a	61,90 ^{ab}	74,91 ^a	83,50 ^a	64,12 ^a	58,89 ^a
	V	64,75 ^a	76,79 ^{ab}	72,50 ^a	87,10 ^a	62,87 ^a	69,22 ^a
	VI	66,50 ^a	59,83 ^a	72,66 ^a	82,50 ^a	67,00 ^a	59,79 ^a
Albumina (g/DL)	I	4,15 ^a	5,03 ^a	4,56 ^a	4,55 ^a	4,13 ^a	3,90 ^a
	II	3,83 ^a	5,08 ^a	4,75 ^a	4,27 ^a	4,36 ^a	3,85 ^a
	III	4,07 ^a	4,72 ^a	4,76 ^a	4,44 ^a	4,31 ^a	3,85 ^a
	IV	3,32 ^a	4,69 ^a	3,42 ^a	4,34 ^a	4,57 ^a	4,10 ^a
	V	3,10 ^a	5,14 ^a	3,31 ^a	4,17 ^a	4,60 ^a	4,93 ^a
	VI	3,10 ^a	4,64 ^a	3,51 ^a	4,98 ^a	4,91 ^a	4,39 ^a
AST (TGO) (UI)	I	205,83 ^c	196,66 ^a	237,50 ^b	127,50 ^a	116,66 ^a	134,16 ^a
	II	134,16 ^{bc}	179,16 ^a	150,00 ^{ab}	125,00 ^a	139,16 ^a	70,83 ^a
	III	133,33 ^{abc}	150,00 ^a	118,00 ^{ab}	178,33 ^a	119,16 ^a	74,16 ^a
	IV	87,50 ^{ab}	120,00 ^a	112,50 ^{ab}	125,00 ^a	140,00 ^a	184,16 ^a
	V	85,00 ^{ab}	152,00 ^a	78,33 ^a	101,00 ^a	167,50 ^a	123,00 ^a
	VI	57,50 ^a	130,83 ^a	105,83 ^{ab}	136,00 ^a	125,00 ^a	121,66 ^a
ALT (TGP) (UI)	I	43,33 ^a	35,83 ^a	31,66 ^a	43,00 ^a	53,33 ^a	37,50 ^a
	II	26,66 ^a	53,33 ^a	30,83 ^a	14,16 ^a	39,16 ^a	20,00 ^a
	III	23,33 ^a	24,16 ^a	22,00 ^a	83,33 ^a	26,66 ^a	15,83 ^a
	IV	17,50 ^a	59,00 ^a	26,66 ^a	41,00 ^a	40,00 ^a	128,33 ^a
	V	22,50 ^a	41,00 ^a	16,25 ^a	37,00 ^a	42,50 ^a	64,00 ^a
	VI	13,00 ^a	33,33 ^a	14,16 ^a	48,00 ^a	33,33 ^a	54,16 ^a

5.10. Avaliação histológica dos baços murinos inoculados com os peptídeos SBm7462 e SPf66

O exame histológico do baço dos animais imunizados com o SBm7462 emulsificado com a saponina e encapsulado nas microesferas PLGA mostrou que a resposta aos diversos imunógenos caracterizava-se por hiperplasia folicular com formação de centros germinais (CGs) associada a hiperplasia dos cordões de Billroth e das bainhas periarteriolares (PALS).

Esta resposta, entretanto, foi diferente entre os tratamentos. Nos animais em que se utilizou o peptídeo juntamente com a saponina a resposta foi mais intensa três dias após a segunda e dois dias após a terceira inoculação, tendo sido pouco intensa após estas coletas, onde não mais foram observados CGs demonstrando a precocidade da resposta estimulada por este adjuvante. Esta observação é ratificada quando se analisam os dados da cinética humoral (Quadro 1 e Figura 6), onde se observa que a partir da quarta semana após a primeira inoculação este grupo começou a diferenciar-se dos controles.

Já na resposta dos animais imunizados com peptídeo/PLGA (tanto SBm7462 quanto SPf66) a formação de CGs foi observada no sexto dia após a segunda e no quarto e sexto dias após a terceira inoculação, além da observação da intensa hiperplasia dos folículos linfóides e cordões de Billroth (Figuras 8B e 8C), o que vem confirmar o caráter de elicitação de resposta mais tardia das microesferas observado no estudo da resposta de IgGs peptídeo-específicas (Quadros 1 e 2; Figuras 6 e 7).

