

**JORGE COUTO PIMENTEL**

**A VACINA SINTÉTICA SBm7462 NO CONTROLE DO CARRAPATO  
*Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) EM ANIMAIS ESTABULADOS E A  
CAMPO**

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  
2002**

*A*  
*José,*  
*Ana e Didi ;*  
*Um pai,*  
*Duas mães,*  
*Muitos filhos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao amigo Joaquin Patarroyo, também orientador, pela confiança, respeito, amizade e lucidez na pesquisa e no conforto aos orientados.

À professora Marlene Vargas pela amizade e orientação nestes tantos anos de convivência.

Ao Dr. John Furlong, pela orientação, amizade e disposição em permitir um trabalho interinstitucional proporcionando uma grandeza única.

Ao Dr. José Henrique Bruschi, gerente do Campo Experimental da EMBRAPA-GADO DE LEITE, pelo apoio e apreço dispensados e também pela viabilização deste trabalho no campo experimental da EMBRAPA.

A Aline Prates e Márcio Mendes, pelos “puxões de orelha” no laboratório, pela convivência agradável e por ser o suporte de qualquer um que passe pelo LBCH.

Ao Klínger, meu braço direito em Coronel Pacheco, ao Dedi e ao Placidino pelos ótimos dias que passei na EMBRAPA-CNPGL unindo trabalho e amizade; suando e rindo muito.

A Márcio Oliveira e Sidimar Sossai que muito me ajudaram e que em minha ausência estavam segurando as pontas.

Ao Instituto de Immunologia del Hospital San Juan de Dios em Bogotá, Colômbia, pela síntese dos peptídeos utilizados neste trabalho.

Ao professor Paulo de Marco e sua equipe pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos, Daniela Rezende, Bráulia Costa, Ricardo Portela e Carlos Henrique, pela ajuda, atenção e amizade.

Aos motoristas da UFV, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos amigos de todas as horas Nino Antônio Camini, Artur Kanadani, Roberto Vieira e Luciano Virtuoso com os quais sempre pude contar.

Aos funcionários do DVT Rosi, Geraldinho, Cléia e Heloísa os quais muito me ajudaram para as idas e vindas a Coronel Pacheco.

Ao Cláudio, Adão, Cauzinho, José Carlos e a José de Oliveira pela amizade.

Aos amigos D. Didi, Silvânia, Jaíne, Dilma, Marcelo, Fabiano e Fábio pelas ótimas gargalhas em Viçosa.

Aos meus colegas de Mestrado Alfredo, Flávia, Tereza, Juan, Leonardo, Mayra, Cláudia e Ramon e tantos outros com quem convivi.

A Carla, pelo companherismo, apoio e afeto - quem muito me ajuda enquanto ser humano.

Aos meus pais.

A D. Didi, presente imensamente em minha vida em Viçosa.

A Viçosa, pelo frio e calor inesquecíveis.

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

## BIOGRAFIA

Jorge Couto Pimentel nasceu em 02 de março de 1977, em Caetité, Bahia, filho de José da Silva Pimentel e Ana Couto Pimentel.

Cursou o Ensino Fundamental no Instituto de Educação Anísio Teixeira, na cidade de Caetité – BA e o Ensino Médio no Colégio Técnico da Fundação José Carvalho, Pojuca – BA. Formou-se em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, em 14/01/2000.

Foi bolsista de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq, no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários DVT/BIOAGRO, de agosto de 1997 a julho de 1999, sob a orientação do professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, com o projeto “Influência de Ferormônios no ciclo biológico de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)” e monitor nível I da disciplina Imunologia Básica no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa de agosto a dezembro de 1999.

Ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa em fevereiro de 2000, concluindo-o em 22 de fevereiro de 2002.

## ÍNDICE

	página
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	3
3 - REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 – O carrapato <i>Boophilus microplus</i> .....	4
3.2 – A importância do <i>Boophilus microplus</i> .....	6
3.3 – Interação entre o meio ambiente e o ciclo do <i>Boophilus microplus</i> .....	7
3.4 – Relação parasita-hospedeiro.....	9
3.5 – Métodos de controle.....	12
3.5.1 – Controle químico.....	12
3.5.2 – Controle alternativo.....	13
3.5.3 – Controle imunológico.....	14
3.5.3.1 – Vacinas contra parasitas em Medicina Veterinária...	14
3.5.3.2 – Vacinas contra carrapatos.....	16
3.6 – Peptídeos sintéticos.....	21

	página
3.7 – Memória imunológica e as vacinas contra carrapatos.....	23
3.8 – Adjuvante saponina.....	26
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 – Local de estudo.....	28
4.2 – Campo experimental.....	28
4.3 – Área de confinamento.....	29
4.4 – Animais utilizados e manutenção.....	29
4.5 – Peptídeo sintético.....	29
4.6 – Adjuvante.....	31
4.7 – Esquema de inoculação.....	31
4.8 – Manutenção da colônia de <i>Boophilus microplus</i> .....	32
4.9 – Desafio.....	32
4.9.1 – Desafio a campo.....	32
4.9.2 – Desafio artificial em estábulo.....	33
4.10 – Contagem de carrapatos a campo.....	33
4.11 – Avaliação dos parâmetros biológicos das teleóginas desprendidas dos animais.....	33
4.11.1 – Parâmetros biológicos de teleóginas desprendidas e de seus ovos.....	33
4.11.2 – Relação peso larvas/grama de ovos.....	34
4.11.3 – Fórmulas para avaliação dos parâmetros biológicos.....	34
4.12 – Análise de sobrevivência de larvas nas pastagens.....	35
4.13 – Coleta de sangue dos animais para a obtenção de soro.....	36
4.14 – Pesagem dos animais.....	37
4.15 – Teste de ELISA anti-SBm7462 para medição da resposta imune humoral.....	37
4.16 – Análise estatística.....	39
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 – Predição computacional do peptídeo sintético SBm7462.....	40
5.2 – Contagem de carrapatos a campo.....	42

	página
5.3 – Cinética de anticorpos anti-peptídeo sintético SBm7462.....	42
5.4 – Avaliação dos parâmetros biológicos de <i>Boophilus microplus</i> provenientes de animais inoculados com peptídeo sintético SBm7462.....	49
5.5 – Análise de sobrevivência de larvas de <i>Boophilus microplus</i> provenientes de animais inoculados com peptídeo sintético SBm7462.....	59
6 - CONCLUSÕES.....	62
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

## RESUMO

PIMENTEL, Jorge Couto M. S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002. **A vacina sintética SBm7462 no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em animais estabulados e a campo.** Orientador: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Conselheiros: Marlene Isabel Vargas Vilória e John Furlong.

