

Desenvolvimento de nanossistemas imunomoduladores para aplicação no controle do carrapato bovino¹

*Érica Maria Clemente Pereira*²
*Mariana Magalhães Campos*³
*Abias Santos Silva*⁴
*Jaciara Davião*⁵
*Luiz Felipe Martins Neves*⁶
*Mariana Brito Gomes*⁷
*Marcia Cristina de Azevedo Prata*³
Wanessa Araújo Carvalho^{3,8}

Resumo: Atualmente, um dos grandes vilões da pecuária brasileira é o *Rhipicephalus microplus*. Também conhecido como Carrapato-do-boi, é um ectoparasito bovino causador de extensos prejuízos tanto na sanidade animal, quanto na economia do país. Diversas técnicas foram desenvolvidas para o controle das infestações dos rebanhos por esse carrapato, porém, com o uso inapropriado, as metodologias se tornaram ineficazes e até mesmo danosas para a saúde humana e animal. Foram desenvolvidas vacinas com a mesma finalidade de controle das infestações pelo *R. microplus*, mas, até então, não foi alcançada a manutenção da imunidade pelos animais imunizados. Portanto, busca-se com esse experimento, o desenvolvimento de um nanossistema imunomodulador capaz de atuar no controle do carrapato bovino através da modulação da atividade de células mononucleares no sangue periférico bovino.

Palavras-chave: carrapato bovino, carrapato, *Rhipicephalus microplus*, bovino, nanossistema, metabólica

Development of immunomodulatory nanosystems for application in the control of bovine tick

Abstract: Currently, one of the great villains of Brazilian livestock is *Rhipicephalus microplus*. Also known as “Carrapato-do-boi”, it is a bovine ectoparasite that causes extensive damage to both health and the country's economy. Several techniques have been developed to control herd infestations by this tick, however, with inappropriate use, the methodologies have become ineffective and even harmful to human and animal health. Vaccines were developed with the same purpose of controlling infestations by *R. microplus*, but so far the maintenance of immunity by immunized animals has not been achieved. Therefore, looking for with this experiment, the development of an immunomodulatory nanosystem capable of acting in the control of bovine ticks through modulation of mononuclear cell activity in bovine peripheral blood is sought.

Keywords: bovine tick, tick, *Rhipicephalus microplus*, bovine, nanosystem, metabolomics.

¹ O presente trabalho foi realizado com o apoio da FAPEMIG, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais e do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto SEG 10.19.03.054.00.00, liderado por Wanessa A. Carvalho.

² Graduanda em Medicina Veterinária – UFJF. Bolsista PIBIC FAPEMIG. e-mail: ericaclemnete99@gmail.com

³ Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite, e-mail: wanessa.carvalho@embrapa.br, mariana.campos@embrapa.br, marcia.prata@embrapa.br

⁴ Doutor em Zootecnia – UNESP, e-mail: abias.severo@gmail.com

⁵ Doutora em Ciência Animal - UFRJ, e-mail: jaciaviavao@gmail.com

⁶ Doutorando em Zootecnia – UFMG, e-mail: luizneveszoo@yahoo.com.br

⁷ Médica veterinária, Mestranda em Zootecnia – UFMG, e-mail: mariana.brito.gomes@gmail.com

⁸ Orientadora

Introdução

No Brasil, existem duas famílias de carrapatos, a *Ixodidae* e a *Argasidae*. O carrapato *Rhipicephalus microplus*, também conhecido como Carrapato-do-boi, pertence à *Ixodidae* e é responsável por causar mais de três bilhões de dólares de perdas anuais na cadeia produtiva de bovinos no Brasil. Embora possa ser encontrado parasitando outras espécies, o bovino é considerado o seu hospedeiro principal, onde se fixa para se alimentar do sangue e, por consequência, ocasiona diferentes e negativas situações (GARCIA *et al.*, 2019). Ao se alimentar do sangue de seu hospedeiro, o ectoparasita realiza o processo de hematofagia, que quando feita por altas infestações, ocasiona uma redução na produção de leite e no ganho de peso do animal. Além disso, no momento em que se alimenta, uma porta de entrada está feita para a transmissão de agentes etiológicos da “tristeza parasitária bovina” como também, nesse momento de fixação, é realizada uma ferida na pele do animal. As lesões depreciam o couro, diminuindo seu valor no mercado e permitem a ocorrência de infecções secundárias com possibilidade de agravamento por miíases (SILVEIRA *et al.*, 2014; RODRIGUEZ-VIVAS *et al.*, 2018; GARCIA *et al.*, 2019).