Quanto aos controles (inoculados com saponina e com PLGA vazia), observou-se mínima reação hiperplásica com pouca formação de CGs. No caso do grupo das microesferas vazias não se esperava tal comportamento, visto que não se observou diferença estatística na resposta humoral entre estas e os outros dois controles, a água milliQ e a saponina. Credita-se este fenômeno ao modo de ação das microesferas PLGA com diâmetro inferior a 10 μm . Microesferas deste tipo são

fagocitadas pelas células fagocíticas do sistema fagocítico mononuclear, apresentadoras de antígeno, e levadas aos órgãos linfóides secundários, onde funcionam como depósito de liberação lenta quando estão carregadas com antígeno. Como não foi este o caso, concluímos que a reação observada foi inespecífica, promovida pela presença destas partículas no interior das APCs.

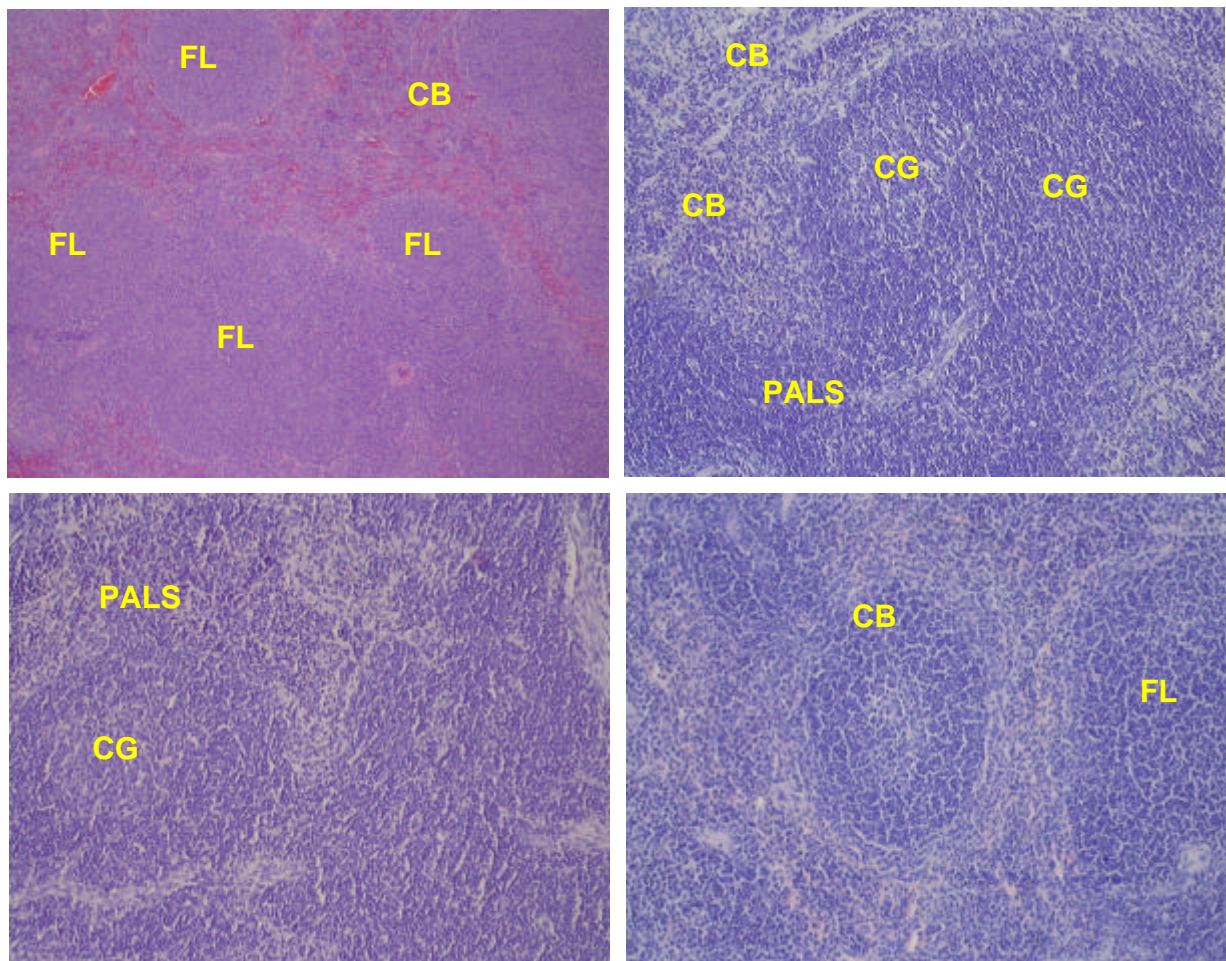


Figura 8: Baços de camundongos imunizados com SBm7462 emulsificado com saponina (A) e encapsulado em microesferas PLGA (B); imunizados com o peptídeo SPf66 encapsulado em microesferas PLGA (C); imunizados com PLGA vazia (D). Quatro dias após a terceira inoculação. Hiperplasia reacional antígeno-específica de folículos linfóides (FL) com formação de centros germinais (CG). Hiperplasia dos cordões de Billroth (CB). Hiperplasia das bainhas periarteriolas (PALS). Coloração H&E, 100X (lâmina A) e 200X (lâminas B, C e D).