O peptídeo sintético SBm7462 foi avaliado como imunógeno para o controle do carrapato *Boophilus microplus* em teste misto (estábulo e campo). O estudo se realizou com as doses de 1,0mg e 2,0mg em 30 bovinos da raça holandesa com média de grau de sangue de 91,16% (H/Z), os quais foram mantidos sob o manejo rotineiro no Campo Experimental do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite-EMBRAPA/CNPGL em pastos altamente infestados com larvas dessa espécie de carrapato. Os animais foram separados em três grupos: vacinal 2,0mg, vacinal 1,0mg e controle, sendo os grupos vacinais imunizados nos dias 0, 30 e 60 a campo. Foram realizadas a contagem de carrapatos e a coleta de sangue semanalmente, a partir do dia 0. Duas semanas após a terceira inoculação, os animais foram levados para baias individuais e submetidos a uma infestação artificial com um total de 4.500 larvas/animal de *B. microplus* (amostra “Porto Alegre”). A partir do 19º dia pós-infestação, foram coletadas as teleóginas

desprendidas, contadas, pesadas, identificadas e incubadas em estufa B.O.D. por quinze dias, quando os respectivos ovos foram pesados. A análise da fertilidade desses ovos e a viabilidade das larvas provenientes foram também analisadas. A cinética da produção de anticorpos foi acompanhada através de ELISA, obtendo-se títulos maiores para os grupos vacinais, estatisticamente diferentes do grupo controle ( $p < 0,01$ ). Os parâmetros biológicos foram analisados levando-se em conta o número de teleóginas, peso dos ovos e fertilidade dos ovos. A eficácia foi de 15,8% para a dose de 1,0mg do peptídeo sintético SBm7462 e de 53,29% para 2,0mg, com diferenças estatísticas significativas entre os grupos 1,0mg, 2,0mg e controle ( $p < 0,05$ ). Quanto à avaliação do número de carrapatos a campo, não houve diferença estatística entre os grupos testados. Os resultados obtidos mostram que o peptídeo sintético SBm7462 é uma alternativa viável para o controle do carrapato comum dos bovinos, pela sua eficácia, segurança e baixo custo.

## ABSTRACT

PIMENTEL, Jorge Couto M.S., Federal University of Viçosa, February, 2002.

**The synthetic vaccine SBm7462 in the control of the tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) in animals in stable and in field.** Adviser: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Committee Members: Marlene Isabel Vargas Vilorio and John Furlong.

The synthetic peptide SBm7462 was evaluated as immunogen for the control of the tick *Boophilus microplus* in mixed test (stable and field). The study was done with the quantity of 1,0mg and 2,0mg of the peptide SBm7462 on 30 Holstein female cattles (91,16% H/Z), which were maintained under the routine handling in the experimental field of the Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite-EMBRAPA/CNPGL on pastures highly infested with larvae of that tick species. The animals were separate in three groups: vaccinated with 2,0mg, vaccinated with 1,0mg and control, being the vaccinated groups immunized on the days 0, 30 and 60 in field. The count of the adults females ticks and the blood collection were weekly done, starting from the day 0. Two weeks after the third inoculation, the animals were taken to individual stalls and submitted to an artificial infestation with 4.500 larvae/animal of *B. microplus* (strain "Porto Alegre"). Starting on the 19<sup>o</sup>. day post-infestation, the adult females ticks were collected,

counted, identified, weighed and incubated in B.O.D. After 15 days, the respective eggs were weighed. The analysis of the eggs fertility and the viability of the larvae were also analyzed. The kinetics of the production of antibodies was accompanied through of ELISA, being obtained larger titles for the vaccinated groups with statistic differences to the control group ( $p < 0,01$ ). The biological parameters were analyzed through of the account the number of adult females ticks, eggs weight and eggs fertility. The efficacy was of 15,8% for the 1,0mg of the synthetic peptide SBm7462 and of 53,29% for the 2,0mg, of the same peptide, with significant statistical differences among the groups 1,0mg, 2,0mg and control ( $p < 0,05$ ). When compared the number of ticks in field, there was not statistic difference among the tested groups. The obtained results show that the synthetic peptide SBm7462 is a viable alternative for the control of the cattle tick, regarding its efficacy, safety and low cost.

## 1 - INTRODUÇÃO

O carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) é um ectoparasita de importância para a bovinocultura nacional e mundial, estando distribuído em todas as regiões tropicais e sub-tropicais. Os danos causados à saúde animal podem ser diretos ou indiretos, seja pela hematofagia, inoculação de toxinas e depreciação do couro, assim como pela capacidade de transmitir patógenos de alta morbidade e mortalidade. Conseqüentemente, há aumento nos custos da produção bovina com gastos em medicamentos, insumos para o controle, assistência técnica e pesquisa.

O método atualmente empregado no controle do *B. microplus* pode ser classificado basicamente como químico e inclui o uso sistemático de acaricidas sob a forma de banhos de aspersão, imersão, tratamentos “pour-on” e fármacos injetáveis. Entretanto, se constatou o surgimento crescente de populações de carrapatos resistentes aos seus princípios ativos, bem como danos ao ecossistema pelos resíduos químicos. Tais fatos têm levado os pesquisadores a testar métodos alternativos de controle, como o controle biológico e o uso de vacinas recombinantes e sintéticas.

TRAGER (1939) foi quem primeiro citou a imunidade adquirida a carrapatos, mas somente nas últimas duas décadas é que surgem trabalhos de pesquisa que utilizam extratos protéicos purificados a partir de células intestinais

de *Boophilus microplus*, bem como faz-se uso de imunógenos recombinantes com base na proteína Bm86. Esses antígenos foram denominados “antígenos escondidos”, os quais não estariam expostos diretamente ao sistema imune do hospedeiro, mas que poderiam ser utilizados como imunógenos, já que, por características peculiares da interação parasita-hospedeiro, poderiam ser atingidos pelos fatores sanguíneos (WILLADSEN *et al.*, 1989). A Bm86 foi expressa, então, em *Escherichia coli* (RAND *et al.*, 1989), baculovirus (TURNBULL *et al.*, 1990; TELLAM, *et al.*, 1992) e *Pichia pastoris* (RODRIGUEZ *et al.*, 1994) levando ao surgimento das vacinas recombinantes rBm86, as quais produziram danos aos carrapatos provenientes de animais imunizados.

Levando-se em consideração as vantagens acerca dos peptídeos sintéticos (NEURATH e KENT, 1986), foram desenhadas três seqüências peptídicas definidas como possíveis determinantes antigênicos da a proteína nativa Bm86, a partir de sua seqüência aminoacídica e de análises computacionais. Tais frações foram denominadas 4822, 4823 e 4824, as quais foram hibridizadas de diferentes formas obtendo-se os peptídeos sintéticos SBm4912, SBm7462 e SBm19733, de acordo com a seqüência definida no Livro de Controle do Instituto de Inmunología do Hospital San Juan de Dios, na cidade de Santa Fé de Bogotá, Colômbia, onde foram sintetizados. Tais peptídeos foram testados por OLIVEIRA (1998) e PORTELA (2000) em condições de confinamento obtendo-se uma maior eficiência para o SBm7462.

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar diferentes doses do peptídeo sintético SBm7462 como imunógeno para o controle do carrapato *Boophilus microplus* em animais estabulados e a campo.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliação da resposta imune contra o peptídeo sintético SBm7462 em bovinos sob condições naturais de manejo a campo;
- Estudo da cinética de anticorpos induzidos contra o peptídeo sintético SBm7462;
- Análise da eficácia da resposta imune anti-peptídeo sintético SBm7462 em bovinos inoculados para o controle do *B. microplus*, tendo como parâmetros a redução do número de teleóginas, redução do peso dos ovos e redução da fertilidade dos ovos;
- Análise da sobrevivência nas pastagens de larvas de *B. microplus* provenientes de animais inoculados com SBm7462.