Atualmente, existem diferentes técnicas de controle da população de carrapato-do-boi. Dentre elas, as principais são o uso de acaricidas, o controle biológico por fungos, a remoção manual e a vacinação (RODRIGUEZ-VIVAS *et al.*, 2018). Os acaricidas, ou seja, produtos químicos convencionais à base de piretróides, formamidinas, lactonasmacrocíclicas, tiazolidinas, organofosforados ou fenilureias, têm apresentado uma alta taxa de resistência e isso devido ao número excessivo de aplicações aliadas a dosagens acima do recomendado, em intervalos menores do que o necessário. Além da resistência dos ectoparasitos e, portanto, certa ineficiência no uso desses produtos, a sua aplicação sem o uso de equipamentos de proteção e sem respeito à contaminação da carne e do leite pelos resíduos, acarreta problemas na saúde humana e animal. Com isso, aumenta-se a necessidade pelo desenvolvimento de técnicas para o controle do *R. microplus* que sejam mais sustentáveis, livre de resíduos, mais específica e com menores problemas de resistência (SILVEIRA *et al.*, 2014; MENDES *et al.*, 2019). Essas necessidades são atendidas pelo uso de vacinas contra o ectoparasita que ainda apresentam melhor custo-benefício e maior qualidade de vida dos animais domésticos (SILVEIRA *et al.*, 2014). Em 1994, a *TickGARD® foi lançada como a primeira vacina comercial atuante no controle do carrapato, formulada com a proteína encontrada no tubo digestivo do ectoparasita Bm86, ocasionando o vazamento de conteúdo intestinal para a hemocele do carrapato, reduzindo ligeiramente o número de fêmeas ingurgitadas, seu peso médio e fecundidade e reduzindo a produção de larvas. Em 1995, foi nomeada de “GAVAC” a vacina constituída do clone da levedura *Pichia pastoris*. Em 1996, a proteína Bm 86 foi acrescida do adjuvante VaxiMAX, que, segundo testes, induzia a uma maior produção de anticorpos, e criou-se a *TickGARD PLUS®. Por último, foi desenvolvida a SBm7462, uma vacina sintética com ação de indução de uma forte atividade estimuladora das células linfóides por meio de peptídeos sintéticos (SILVEIRA *et al.*, 2014). Porém, essas vacinas têm a sua eficácia comprometida pela sua não capacidade de induzir uma imunidade duradoura e também ser necessário o uso combinado de acaricidas. Sendo assim, esse projeto busca desenvolver um nanossistema imunomodulador (SEI 21179.004094/2020-86- processo de patente sigiloso), prospectados por análises de imunometabolômica, capaz de atuar no controle do carrapato bovino através da modulação da atividade de células mononucleares no sangue periférico bovino.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB) da Embrapa Gado de Leite em Coronel Pacheco seguindo normas de bem-estar animal e experimentação registrados sob o protocolo CEUA N° 1915290721. Basicamente, foram utilizados novilhas e garrotes, sendo todos da raça Holandesa preto e branco. Esses animais foram separados em dois grupos e imunizados, via intramuscular, na tábua do pescoço, com o extrato de larva (grupo controle; 10ug em 1 ml de solução salina) e com o nanossistema conjugado com extrato de larva na mesma concentração e volume. Posteriormente, esses animais foram infestados com 20.000 larvas do *R. microplus*. Após a conclusão do ciclo de crescimento das larvas, 21 dias após a infestação, foi realizada a contagem e a coleta de teleóginas, ou seja, as fêmeas adultas ingurgitadas por se alimentarem do sangue do hospedeiro bovino. Os ectoparasitas coletados foram levados ao laboratório da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, onde foi realizada a pesagem da teleóquina e sua fixação na placa para conclusão da fase reprodutiva e, assim, mensuração da capacidade reprodutiva da fêmea que teve contato com os imunizantes ao se alimentar do sangue do hospedeiro. Também foi realizada a coleta de sangue em um total de 4 ml de sangue periférico em tubos *vacutainer* sem anticoagulante (tampa vermelha) para extração de soro e quantificação de anticorpos por ELISA nessa mesma data. Para extração do soro, os tubos contendo sangue serão colocados, inicialmente, em um ângulo aproximado de 15°, em temperatura ambiente por 30 minutos a 1 hora, seguido por 2 horas na geladeira com posterior centrifugação à 2500g por 10 minutos. Esse processo foi realizado para que ocorra a separação do sangue coagulado do soro para que este possa ser coletado, cuidadosamente, através do auxílio de micropipetas, formando-se sete alíquotas de 1,5 ml. Essas alíquotas estão armazenadas no freezer à -20°C em microtubos devidamente identificados com o número do animal e o imunizante utilizado até o desenvolvimento dos ensaios de ELISA.