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como não tivemos problemas relacionados a integridade do SBm7462, sendo verificado pelos Gráficos de exclusão cromatográfica e dicroísmo circular (Figuras 3, 4 e 5), supõem-se que o fator determinante para a baixa eficácia deste peptídeo, na eliciação de uma forte resposta humoral, em termos de produção de IgGs específicas, tenha sido sua baixa eficiência de encapsulação, podendo ter contribuído também a sua rápida liberação das microesferas PLGA (Figura 2). Pode-se descartar também um outro fator relacionado ao insucesso de imunógenos quando da utilização neste sistema de liberação, quer seja a quebra do polímero *in vivo* resultando em um microambiente ácido no interior das microesferas, o qual pode causar alteração em epítomos antigênicos, uma vez que o SBm7262 se mostrou bastante resistente a pHs ácidos como demonstrado pela técnica de dicroísmo circular.

Com base na resposta significativamente melhor, no que se refere à produção de IgGs, do peptídeo SBm7462 emulsificado com a saponina em relação ao grupo em que o peptídeo foi encapsulado nas microesferas PLGA, como também pelos estudos anteriores demonstrando a eficácia da associação peptídeo/saponina no controle do carrapato *B. microplus* em bovinos (PIMENTEL, 2002;

PATARROYO *et al.*, 2002), podemos concluir que este adjuvante é o que proporciona melhor resposta do peptídeo SBm7462.

As microesferas PLGA apresentam-se viáveis para serem utilizadas juntamente com o SBm7462, fazendo-se necessário, porém, novos estudos no sentido de melhorar o processo de encapsulação do peptídeo neste sistema liberador. Estes estudos deverão ser direcionados principalmente ao aumento da solubilidade deste peptídeo, o que, teoricamente, poderá aumentar a sua eficácia de encapsulação nas microesferas PLGA.

7 – CONCLUSÕES

- O peptídeo sintético SBm7462 mostrou uma melhor resposta humoral, em termos de produção de IgGs, quando emulsificado com o adjuvante saponina;
- É possível a utilização do SBm7462 encapsulado em microesferas PLGA, melhorando a solubilidade e a eficiência de encapsulação do referido peptídeo;
- Nos dois tipos de tratamentos em que foi utilizado, o peptídeo SBm7462 não apresentou efeitos adversos, quando avaliado pelos testes de função hepática;
- Alterações histológicas, características de uma resposta imune precoce, foram observadas, nos baço de camundongos imunizados com a formulação peptídeo-saponina, enquanto que, as formulações de microesferas apresentaram uma resposta mais tardia.
- Desta forma, não se recomenda, de imediato a utilização das microesferas PLGA em associação com o SBm7462. Reforça esta conclusão o fato da sua utilização em bovinos, até o momento, não ter uma relação custo-benefício favorável.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, S.; FLOYD, M.; SONENSHINE, D.E. Artificial immunity to *Dermacentor variabilis* (acari: ixodidae): vaccination using tick antigens. **Journal of Medical Entomology**. V.17, n.5, p.391-397, 1980.

AGUADO, T.; ENGERS, H.; PANG, T.; PINK, R. Novel adjuvants currently in clinical testing. **Vaccine**. V. 17, p.2321-2328, 1999.

ALEXANDER, J. & BREWER, J.M. Adjuvants and their modes of action. **Livestock Production Science**. V. 42, p. 153-162, 1995.

ALONSO, M.J.; GUPLA. R.K.; MIM, C.; SIBER, G.R.; LANGER, R. Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. **Vaccine**. V.12, p.299-306, 1994.

ARTHUR, D. R. **Ticks. A monograph of the Ixodidea. On the genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma*, *Boophilus* e *Margaporus***. London: Cambridge University Press, 215p., 1960.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designated for veterinary and human vaccines. **Vaccine**. V. 19, p. 2666-2672, 2001.

AUDRAN, K.; MEN, Y.; JOHANSEN, P.; GANDER, B.; CORRADIN, G. Enhanced immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid with stabilizing agents. **Pharmacology Research**. v.15, p.1111-1116, 1998.

BALASHOV, I.S. **Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure** Amer: ESA Press, 432p., 1972.

BAR, I.G.; SJOLANDER, A.; COX, J.C. ISCOMs and other saponin based adjuvants. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.32, p.247-271, 1998.