### 3 – REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. O carrapato *Boophilus microplus*

A palavra *Boophilus* é de origem grega e significa *Boo* (boi) e *philus* (amigo), ou seja, amigo do boi. O carrapato comum dos bovinos, *Boophilus microplus*, tem sua origem no continente asiático infestando antílopes, cervídeos e búfalos, de onde se disseminou para todos os países de clima tropical e subtropical do mundo pelo tráfego de animais (HOOGSTRAL, 1985). Está distribuído em praticamente todos os países compreendidos entre os paralelos 32° de latitude norte e 35° de latitude sul, sendo o principal ectoparasita na pecuária desses países (NUÑEZ, *et al.*, 1982). Mais recentemente, ESTRADA-PEÑA (1999) demonstrou a distribuição deste carrapato na América do Sul, por predição espacial, estando amplamente distribuído no norte da Argentina, Paraguai, Uruguai, leste da Bolívia, Colômbia e Venezuela, além do Brasil, com especial atenção às regiões Sudeste e Centro-oeste e toda a costa brasileira, obviamente pelas boas condições de umidade e temperatura e pela exploração pecuária mais intensa.

Difícilmente poderá ser encontrado um ectoparasita mais prejudicial à economia pecuária do que o *B. microplus*. Afirma-se que mais de 75% da população bovina mundial é atingida pelo parasitismo deste carrapato

(CORDOVÉS, 1997). No Brasil, dados do Ministério da Agricultura de 1983 relatam que o *B. microplus* está presente em 96% dos municípios informantes (73,37% dos municípios brasileiros), sendo que em 80% deles é muito freqüente (VERÍSSIMO, 1993).

Taxonomicamente, pode-se classificá-lo da seguinte forma, segundo NUÑEZ *et al.* (1982):

Filo Arthropoda;

Classe Arachnida;

Ordem Acari;

Família Ixodidae;

Gênero *Boophilus*;

Espécie: *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887).

Apesar do gado bovino se constituir no principal hospedeiro para *B. microplus*, outros animais domésticos ou não, podem se comportar como hospedeiros, dentre os quais, búfalos, jumentos, burros, ovinos, caprinos, cães, gatos, porcos, veados, onças, preguiças e cangurus (ARTHUR, 1960; RIEK, 1959 e ROCHA *et al.*, 1969) e até o homem, sendo que nele dificilmente haveria continuidade do ciclo evolutivo (GREEN, 1971).

Este carrapato é conhecido como “de um só hospedeiro” e seu ciclo evolutivo pode ser estudado em dois tempos ou fases: parasitária e não parasitária. A primeira compreende desde o início da fixação das larvas em hospedeiro susceptível até o término da mesma, quando os adultos, incluídas as fêmeas fecundadas e ingurgitadas, caem desse hospedeiro. Já a fase não parasitária começa com a fêmea fecundada e ingurgitada, depois que ela se desprende do hospedeiro, caindo no chão para realizar a ovoposição e termina quando: a) as larvas oriundas de ovos ganham acesso ao hospedeiro susceptível ou b) quando a fêmea morre sem efetuar a ovoposição ou produz ovos inférteis ou, ainda, quando suas larvas morrem sem alcançar um hospedeiro adequado (PEREIRA, 1982).

### 3.2. A importância do *Boophilus microplus*

O *B. microplus* é o ectoparasita mais importante para a pecuária bovina atual. Os prejuízos vêm desde a perda de peso, baixa conversão alimentar, perdas na qualidade do couro, como consequência de lesões da pele. Também favorece a presença de míases, anemia e transmissão de agentes patogênicos que provocam graves enfermidades, podendo levar à morte dos animais.

Tais prejuízos podem ser classificados como: diretos e indiretos. O danos diretos são causados pela hematofagia intensa, realizada principalmente pelas fêmeas, podendo chegar a uma quantidade de 0,6 a 3ml por teleógina (ARTHUR, 1960) levando a perdas na produção, sendo proporcional a intensidade e frequência das infestações (CORDOVÉS, 1997). FURLONG *et al.* (1996) constataram um pequeno declínio na produção de leite em infestações crescentes sucessivas. Na Austrália, JONSSON *et al.* (1998) estimaram que cada teleógina seria responsável pela queda de produção diária de 8,9ml de leite e de 1,0g de peso corporal. Nos locais parasitados pelos carrapatos são produzidas cicatrizes, edemas e processos infecciosos os quais danificam o couro, depreciando-o. Também deve ser considerada a inoculação de componentes bioativos, os quais podem levar à reação de hipersensibilidade (SAUER *et al.*, 1995).

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 participação também na epidemiologia de *Anaplasma marginale* (PATARROYO, 1994) e até a transmissão de *Theileria equi* (GUIMARÃES *et al.*, 1998).

Obviamente, as perdas são consideráveis quando se têm altas infestações. CORDOVÉS *et al.* (1986) consideram esse conceito muito variável e que necessita ser determinado casuisticamente. Em Cuba, as infestações mais frequentes são mais baixas que aquelas consideradas altas ou mesmo médias em países com baixos índices de infestação; embora, se levar em conta conceitos como a instabilidade enzoótica à babesiose, a situação torna-se agravante. Na Austrália, um número acima de 20 carrapatos com tamanho superior a 4,5mm é

considerado um limite econômico para se determinar tratamento de carrapatos (CORDOVÉS, *et al.*, 1986). No Brasil não se tem um limite econômico para a infestação por carrapatos.

No México, calculou-se em 30kg de carne por animal/ano, as perdas por *B. microplus* (WOODMAM *et al.*, 1983); enquanto que na Austrália estima-se a perda econômica entre U\$S 4 a 5 por bovino (WHARTON, *et al.*, 1980). No Brasil, HORN e ARTECHE (1985) estimaram em 800 milhões de dólares os prejuízos diretos e indiretos, já o Ministério da Agricultura, em trabalho realizado no biênio de 1983/1984, eleva esse valor à cifra de um bilhão de dólares anuais, sendo que 40% desse montante é relativo à perdas na produção leiteira. Os maiores prejuízos foram determinados nas regiões Sudeste (37%), Sul (24%) e centro-oeste (18%) (BRASÍLIA, 1985, citado por VERÍSSIMO, 1993).

### **3.3. Interação entre o meio ambiente e o ciclo do *Boophilus microplus***

As condições ambientais exercem um papel determinante nas condições de distribuição do *B. microplus* em uma determinada região.

A fase parasitária é pouco afetada pelas condições climáticas ambientais (RIEK, 1965). Devido a isso, serão as condições oferecidas pelo próprio hospedeiro que passam a ocupar um papel preponderante no desenvolvimento dos carrapatos. Estes parasitas vão selecionar alguns locais no hospedeiro para se implantarem, na dependência de alguns fatores que são a qualidade específica do pêlo (espécie do hospedeiro, resistência aos carrapatos, espessura, capilarização, etc.), qualidade topográfica da pele (temperatura, possibilidade de ser alcançado pelo processo de auto-asseio e proteção contra predadores) e também da concorrência com outras espécies de carrapatos. O *B. microplus* prefere as regiões do úbere, bolsa escrotal, entrepernas e a barbela, embora possa também parasitar o pavilhão auricular (CORDOVÉS, 1997). Segundo NUÑEZ *et al.* (1982), o tempo médio para uma larva se desprender como teleógina, depois que se fixou no hospedeiro susceptível, é de 23 dias; no Brasil, FURLONG (1998) cita a fase parasitária com uma duração de 18 a 22 dias.