Resultados e Discussão

Após a conclusão do ciclo de crescimento das larvas do *R. microplus* que foram utilizadas para infestar as novilhas e os garrotes, foi realizada a contagem do número de teleóginas presentes no lado direito de cada animal participante do experimento identificado por um número específico.

NÚMERO DE TELEÓGINAS ENCONTRADAS NO LADO DIREITO DOS ANIMAIS IMUNIZADOS			
ANIMAIS/BRINCOS	CONTROLE¹/TELEÓGINAS	ANIMAIS/BRINCOS	NANO+EL²/TELEÓGINAS
1132	520	1133	361
1125	552	1152	313
1128	744	1130	340
1135	580	1131	485
MÉDIA	599	MÉDIA	374,75
DP	86,36550237	DP	65,88768853

1 Somente extrato de larva (10ug em 1 ml de solução salina). 2 Nanossistema conjugado com extrato de larva (10ug em 1 ml).

Pode-se observar que os animais imunizados com o nanossistema conjugado com extrato de larva apresentaram uma menor carga parasitária, seja no número absoluto por animal ou no número médio do grupo.

Conclusão

O nanossistema imunodulador conjugado com extrato de larva possui ação capaz de diminuir a carga parasitária do *R. microplus* em experimento controlado com animais taurinos, mas ainda são necessários mais experimentos para comprovar a eficiência do nanossistema em larga escala, visando sua aplicação no controle do carrapato bovino *R. microplus*.

Referências

GARCIA, M. V., RODRIGUES, V. das S., KOLLER, W. W., ANDREOTTI, R. biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: ANDREOTTI, R., GARCIA, M. V., KOLLER, W. W. (Ed.). **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília: Embrapa, 2019. P. 16-25.

GOMES, A. **Controle do carrapato do boi: um problema para quem cria raças européias**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1998. 7 p. (Documentos, 31)

MENDES, T. M., BALBINO, J. N. F., TORRES SILVA, L. A. F. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*: uma revisão sobre as perspectivas, distribuição e resistência. **PUBVET**, v. 3, p. 1-9, 2019. doi: 10.31533/pubvet.v13n6a347.1-9

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I., JONSSON, N. N., BHUSHAN, C., Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, v. 117, p. 3-29, 2018. doi: 10.1007/s00436-017-5677-6

SILVEIRA, W.H., CARVALHO, G. D., PECONICK, A. P. Medidas de controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: uma breve revisão. **PUBVET**, v.8, Artigo 1715, 2014.