BAZILE, D.V.; ROBERT, C.; HUVE, P.;VERRECHIA, T.; MARLAND, M.; FRYDMAN, A.; VEILLARD, M.; SPENLEHAUER, G. Body distribution of fully biodegradable ¹⁴C-poly (lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. **Biomaterials**. V.13, p.1039-1102, 1992.

BOMFORD, B. The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell mediated immunity. **Clinical and Experimental Immunology**. V. 39, p. 435-441, 1980.

BOMFORD, R. Adjuvants for anti-parasite vaccines. **Parasitology Today**. V. 5, p. 41-46, 1989.

BOWERSOCK, T.L. & MARTIN, S. Vaccine delivery to animals. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.38, p.167-194, 1999.

BROWNLIE, J.; CLARKE, M.C.; HOWARD, C.J. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. **Veterinary Records**. v.114, p.535-561, 1984.

CAMPOS JÚNIOR, D. A. Avaliação *in vitro* da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) colhidos em bovinos na região de Ilhéus – Bahia, 2000. **Dissertação (mestrado)**. Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, 49p., il., 2001.

CARCABOSO, A.M.; HERNÁNDEZ, R.M.; IGARTUA, M.; GÁSCON, A.R.; ROSAS, J.E.; PATARROYO, M.E.; PEDRAZ, J.L. Immune response after oral administration of the encapsulated malaria synthetic peptide SPf66. **International Journal of Pharmaceutics**. V.260, p.273-282, 2003.

CASTELLANOS, I.J.; CARRASQUILLO, K.G.; LÓPEZ, J.J.; ALVAREZ, M.; GRIEBENOW. Encapsulation of bovine serum albumin in poly (lactide-co-glycolide) microspheres by the solid-in-oil-in-water technique. **Pharmacy and Pharmacology**. v. 53, p.167-178, 2001.

CHAVALI, S. R., CAMPBELL, J. B. Adjuvant effects of orally administered saponins on humoral and cellular immune responses in mice. **Immunobiology**. v. 174, p. 347-359, 1987.

CHEMA, S. **Parasitologia (Roma)**,V. 32, p. 201–202, 1990.

CHEUDHURY, M.R.; SHARMA, K.; GIRI, D.K. Poly (D,L-lactide) glycolide polymer microsphere entrapped tetanus toxoid: safety evaluation in Wistar rats. **Human and Experimental Toxicology**. v.15, p.205-207, 1996.

CHOU, P. Y., FASMAN, G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Advances in Enzymology. Relat. Areas Mol. Biol.**, v.47, p. 45-148, 1978

CORDOVÉS, C.O. Carrapato: Controle ou erradicação. **Guaíba, Agropecuária**, 1997.

COX F.E. Designer vaccines for parasitic diseases. **International Journal of Parasitology**, v.27, p 1147-1157, 1997.

COX, J.C. & COULTER, A.R. Adjuvants – a classification and a review of their modes of action. **Vaccine**. V. 15, p. 248-256, 1997.

DALSGAARD, K., HILGERS, L., TROUVE, G. Classical and new approaches to adjuvant use in domestic food animals. In: SCHULTZ, R. D. **Veterinary Vaccines and Diagnostics**. London: Academic Press, 820 p., 1999.

DALTON, J. P. & MULCAHY, G. Parasite vaccines – a reality? **Veterinary Parasitology**.. v. 98, p.149-167, 2001.

DAVEY, R. B., AHRENS, E. H., GEORGE, J. E., HUNTER, J. S., JEANNIN, P. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 261-276, 1998.

DAVEY, R. B., GEORGE, J. E., SNYDER, D. E. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Veterinary Parasitology**. v. 99, p. 41-52, 2001.

DE LA FUENTE, J. **Recombinant vaccines for the control of cattle tick**. Habana: Elpos Scientiae, 280 p., 1995.

DENG, X. M.; LI, X.H.; YUAN, M.L.; XIONG, C.D.; HUANG, Z.T.; JIA, W.X.; ZHANG, Y.H. Optimization of preparative conditions for poly-DL-lactide-polyethylene glycol microspheres with entrapped *Vibrio cholera* antigens. **Journal of Controlled Release**. V.58, p.123-131, 1999.

EDELMAN, R. Vaccine adjuvants. **Rev. Inf. Dis**. v. 2, p. 370-383, 1980.

EDELMAN, R. An Overview of vaccine adjuvants. In: INTERNATIONAL MEETING ON VACCINES, Salvador 1998. Anais...Salvador. p.16, 1998.

EHRENHOFER, C. & OPDEBEECK, J.P. The effects of continuous and intermittent delivery of antigens of *Boophilus microplus* on the development of murine antibodies. **Veterinary Parasitology**. v.59, p.263-273, 1995.