Por outro lado, a fase não parasitária sofre enorme influência das condições ambientais (FURLONG, 1998). O período de pré-postura, influenciado pela baixa temperatura (e não pela umidade), pode ser atrasado alguns dias como mencionado por LONDT (1974). Os trabalhos de ALVARADO e GONZALES (1979) verificaram que 91% da ovoposição de *B. microplus* ocorreu até o 10º dia de postura. Em estudo semelhante, DE LA VEGA (1976) observou que 99,9% dos ovos desta espécie foram eliminados até o 13º dia de postura, sendo que a duração deste período é dependente da fêmea estar ou não fertilizada, havendo correlação positiva entre o peso da fêmea e o número de ovos produzidos, bem como de esta fêmea ter ingerido um volume crítico de sangue para a postura se iniciar.

A incubação dos ovos é o período evolutivo mais susceptível à dessecação, característica que pode exercer papel limitante na distribuição geográfica das espécies. Ovos de *B. microplus* mantidos em temperaturas entre 21,1°C e 36,6°C, submetidos a umidades relativas próximas à saturação apresentam pico de eclosão no segundo dia após o início da mesma, enquanto que ovos da mesma espécie quando submetidos a umidades relativas inferiores a 70%, não eclodem. Isto porque os ovos, ao contrário das larvas ou dos adultos, não absorvem água, mesmo quando em umidades relativas de 95% e que esta umidade relativa crítica está em função da qualidade da camada de cera que envolve os ovos – uma característica endógena da espécie (HITCHCOCK, 1955a, LONDT, 1975). Também CORDOVÉS (1997) lembra que os ovos são mais susceptíveis à desidratação que as larvas e que, em condições ótimas, a fertilidade dos ovos é muito grande (mais de 85%).

As larvas são mais vulneráveis que os ovos às baixas temperaturas e a duração da fase larval é influenciada pelas condições de temperatura e umidade relativa às quais o embrião é submetido (HITCHCOCK, 1955a). O mesmo autor relata que as larvas de *B. microplus* em condições ótimas em laboratório podem sobreviver até 8 meses.

O aumento do número de carrapatos durante a estação chuvosa pode ser determinado pelo aumento da umidade relativa, crescimento rápido das pastagens, proporcionando abrigo adequado e elevação da temperatura, o que

levaria a aumentos sazonais da população de carrapatos no decorrer do ano – fenômeno chamado “spring rise” (SNOWBALL, 1957), o que não se observa na maior parte do Brasil; um exemplo é que na região Sudeste pode ocorrer cerca de três a quatro gerações de carrapatos no decorrer de um ano, com uma única fêmea podendo originar cerca de 3.000 novas larvas, sendo a população distribuída da seguinte forma: 95% na pastagem e 5% parasitando os animais (FURLONG, 1998). Já na região Sul do Brasil, o “spring rise” é observado e o número de gerações de carrapatos durante o verão é de 2 a 3, com início na primavera (CORDOVÉS, 1997).

### 3.4. Relação parasita-hospedeiro

A resistência do hospedeiro ao carrapato tem sido entendida na Austrália como a proporção de carrapatos que não conseguem alcançar a idade adulta (WHARTON *et al.*, 1971). Em infestações com 20.000 larvas, considerando igual o número de machos e fêmeas, um bovino que apresentasse 1.000 carrapatos adultos teria uma resistência de  $100[(10.000 - 1.000)/10.000] = 90\%$  (UTECH *et al.*, 1978). Sendo assim, a resistência dos bovinos ao *B. microplus*, segundo UTECH (1979), pode ser classificada em:

- Muito resistente: >98%;
- Moderadamente resistente: 95 – 98%;
- Pouco resistente: 90 – 95%;
- Muito pouco resistente: < 90%.

UTECH *et al.* (1978), trabalhando com novilhas de diferentes raças na Austrália, citam que animais da raça Brahman apresentam 99% de resistência ao *B. microplus*, Hereford 85,6%, Jersey 97,7% e Holandesa 85,3%.

Geralmente, o *Bos indicus* é mais resistente aos carrapatos que o *Bos taurus*. O Zebu convive há milhares de anos com os carrapatos, o que facilitou provavelmente uma seleção natural e o gado europeu é mais sensível pelo pouco tempo de contato com os carrapatos. Entretanto, existem raças com diferentes graus de resistência, mesmo dentro das européias ou zebuínas (LEMOS, 1986). Igualmente, há relatos sobre casos de variação individual dentro de uma mesma

raça e/ou rebanho, os quais estariam relacionados à característica polimórfica dos genes que codificam o Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC), primordiais na apresentação de antígenos e na comunicação entre células do sistema imune (STEAR *et al.*, 1989; HUGHES e YAGER, 1998).

Pesquisas desenvolvidas na Austrália revelaram que os animais mais susceptíveis de um rebanho carregam cerca de 50% do total de carrapatos de uma propriedade (POWELL e REID, 1982). FURLONG (1998) cita que em qualquer rebanho tratado com determinado carrapaticida existem alguns animais que sempre se infestam mais que outros e que representam aproximadamente 15 a 20% do rebanho.

As citações acima concordam com os relatos de WHARTON e NORRIS (1980) de que em uma mesma raça podem ser encontrados animais com diferentes graus de resistência. Estes autores encontraram em rebanhos de corte da raça Brahman 80% de seus indivíduos muito resistentes ao *Boophilus microplus* e menos de 20% com resistência moderada. Para animais meio sangue Brahman-europeu, 50% do rebanho apresentou resistência alta, 40% moderada e 10% baixa ou muito baixa. Já para bovinos de leite, a raça Jersey apresentou 70% de seus indivíduos muito resistentes e a raça holandesa menos de 5%, sendo que para esta última, mais de 60% dos indivíduos apresentou resistência muito baixa.

RIEK (1962) relata que a resistência dos bovinos pode ser descrita de duas formas: resistência inata e adquirida, sendo a primeira aquela que não depende do contato prévio do bovino com o *B. microplus*, mas de fatores inatos como o comprimento dos pêlos (pêlos curtos favorecem a resistência), espessura e dureza da pele e hábitos do animal. Por outro lado, a resistência adquirida começa a se evidenciar depois que o animal foi exposto a algumas infestações por carrapatos. A resistência naturalmente adquirida tende a ser mais efetiva contra larvas de ixodídeos do que contra ninfas e adultos, ao contrário da imunidade adquirida induzida pelos *antígenos escondidos* (ALLEN, 1994).

Especulações são feitas tentando relacionar alguns fatores como possíveis anticorpos específicos contra glândulas salivares (WILLADSEN *et al.*, 1978), reações celulares (WILLADSEN, 1980) e reações de hipersensibilidade (LEMOS, 1986) ao fenômeno de imunidade adquirida, embora as citações

presentes não se referem, especificamente, a carrapatos monoxênicos, como o *B. microplus*. BROSSARD e WIKEL, em 1989, citaram que o desenvolvimento de resistência a carrapatos, após diversas infestações sucessivas, é um fenômeno tipicamente imunológico, no qual estariam envolvidas todas as células e fatores intermediários do sistema imune; FIVAZ e NORVAL (1990) e USHIO *et al.* (1993) constaram uma elevação dos níveis de IgM, IgG e IgE, num quadro típico de Reação de Hipersensibilidade Tipo I. Porém, SONENSHINE (1991a) diz estar envolvida uma Reação de Hipersensibilidade do Tipo I ou do Tipo II.