ELDRIDGE, J.H.; STAAS, J.K.; MEULBROEK, J.A.; TICE, T.R.; GILLEY, R.M. Biodegradable and biocompatible poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. **Infection and Immunity**. V.59, p.2978-2986, 1991.

ENGERS, H.D.; KLENY, M.P.; MALHOTRA, P.; PINK, J.R. Third meeting on novel adjuvants currently in/close to human clinical testing. World Health Organization – Organization Mondiale de la Santé, Fondation Mérieux, Annecy, France, 7-9 january 2002. **Vaccine**. V. 21, p.3503-3524, 2003.

ESTRADA-PEÑA, A. Geostatistics and remote sensing using NOAA-AVHRR satellite imagery as predictive tools in tick distribution and habitat suitability estimations for *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**. v. 81, p.73-82, 1999.

FAUSTINO, M. A. G., OLIVEIRA, M. P. B. Eficácia “in vitro” de produtos carrapaticidas em fêmeas ingurgitadas de cepas de *Boophilus microplus* do município de Garanhuns-PE. XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Anais...**, Goiânia: SOGOVE, p.156, 1996.

FRISCH, J.E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **International Journal for Parasitology**. v.29, p.57-71, 1999.

FURLONG, J., DERESZ, F., MATOS, L. L., BALBI, M. V. The effect of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infestation on milk yield and feed intake of Holstein X Zebu crossbreed cows. XV CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS. **Anais...**, Campo Grande: APCV, p.340, 1996.

GANDER, B. & MERKLE, H.P.; CORRADIN, G. Antigen delivery systems. Immunological and technological issues. New York: Harwood, 1997.

GLENNY, A.T.; BUTTLE, G.A.H.; STEVENS, M.E. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea pigs: toxoid precipitated with alum. **J. Pathol. Bacteriol**. v.34, p.267-275, 1989.

GRILLO, J.M. El problema de la resistencia a los acaricidas en los programas de control de la garrapata. **Bol. Ofic. Sanit. Panam.**, v.21, n.3, p.246-250, 1976.

GUIMARÃES, A.M., LIMA, J.D., RIBEIRO, M.F., CAMARGOS, E.R., BOZZI, I.A. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult females *Boophilus microplus* ticks. **Parasitology Research.**, v.84, p.69-74, 1998.

HILBERT, A.K.; FRITZSCHE, U.; KISSEL, T. Biodegradable microspheres containing influenza A vaccine: immune response in mice. **Vaccine.** v.17, p.1065-1073, 1999.

HOOP, T. P., WOODS, K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proceedings of National Academy of Science - U.S.A.** v.78, n.6, p.3824-3828, 1981.

HORN, S. C., ARTECHE, C. C. P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.4, n.1, p.12-32, 1985.

HOUGHTEN, A.R. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. **Proceedings of National Academy of Science, U.S.A.** v.82, p.5131-5135, 1985.

HUNTER, R.L.; STRICKLAND, F.; KEDZY, F. The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. 1. The role of the hydrophile-lipophile balance. **Journal of Immunology.** V.127. p.1244-1250, 1981.

HUNTER, R.L. & BENNETT, B. The adjuvant effect on nonionic block polymer surfactants.2. Antibody formation and inflammation related to the structure of triblock and octablock copolymers. **Journal of Immunology.** V.133. p.1367-3175, 1984.

HUNTER, R.L. Overview of vaccine adjuvants: present and future. **Vaccine.** v. 20, p. S-7 – S12, 2002.

IGARTUA, M.; HERNÁNDEZ, R.M.; ESQUISABEL, A.; GASCÓN, A.R.; CALVO, M.B.; PEDRAZ, J.L. Optimización del tamaño de partícula de microesferas de PLGA con albumina bovina. **Información Tecnológica.** v.8, n.4, p.327-332, 1997a.

IGARTUA, M.; HERNÁNDEZ, R.M.; ESQUISABEL, A.; GASCÓN, A.R.; CALVO, M.B.; PEDRAZ, J.L. Influence of formulation variables on the in vitro release of albumin from biodegradable microparticulate systems. **Journal of Microencapsulation.** v.14, n.3, p.349-356, 1997b.

IGARTUA, M.; HERNÁNDEZ, R.M.; ESQUISABEL, A.; GASCÓN, A.R.; CALVO, M.B.; PEDRAZ, J.L. Enhanced immune response after subcutaneous and oral immunization with biodegradable PLGA microspheres. **Journal of Controlled Release**. V. 56, p.63-73, 1998.

JACKSON, L.A. & OPDEBEECK, J.P. Quil A and ISCOMs as adjuvants for midgut membrane antigens of *Boophilus microplus*. **Appl. Parasitol.**, v.35, n.2, p.87-98, 1994.

JONES, D.H.; BcBRIDE, B.W.; JEFFERY, H.; O'HAGAN, D.T.; ROBINSON, A.; FARRAR, G.H. Protection of mice from *Bordetella pertussis* respiratory infection using microencapsulated pertussis fimbriae. **Vaccine**. v.13, p.675-681, 1995.

JONSSON, N.N.; MAYER, D.G.; MATSCHOS, A.L.; GREEN, P.E.; ANSELL, J. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. **Veterinary Parasitology**. V.78, p.65-77, 1998.

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 parasite on vaccinated cattle. **International Journal for Parasitology**. v. 16, n.2, p.115-120, 1986.

KIMARO, E.E., OPDEBEECK, J.P. Tick infestations on cattle vaccinated with extracts from the eggs and the gut of *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**. v.52, n.1-2, p.61-70, 1994.

KENNEY, R.T.; RABINOVICH, N.R.; PICHYANGKUL, S.; PRICE, V.L.; ENGERS, H.D. 2nd meeting on novel adjuvants currently in/close to human clinical testing. World Health Organization – Organization Mondiale de la Santé Fondation Mérieux, Annecy, France, 5-7 June 2000. **Vaccine**. V. 20, p.2155-2163, 2002.

KISSEL, T.; BRICH, Z.; BANTLE, S.; LANCRANJAN, I.; NIMMERFALL, F.; VIT, P. Parenteral depot-systems on the basis of biodegradable polyesters. **Journal of Controlled Release**. V.16, p.27-42, 1991.

KRIEG, M.A.; AE-KYUNG, Y.; SCHORR, J.; DAVIS, H.L. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. **Trends in Microbiology**. V.6, p.23-27, 1998.

KRIEG, M.A.; AE-KYUNG, Y.; HARTMANN, G. Mechanisms and therapeutic of immune stimulatory CpG DNA. **Pharmacology & Therapeutics**. V.84, p.113-120, 1999.

KYTE, J., DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**. v.157, n.1, p.105-132, 1982.

LIMA, O. L.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica – Técnica e Interpretação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 699p., 1985.

LIMA, K.M. & RODRIGUES-JUNIOR. Poly-DL-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.32, p.171-180, 1999.

LIMA, K.M.; SILVA, C.L.; RODRIGUES-JUNIOR, J.M. **Microesferas Biodegradáveis**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. v.12, p.10-13, 2000.

LODOS, J, OCHAGAVIA, M. E., RODRIGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. A. simulation study of the effects of acaricides and vaccination on *Boophilus* cattle-tick populations. **Preventive Veterinary Medicine**. v.38, p. 47-63, 1999.

MAA, Y.-F.; HSU, C.C. Effect of primary emulsions on microsphere size and protein-loading in the double emulsion process. **Journal of Microencapsulation**. V.14, p.225-241, 1997.

MARCIANI, D.J. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. **Drug Discovery Today**. v.8, n. 20, p.935-943, 2003.

McKEEVER, U.; BARMAN, S.; HAO, T.; CHAMBERS, P.; SONG, S.; LUNSFORD, L.; HSU, Y.-Y.; ROY, K.; HEDLEY, M.L. Protective immune responses elicited in mice by immunization with formulations of poly (lactide-co-glycolide) microparticles. **Vaccine**. V. 20, p.1524-1531, 2002.

MEN, Y.; THOMASSIN, C.; MERKLE, H.P.; GANDER, B.; CORRADIN, G. A single administration of tetanus toxoid in biodegradable microspheres elicits T cell and antibody responses similar or superior to those obtained with aluminium hydroxide. **Vaccine**. v.13, p.683-689, 1995.

MEN, Y.; GANDER, B. MERKLE, H.P. CORRADIN, G. Induction of sustained and elevated immune responses to weakly immunogenic synthetic malarial peptides by encapsulation in biodegradable polymer microspheres. **Vaccine**. v.14, p.1442-1450, 1996.

MEN, Y.; TAMBER, H.; AUDRAN, R.; GANDER, B.; CORRADIN, G. Induction of a cytotoxic T lymphocyte response by CTL peptide entrapped in biodegradable polymer microspheres. **Vaccine**. v.15, p.1405-1412, 1997.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of American Chemistry Society**. v.85, p.2149, 1963.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.I. **Medicina de Laboratório Veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 308p, 1995.

MILGATE, J. & ROBERTS, D.C.K. The nutritional and biological significance of saponins. **Nutr. Res.** V.15, p.1223-1248, 1995.