Cabe lembrar que, até hoje, ainda não se provou definitivamente que a hipersensibilidade tenha um papel importante na proteção contra o carrapato, sendo que as evidências clínicas sugerem que hipersensibilidade e resistência podem não se correlacionar (BARRIGA, 1994).

Com relação ao parasita, deve-se levar em consideração que, ao se fixar no hospedeiro, ele secreta uma ampla gama de substâncias, produzidas em suas glândulas salivares, as quais têm como função, não somente a fixação, mas também facilitar e promover a ingestão de alimento através da vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e da coagulação sanguínea, retardo no processo de reparação da lesão e modulação da resposta inflamatória do hospedeiro (KAUFMAN, 1989; WIKEL, 1996). Pode-se citar, ainda, o decréscimo da porcentagem de linfócitos periféricos no sangue por possíveis inoculações de substâncias imunodepressoras podendo, tal fato, ter um papel importante na transmissão de doenças por hemoparasitas (INOKUMA, *et al.*, 1993). Os mesmos autores relatam que espécies diferentes de carrapatos possuem atividades diferentes de suas toxinas quanto à intensidade de ação imunossupressora ou de provocar hipersensibilidade e que a atividade inibidora da resposta imune está mais relacionada com os níveis de prostaglandina  $E_2$ .

As principais atividades inibidas pela saliva do carrapato foram descritas como sendo o aumento da produção de citocinas típicas de respostas Th2 e diminuição daquelas relacionadas com Th1 (BROSSARD e WIKEL, 1989).

### 3.5. Métodos de controle

#### 3.5.1. Controle químico

É de 1895 o primeiro relato do uso de compostos arsenicais na Austrália (NEWTON, 1967), sendo que seu uso intensivo se deu no início do século XX. 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 tinham relatos de resistência dezoito meses após a sua implantação (GRILLO, 1976), razão pela qual nos anos 60 foram impostas restrições ao seu uso. Paralelamente ao uso dos organoclorados, novas moléculas estavam sendo pesquisadas, surgindo, então, os organofosforados (derivados do ácido fosfórico) em meados dos anos 40. Dentre eles o Diazinon, Dioxathion, Coumaphos e Ethion, os quais levaram a grandes conquistas na luta contra insetos e artrópodes, embora não tardou o aparecimento da resistência (WHARTON, 1974).

Na década de 70, surgiram novas linhas terapêuticas e outros compostos chegaram ao mercado, como as formamidinas, as ciclomidinas e os piretróides. Estes mostraram um período ainda mais curto de eficiência (LODOS *et al.*, 1999). Na década de 90, novas moléculas começaram a ser empregadas, como o fipronil e os inibidores de écdise, para os quais estudos de resistência estão sendo desenvolvidos (DAVEY *et al.*, 1998).

Atualmente, outras drogas estão sendo testadas, como o “spinosad”, 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).

Entende-se por resistência de carrapatos a carrapaticidas o processo de seleção genética em que alguns carrapatos de uma população sobrevivem após exposição continuada a uma família ou grupo químico carrapaticida – letais para a maioria dos indivíduos normais da espécie - chegando a um ponto em que toda

a população é resistente (FURLONG, 1998). PATARROYO e VARGAS (1982) consideram como axiomático o fato de que, uma vez tenha aparecido resistência comprovada a um acaricida de determinado grupo químico, ela é irreversível e que o emprego de uma mesma base química após determinado tempo não terá qualquer proveito para o controle do carrapato, porém existem dúvidas quanto a resistência contra as amidinas. RIDLES e NOLAN (1986) afirmam que pode ocorrer resistência cruzada a alguns produtos de grupos químicos diferentes, como o caso dos clorados com os piretróides.

São muitos os relatos de populações resistentes a carrapaticidas no Brasil, como demonstrado no Sul de Minas Gerais (PATARROYO e COSTA, 1980), em Garanhuns, Pernambuco (FAUSTINO e OLIVEIRA, 1996) e, mais recentemente, na região de Ilhéus, Bahia (CAMPOS JÚNIOR, 2001).

### **3.5.2. Controle alternativo**

Vários são os métodos alternativos estudados para o controle do *B. microplus*, apesar disso, ainda não há um bom candidato a imunógeno para um controle efetivo.

O emprego de predadores naturais do *B. microplus* é citado por ROCHA (1984) e BRANCO e PINHEIRO (1987) ou, ainda, o uso de fungos ou bactérias (LIPA, 1971; BITTENCOURT, 1992). Tentativas de se conseguir machos híbridos estéreis através do cruzamento do *B. microplus* com *B. annulatus* é uma outra alternativa (OSBURN e KNIPLING, 1982), embora HILBURN e DAVEY (1992), testando cruzamentos entre *B. microplus* e *B. annulatus*, observaram que a tendência de cruzamentos intraespecíficos era superior aos de cruzamentos interespecíficos. O uso de pastagens que dificultariam a subida das larvas como o capim gordura (*Melinis minutiflora*) (THOMPSON, *et al.*, 1978) ou a própria rotação de pastagens (SUTHERST, *et al.*, 1982) são, também, alternativas. Igualmente, a seleção de raças de bovinos que hereditariamente têm uma menor predisposição ao desenvolvimento dos carrapatos, é um método de controle utilizado em alguns países como a Austrália (LEMOS, 1986).

Apesar das numerosas tentativas, o controle químico ainda é o mais utilizado e o surgimento de resistência é constante. Sendo assim, faz-se necessário a busca de novas alternativas que possam minimizar as perdas causadas por este parasita, com uma interação entre o manejo, a seleção genética e o desenvolvimento de vacinas (LABERTHE, 1994).

### **3.5.3. Controle imunológico**

As vacinas em medicina veterinária têm, classicamente, enorme importância para a produção, para animais de companhia e em saúde pública, controlando doenças como febre aftosa em bovinos, parvovirose em cães, rinotraqueíte em gatos, pseudorraiva em suínos e a raiva em praticamente todas as espécies domésticas (MARTINOD, 1999). Mais recentemente, novos candidatos a vacinas têm surgido para o controle de coccidiose aviária, toxoplasmose em ovelhas, vermes gastrointestinais e carrapatos em bovinos (DALTON e MULCAHY, 2001).

#### **3.5.3.1. Vacinas contra parasitas em Medicina Veterinária**

Nos últimos 15 anos, aumentaram as pesquisas sobre o isolamento e caracterização de proteínas que atuam como imunógenos, técnicas imunológicas e métodos de clonagem de genes para o desenvolvimento de vacinas (DALTON e MULCAHY, 2001). Tais pesquisas buscam, principalmente, proteínas conservadas durante os diversos estágios 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) e justificam o pequeno número de vacinas registradas na área de parasitologia, sendo que a maioria dos imunógenos é proveniente de parasitas atenuados.