MURAKAMI, H.; KOBAYASHI, M.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Further applicatoin of a method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles. **Powder Technology.** v.107, p.137-143, 2000.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper: Bioquímica**. 7 ed. Atheneu Editora: São Paulo, 763p., 1994.

NEURATH, A. R., KENT, S. B. H. Requirements for successful synthetic peptide vaccines. **Ann. Inst. Pasteur.Virol.**, v.137E, p.513-514, 1986.

NEWTON, L. G. Acaricide resistance and cattle tick control. **Australian Veterinary Journal.** v.43, n.9, p.389-394, 1967.

NUÑEZ, J. L., MUÑOZ, C. M. E., MOLTEDO, H. L. **Boophilus microplus: La Garrapata Común del Ganado Vacuno**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1982. 184p.

O'HAGAN, D.T.; McGEE, J.P.; HOLMGREN, J.; MOWAT, A.; DONACHIE, A.M.; MILLS, K.H.G. Biodegradable micropaticles for oral immunization. **Vaccine.** v. 11, n.2, p.965-969, 1993.

O'HAGAN, D.T.; RAHMAN, D.; JEFFREY, H.; SHARIF, S.; CHALLACOMBE, S.J. Controlled release of microparticles for oral immunization. **International Journal of Pharmaceutics.** V.108, p.133-139, 1994.

O'HAGAN, D.T.; MACKICHAN, M.L.; SINGH, M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. **Biomolecular Engineering.** V.18, p.69-85, 2001.

OLIVEIRA, R. C. **Avaliação experimental do peptídeo sintético 4912 como imunógeno para o controle de carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)**. Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV, 72p., 1998.

PARTIDOS, C.D.; VOHRA, P.; ANAGNOSTOPOULOU, C.; JONES, D.H. FARRAR, G.H.; STEWARD, M.W. Biodegradable microparticles as a delivery system for measles virus cytotoxic T cell epitopes. **Molecular Immunology.** V.33, n.6, p.485-491, 1996.

PATARROYO, J. H., COSTA, J. O. Susceptibility of brazilian samples of *Boophilus microplus* to organophosphorus acaricides. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v.12, n.1, p.6-10., 1980.

PATARROYO, J. H. Babesiose bovina: controle de vetores com vacinas a base de peptídeos sintéticos. **Rev. Patol. Trop.**, v.23, n.2, p.145-146, 1994.

PATARROYO, J. H., MAFRA, C. L., SEIXAS, P. B., SAMMARCO, P., PRATES, A. A., GUZMAN, F., PEREIRA, R. W. Peptídeos sintéticos como vacinas para o controle de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9., Campo Grande 1995. **Anais...** Campo Grande: CBPV. p.95, 1995.

PATARROYO, J. H.; PORTELA, R.W.; DE CASTRO, R.O.; PIMENTEL, J.C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E.; VARGAS, M.I.; PRATES, A.A.; DIAS MENDES, M.A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.88, p.163-182, 2002.

PEGRAM, R.G.; JAMES, A.D.; OOSTERWIJK, G.P.M. **Exp Appl Acarol**. V. 12, p.9-26, 1991.

PENICHET, M.; RODRIGUEZ, M.; CASTELLANO, O.; MANDADO, S.; ROJAS, Y.; RUBIERA, R.; SÁNCHEZ, P.; LLEONART, R.; DE LA FUENTE, J. Detection of Bm86 antigen in different strains of *Boophilus microplus* and effectiveness of immunization with recombinant Bm86. **Parasite Immunology**. v. 16, p.493-500, 1994.

PEREIRA, M.U. **Estudo *in vitro* e *ex vivo* da toxicidade hepática de sistemas poliméricos preparados a partir de ácido poli-lático e co-polímero do ácido glicólico**. Dissertação (mestrado). Belo Horizonte: UFMG, 100 p., 2001.

PEREZ, C.; CASTELLANOS, I.J.; COSTANTINO, H.R.; AL-AZZAM, W.; GRIEBENOW, K. Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.54, p.301-313, 2002.

PIMENTEL, J.C. **A vacina sintética Sbm7462 no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em animais estabulados e a campo**. Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV, 78 p., 2002.

PORTELA, W.D. **Comparação experimental de três peptídeos sintéticos como imunógenos no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887).** Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV, 87 p., 2000.

PRELS, I. & LANGER, R.S. A single-step immunization by sustained antigen release. **Journal of Immunological Methods**. V.28, p.193-197, 1979.

PROPHET, E.B., MILLS, B., ARRINGTON, J.B., SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology – Armed Forces Institute of Pathology.** Washington, 274p., 1992.

PRUET, J.H. Immunological control of arthropod ectoparasites – a review. **International Journal for Parasitology**. V. 29, p.25-32, 1999.

RAMON, G. S. Faugmentation anormale de Fantitoxine chez les chevaux producteurs de sérum antidiphthérique. **Bull Soc. Centr. Med. Vet.** 1925: 101:227.

RODRIGUES Jr, J.M.; CROFT, S.L.; FOSSI, H.; BORIES, C.; DEVISSAGUET, J.Ph. The activity and ultrastructural localization of primaquine-loaded poly (D,L-lactide) nanoparticles in *Leishmania donovani*-infected mice. **Tropical Medicine and Parasitology**. v.45, p.223-228, 1994.

ROSAS, J.E.; HERNÁNDEZ, R.M.; GASCÓN, A.R.; IGARTUA, M.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E.; PEDRAZ, J.L. Biodegradable PLGA microspheres as a delivery system for malaria synthetic peptide SPf66. **Vaccine**. V. 19, p. 4445-4451, 2001.

ROSAS, J.E.; PEDRAZ, J.L.; HERNÁNDEZ, R.M.; GASCÓN, A.R.; IGARTUA, M.; GUZMAN, F.; RODRIGUEZ, R.; CORTÉS, J.; PATARROYO, M.E.; Remarkably high antibody levels and protection against *P. falciparum* malaria in *Aotus monkeis* after a single immunisation of SPf66 encapsulated in PLGA microspheres. **Vaccine**. v.20, p.1707-1710, 2002.

SCHINJS, V.E.J.C. Antigen delivery systems and immunoestimulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 87, p.195-198, 2002.

SCOTT, M. T.; GOSS-SAMPSON, M.; BOMFORD, R. Adjuvant activity of saponin: antigen localization studies. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 77, p. 409-412, 1985.

SHARP, P. J.; MCINERNEY, B. V.; SMITH, D. R.; TURNBULL, I. F.; KEMP, D. H.; RAND, K. N.; COBON, G. S. Chromatography and generation of specific antisera to synthetic peptides from a protective *Boophilus microplus* antigen. **Journal of Chromatography**. v.512, p.189-202, 1990.

SONENSHINE, D.E. **Biology of ticks** v. 2. New York: Oxford University Press, 465p., 1991.

SWENSON, M.J. **Dukes-Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 799p., 1988.

TABATA, Y. & IKADA, Y. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers. **Journal of Biomedical Materials Research**. v.22, p.837-858, 1988.

THOMASIN, C.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. 2. Parameters determining microsphere formation. **Journal of Pharmacology Science**. V.87, p.269-275, 1998.

VAN DE WEERT, M.; HENNIK, W.E.; JISKOOT, W. Protein instability in poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles. **Pharmacology Research**. V.17, p.1159-1167, 2000.

VAZ JUNIOR, I. S.; OZAKI, L.S.; MASUDA, A. Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissues. **Veterinary Parasitology**. v.52, n.1-2, p.71-78, 1994.

VERÍSSIMO, C. J. Prejuízos causados pelo carrapato *Boophilus microplus*. **Zootecnia**. 31 (3/4), p 97-106, 1993.

VETERINARY FORMULARY, 1994. Second edition. In: Debut, Y.M. (Ed.). Pharmaceutical Press, London.

VISSCHER, G.E.; ROBISON, R.L.; MAULDING, H.V.; FONG, J.W.; PEARSON, J.E.; ARGENTIERE, G.J. Biodegradation of and tissue reaction to poly (D,L-lactide) microcapsules. **Journal of Biomedical Materials Research**. v.20, p.667-676, 1986.

WARREN & CHEDID, L.A. Future prospects for vaccine adjuvants. **CRC Crit. Rev. Immunol**. V.8, p. 83-99, 1988.

WHARTON, R. H. The Current status and prospects for the control of ixodid ticks with pecial emphasis on *Boophilus microplus*. **Bull. Int. Epizoot.**, v.81, n.1-2, p.65-85, 1974.

WILLADSEN, P.; RIDING, G. A.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H.; TELLAM, R. L.; NIELSEN, J. N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G. S.; GOUGH, J. M. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**. v.143, n.4, p.1346-1351, 1989.

WILLADSEN, P. & MCKENNA, R.V. Vaccination with 'concealed' antigens: myth or reality? **Parasite Immunology**. v.13, n.6, p.605-616, 1991.

WILLADSEN, P. Immunological control of ectoparasites: past achievements and future research priorites. **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering**. V.15, p.131-137, 1999.

WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**. v.71, p.209-222, 1997.

WOODARD, L.F. Surface chemistry and classification of vaccine adjuvants and vehicles. In: Mizraki, A. (Ed.), **Bacterial Vaccines**. Alan R. Liss, Inc., New York, p.281-306, 1990.