Vacinas atenuadas incluem larvas irradiadas contra *Dictyocaulus viviparus* (PEACOCK e POYNTER, 1980) e *Dyctiocaulus filaria* (SHARMA et

al., 1988), *Toxoplasma gondii* atenuado (BUXTON, 1993), coccídios atenuados (ROSE e SLIFKO, 1999; WILLIAMS, 1993), imunógenos baseados em babesias atenuadas (PURNELL, 1980), contra teilerioses, como *Theileria annulata* (HASHIM-FESHARKI, 1988) e *Theileria parva* (DOLAN, 1987), utilizando esquizontes atenuados. A desvantagem destas vacinas é que a maioria delas pode apresentar problemas de uniformidade e preparação, assim como reversão de virulência e indução de danos imunopatológicos.

A busca por imunógenos mais puros levou a pesquisas como a de ALGER e CABRERA (1972) que constataram maior taxa de mortalidade de mosquitos *Anopheles stephensi* alimentados em coelhos vacinados com um extrato de intestino deste mosquito, à diferença daqueles que tinham se alimentado em coelhos não vacinados. Ainda, SCHLEIN e LEWIS (1976), usando músculos torácicos de *Stomoxys calcitrans* para vacinar coelhos, observaram que os parasitas que se alimentavam nesses animais apresentaram alta taxa de mortalidade e diminuição do crescimento. Embora com resultados não significativos, extratos intestinais de outros artrópodes também têm sido utilizados como *Aedes aegypti* (SUTHERLAND e EWEN, 1974), *Ctenocephalides felis felis* (OPDEBEECK e SLACEK, 1993) e *Rhipicephalus sanguineus* (SZABÓ e BECHARA, 1997).

Mais recentemente, começaram a ser utilizados imunógenos recombinantes expressos em *Escherichia coli*, dentre eles: o EG95 de *Echinococcus granulosus* e os 45W, To18 e To16 de *Taenia ovis*, com graus de proteção variados podendo chegar entre 96-100% para o EG95 em experimentos com bovinos na Nova Zelândia, Austrália, Argentina e Chile (DALTON e MULCAHY, 2001) e em torno de 90% para as proteínas isoladas de *T. ovis*, já disponível comercialmente (JOHNSON *et al.*, 1989; LIGHTOWLERS *et al.*, 2000).

Outros imunógenos desenvolvidos são aqueles contra *Haemonchus contortus*, de baixo peso molecular, conhecidos como H11 e H-gal-GP, enzimas exclusivamente expressas nas microvilosidades deste nematódeo e que devem estar envolvidas com o processo de digestão; tais imunógenos atuam biologicamente sobre a viabilidade do parasita e sua ovopostura, chegando a um

grau de proteção entre 72-93% (NEWTON e MUNN, 1999; SMITH, 1999). O maior progresso alcançado foi, entretanto, na área humana, através de uma vacina sintética contra malária, conhecida como SPf66, a partir de uma combinação de três peptídeos sintéticos contra o estágio sexual do *Plasmodium falciparum*, com índices de proteção que variam de acordo com a área onde foi analisada (PATARROYO, *et al.*, 1987; JONES e HOFFMAN, 1994; BILLINGSLEY, P. F., 1994; D'ALESSANDRO *et al.*, 1995).

### 3.5.3.2. Vacinas contra carrapatos

Do ponto de vista imunológico, o primeiro relato de imunidade do hospedeiro a carrapatos foi feito em 1911 por NUTTAL, referindo-se ao fenômeno de imunidade natural em humanos. Posteriormente, TRAGER (1939) observou que em infestações repetidas de *Dermacentor variabilis* em cobaias e coelhos, havia um aumento de resistência, sólida o suficiente para reduzir o número de adultos, diminuir o peso ao desprendimento e diminuir o número de ovos e larvas viáveis e que a imunidade não era estritamente local ou de hipersensibilidade.

BROSSARD (1976) observou que a injeção em bovinos de tecidos de glândulas salivares de carrapatos era capaz de produzir alguma resistência. Em 1979, ALLEN e HUMPHREY imunizaram bovinos com extratos intestinal e genital de *Dermacentor andersoni* e observaram que os carrapatos que se desenvolviam nos animais vacinados tinham sua fertilidade diminuída.

Os maiores êxitos na ativação do sistema imune para o controle de carrapatos vieram com ACKERMAN *et al.* (1980), quando utilizaram extratos totais de *Dermacentor viriabilis* e extrato de intestino para imunizar cobaias, constatando que o segundo mostrou-se mais eficiente em retardar o desprendimento, diminuir a ovoposição e a fertilidade dos ovos. Esse trabalho, complementado pela classificação dada por GALUN (1975), veio definir o conceito de *antígenos escondidos*, os quais ficam normalmente fora do alcance do sistema imune do hospedeiro, porém ao entrarem em contato com ele, induziriam a uma resposta imune protetora contra o parasita; conceito,

posteriormente, aprimorado por WILLADSEN *et al.* (1989). O uso desses imunógenos não está relacionado com uma resposta de hipersensibilidade ou uma amplificação desta, como ocorre na resposta imune naturalmente adquirida, mas sim em uma resposta imune induzida contra um antígeno alvo não exposto na interrelação parasita hospedeiro natural.

JOHNSTON *et al.* (1986) observaram um maior grau de imunidade em animais inoculados com extratos brutos de *Boophilus microplus*, quando comparado com animais não inoculados. OPDEBEECK *et al.* (1988), imunizando bezerros da raça Hereford com extratos intestinais do carrapato observaram uma redução de 87% na carga parasitária em relação ao controle e confirmaram, pelas lesões histopatológicas observadas, que a imunidade era induzida essencialmente por antígenos localizados no intestino médio do *B. microplus*.

Em 1989, WILLADSEN *et al.* isolaram e purificaram uma proteína que mimetizava as alterações biológicas no *B. microplus* induzidas pelas inoculações com extratos brutos de carrapato em bovinos. Essa glicoproteína foi denominada Bm86, com um peso estimado de 89kDa e ponto isoelétrico de 5,5. Posteriormente, determinou-se a seqüência aminoacídica dessa proteína, constatando-se que era composta por 650 aminoácidos e que se encontrava em pequena quantidade no intestino do carrapato adulto.

Para localizar a Bm86 no intestino do carrapato utilizaram-se técnicas de imunofluorescência indireta, imunohistoquímica e painéis de monoclonais, sendo encontrada nas microvilosidades das células epiteliais do intestino (GOUGH e KEMP, 1993), altamente concentrada próximo à membrana basal (LEE e OPDEBEECK, 1994) e presente em larvas, ninfas e adultos (WILLADSEN, 1997). Entretanto, não se conhece totalmente qual a função específica da proteína, tendo-se especulado sua participação no processo de endocitose de metabólitos digestivos, uma vez que esta função encontra-se alterada nos carrapatos alimentados em animais vacinados (WILLADSEN, 1997), interferindo na ovoposição e na viabilidade das larvas provenientes dos ovos afetados, as quais mostram diminuição na sobrevivência (MORA HERNÁNDEZ, *et al.*, 1999).

Para uma maior comodidade e facilidade na purificação para a obtenção do antígeno, já que eram necessárias de 40.000 a 60.000 teleóginas para produzir 20 a 100µg de Bm86 (RAND, *et al.*, 1989), realizaram-se estudos genéticos que propiciassem a produção em massa da proteína através da clonagem e expressão do gene que codifica a Bm86 em *Escherichia coli* (RAND, *et al.*, 1989), em *Aspergillus nidulans* e em *Baculovirus* (TURNBULL *et al.*, 1990; TELLAM *et al.*, 1992). Notam-se pequenas diferenças estruturais na proteína recombinante, mas não existem diferenças na sua eficácia como imunógeno (COBON e WILLADSEN, 1990).

A partir desses estudos, entrou no mercado a primeira vacina comercial contra carrapato em 1994 com o uso de técnicas de engenharia genética em *E. coli*, denominada TickGARD<sup>®</sup>, na qual a proteína recombinante Bm86 foi adicionada de adjuvante oleoso (SMITH *et al.*, 1995). No mesmo ano, lançou-se a segunda vacina comercial, chamada de Gavac<sup>TM</sup>, sendo a Bm86 expressa em *Pichia pastoris* (RODRIGUEZ *et al.*, 1994). A terceira vacina veio em 1996, a TickGARD PLUS<sup>®</sup>, na qual além da Bm86 foi adicionada a Bm95 e de um novo adjuvante, chamado Vaximax, o qual induziria a produção de títulos mais altos de anticorpos específicos. Esta vacina foi testada com sucesso em várias raças de bovinos na Austrália (WILLADSEN, 1997).

A ação desses imunógenos é reduzir o número de carrapatos, a ovoposição, o peso das teleóginas e a fertilidade dos ovos (WILLADSEN, 1987; MASSARD *et al.*, 1995; OLIVEIRA, 1998; PORTELA, 2000).

Segundo MORA HERNÁNDEZ, *et al.* (1999), baseando-se em BALACHOV *et al.*, (1972), a explicação da eficácia das vacinas está no fato de que a interação antígeno nativo-anticorpo interfere na produção de hemixodovina, precursora da vitelogenina. Os mesmos autores consideram que aproximadamente 5-10% da partícula heme ingerida é usada para o desenvolvimento dos oócitos. Logo depois da quebra da hemoglobina, algumas partes de ferro e heme passam à hemolinfa, ligando-se a proteínas específicas do carrapato; este novo tipo de composto, heme-proteína é chamado de hemixodovina, cuja função é de reserva protéica durante a embriogênese, e de reserva energética nas larvas em jejum. TELLAM *et al.*, (1992) observaram, em

estádios imaturos, um aumento de 12 horas no tempo de ecdise de larvas para ninfas de *B. microplus* provenientes de animais vacinados e que entre os vários estágios, as fêmeas adultas são as mais afetadas pelos anticorpos específicos, já que ingerem uma maior quantidade de sangue.

No Brasil, os primeiros testes conduzidos com a Gavac<sup>TM</sup> foram realizados por MASSARD *et al.*, em 1995, os quais obtiveram cerca de 40% de redução no número de teleóginas e 51% de eficácia total, em animais estabilados. Em experimento a campo, realizado com gado holandês e mestiço, RODRIGUEZ *et al.* (1995) observaram redução significativa do número de teleóginas sobre os hospedeiros, durante 36 semanas de desafio natural. LABRUNA *et al.* (1999) observaram, em Carlos Chagas, estado de Minas Gerais, que a vacina isoladamente foi eficaz em controlar a população de carrapatos somente durante o período mais seco do ano. No sul do Brasil, HUNGERFORD *et al.* (1995) associaram o uso da TickGARD® com tratamentos carrapaticidas, obtendo resultados satisfatórios.

Programas de vacinação com os *antígenos escondidos* possibilitam diminuir o tratamento com acaricidas, aumentando o intervalo entre os banhos e levando a um controle da população do parasita no decorrer das gerações subsequentes nas pastagens (MORA HERNÁNDEZ, 1996).

Quanto a outros imunógenos testados, acredita-se que a Bm95 seja o antígeno intestinal mais prevalente nas diversas cepas de carrapatos distribuídos pelo mundo, de forma que seria o maior contribuinte para a eficácia da Bm86 em populações de carrapatos onde as vacinações anteriores foram ineficazes, permitindo ainda mais um controle imunológico do *B. microplus* (DE LA FUENTE, *et al.*, 2000; GARCIA-GARCIA, *et al.*, 2000). Em trabalhos feitos com a “amostra A” de carrapatos argentinos resistentes à vacinação com Bm86, GARCIA-GARCIA, *et al.*(2000) relatam que vacinações baseadas na Bm95 foram eficazes na proteção contra infestações de cepas resistentes e sensíveis à Bm86, com redução do número de tratamentos acaricidas.

Em 1996, WILLADSEN *et al.* caracterizaram e isolaram uma outra proteína do *B. microplus*, denominada Bm91, presente no intestino e nas glândulas salivares do carrapato. Este antígeno foi também clonado e expressado

em *E. coli*, e atuaria potencializando o efeito da Bm86, já que sozinho não se mostrou um bom imunógeno. MCKENNA *et al.* (1998) também isolaram de fêmeas ingurgitadas uma glicoproteína de membrana, denominada BMA7. Essa proteína atuou biologicamente de forma semelhante à Bm91.

Outras alternativas estudadas são as catepsinas, enzimas com capacidade de atuar sobre substratos como a hemoglobina e vitelina e que apresentam potencial imunogênico (RENARD, *et al.*, 2000) e as BYC (*Boophilus* Yolk pro-Cathepsin), provenientes de ovos de *B. microplus* e com citação de proteção parcial (DA SILVA VAZ, *et al.*, 1998).

Tanto a TickGARD® (DE VOS, *et al.*, 2001), quanto a Gavac™ (DE LA FUENTE *et al.*, 2000) demonstraram ação biológica sobre outras espécies de carrapatos. A TickGARD® atuou sobre *Boophilus decoloratus* (70% de redução da performance reprodutiva), *Hyalomma anatolicum anatolicum* (50% de redução do peso das teleóginas) e *Hyalomma dromedarii*, com 95% de redução do número de carrapatos e 55% da redução de seu peso; por outro lado, testes feitos com *Rhipicephalus appendiculatus* e com *Amblyomma variegatum*, não deram evidências de qualquer ação biológica desta vacina. Para a Gavac™, cita-se eficácia no controle de *B. annulatus* e *B. decoloratus*, sensíveis ou resistentes a acaricidas, em várias regiões do mundo, como Austrália, África, América e Irã; para *Hyalomma spp.* e *Rhipicephalus spp.* há indicações de proteção parcial.

Diferentes graus de susceptibilidade na vacinação com a Bm86 têm sido demonstrados (COBON, *et al.*, 1995; DE LA FUENTE, *et al.*, 2000), bem como pequenas variações da proteína nativa entre diferentes cepas (DE LA FUENTE, *et al.*, 2000). Sendo assim, novas estratégias estão sendo desenvolvidas na busca de vacinas multivalentes anti-carrapato (DE VOS, *et al.*, 2001). MORA HERNÁNDEZ (1996), testando a campo a Gavac™ em animais mestiços no Brasil, relata que entre os animais da raça holandesa havia animais que não respondiam à vacinação, apresentando cargas consideráveis de carrapatos, especialmente vacas idosas, debilitadas e no puerpério. Além disto, cita que o grau de infestação entre os animais testados variava consideravelmente de 6 a 260 fêmeas de carrapatos, sendo evidentes as maiores infestações em animais com maior grau de sangue europeu.

Até o momento não se evidenciou resistência induzida por pressão de seleção de carrapatos submetidos ao controle imunológico com Bm86, mas WANG e NUTTALL (1999) sugerem que isto é possível e enfatizam que a proteção depende da produção de anticorpos específicos que são induzidos, mas que as moléculas de imunoglobulinas passam por entre as células intestinais dos carrapatos e caem na hemolinfa, ligando-se às “proteínas ligantes de anticorpos” (IGBP) fazendo com que a atividade dos anticorpos seja diminuída ou perdida. Acrescentam ainda, que pesquisas em *Rhipicephalus appendiculatus* revelaram que imunoglobulinas G do hospedeiro foram excretadas via salivação durante o repasto sanguíneo, ou seja, os ixodídeos teriam intrinsecamente um mecanismo de evasão contra a resposta imune humoral do hospedeiro. Entretanto, segundo BOUE, *et al.* (1999), imunógenos com base na Bm86 são considerados seguros.

### 3.6. Peptídeos sintéticos

Os trabalhos de MERRIFIELD, em 1963, vieram a simplificar a obtenção de determinadas frações de proteínas com a síntese de peptídeos em fase sólida. A separação molecular de antígenos protéicos tem sido pesquisada não somente para melhorar o conhecimento em relação a epítomos determinados, mas também torna possível a modulação do sistema imunológico abrindo horizontes para aplicações altamente úteis em biologia molecular, bioquímica e microbiologia (VAN REGENMORTEL *et al.*, 1990).

O uso de peptídeos sintéticos tem se mostrado uma ferramenta promissora na produção de vacinas. Nas últimas décadas, observa-se um aumento de pesquisas em torno da utilização desses antígenos para o combate de vírus, bactérias e parasitas (AUDIBERT *et al.*, 1982; ROWLANDS, 1984; NUSSENZWEIG & NUSSENZWEIG, 1986; KLIPSTEIN *et al.*, 1986; PATARROYO *et al.*, 1988; SCHMIDT, 1990; BERZOFISKY, 1991; REYNOLDS *et al.*, 1994; ROBINSON *et al.*, 1995)

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,

baixo custo de produção e estabilidade, uma vez que não se observam enzimas proteolíticas originárias de material biológico. PATARROYO *et al.* (1995) citam também a ausência de mecanismos supressores, alérgicos e/ou autoimunes e mecanismos de evasão típicos de microrganismos.

O desenho para uma vacina sintética eficiente requer informações baseadas nos detalhes estruturais da molécula protéica nativa. Sendo assim, contribuições têm sido feitas por diversas metodologias como: cristalografia com raios X, anticorpos monoclonais, técnicas de engenharia genética e programas de informática capazes de simular a estrutura protéica (MELNICK, 1986).

A partir da seqüência da Bm86, 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 e WOODS, 1981), potencialidade de alfa e beta hélice e Beta Sheet (CHOU e FASMAN, 1978), hidrofobicidade e hidrofiliidade (KYTE e DOOLITTLE, 1982). A partir dessas análises, foram escolhidas três seqüências definidas como contendo alguns dos possíveis determinantes imunogênicos da Bm86. Estas seqüências foram desenhadas no LBCH/BIOAGRO/DVT da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, e sintetizadas no "Instituto de Immunologia del Hospital San Juan de Dios" em Bogotá, Colômbia. Esses peptídeos foram catalogados pelo livro de seqüências como 4822 (a.a. 398-411), 4823 (a.a. 21-35) e 4824 (a.a. 132-145) e foram hibridizados para se obter um só peptídeo, listado como SBm4912<sup>1</sup> (seqüência 4822-4823-4824), o qual tem duas cisteínas nos terminais para polimerização do mesmo, evitando assim, o uso de moléculas carreadoras para ativação de uma resposta imunológica.

O peptídeo sintético SBm4912 foi avaliado, experimentalmente, como imunógeno para o controle de *B. microphus* em bovinos da raça Hereford estabelecidos 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

---

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

saponina. Avaliaram-se também dois grupos controles, um para o adjuvante e outro como controle geral. Todos os animais foram desafiados com 1.500 larvas/dia, durante 3 dias consecutivos, a partir do 21<sup>o</sup> dia após a terceira inoculação. Obteve-se 23,45%, na redução do número de teleóginas, 8,4% na redução do peso médio das teleóginas e 10,32% do peso médio da ovoposição, segundo fórmulas descritas por DE LA FUENTE (1995). Foram demonstradas, ainda, 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, denominados SBm7462<sup>2</sup> (seqüência 4822-4824-4823) e SBm19733 (seqüência 4822-4823-4824, contendo pontes KEK entre as referidas seqüências), também baseado na estrutura da Bm86. PORTELA (2000) comparou a eficiência dos peptídeos SBm4912, SBm7462 e SBm19733, inoculando-os em animais estabulados da raça Jersey, seguindo o modelo experimental de OLIVEIRA (1998). As respectivas eficácias ( $p < 0,01$ ) foram: 72,4% para o peptídeo SBm4912, 81,05% para o SBm7462 e de 35,87% para o SBm19733, tendo sido analisadas a redução no número das teleóginas, redução do peso dos ovos e redução da fertilidade, segundo DE LA FUENTE (1995). Tanto as interações *in situ* dos anticorpos produzidos no intestino dos carrapatos, quanto as lesões produzidas por tais, foram confirmadas para os peptídeos SBm4912 e SBm7462. De posse de tais resultados, era necessário analisar em teste misto, campo e estábulo, o peptídeo SBm7462.

### **3.7. Memória imunológica e as vacinas contra carrapatos**

Edward Jenner desenvolveu a primeira vacina bem sucedida para humanos há aproximadamente 200 anos, demonstrando que a inoculação em um menino com um extrato contendo vírus da varíola bovina atuaria de forma

---

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

protetora contra a varíola humana. Somente muitas décadas depois se soube que Jenner havia criado uma vacina de células T e que aquela levava à produção de anticorpos protetores (BONA, *et al.*, 1998). Atualmente, muitos conhecimentos já são claros sobre como ocorre uma resposta imune, como se dá a proteção e porque ela persiste, embora muitos outros conhecimentos ainda pareçam obscuros.

Pelo conceito clássico de resposta imune, a partir do contato primário do sistema imune com o antígeno, há o processamento deste pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) e posterior apresentação dos determinantes antigênicos às células imunocompetentes  $CD_4^+$ , restritas ao Complexo Maior de Histocompatibilidade do Tipo II (MHC II) ou  $CD_8^+$ , restritas ao MHC I, as quais modulariam a resposta protetora com a produção de citocinas. O perfil das citocinas produzidas direciona a resposta para o tipo Th2, com uma maior produção de anticorpos por linfócitos B, ou Th1, com predominância de uma resposta celular (BONA, *et al.*, 1998).

A memória imunológica é carregada por linfócitos T e B, com a predominância de um dos tipos celulares, a depender do agente imunoestimulante no contato prévio. Durante o contato primário, a maioria das células T e B são selecionadas para morrer por apoptose e apenas poucas são selecionadas para gerar células de memória, com uma alta afinidade pelo antígeno (SPRENT, 1997); essas células são marcadas por moléculas de adesão (marcadores de suas superfícies celulares) que interagem com fatores inibidores das funções pro-apoptóticas (CORY, 1995).

A maturação da afinidade em uma resposta imune secundária se dá em um microambiente especializado para seleção de células B ou T com alta afinidade (SPRENT, 1997).

MOSMANN *et al.* em 1986 postulou o paradigma do tipo Th1 ou Th2 da resposta imune em camundongos, na qual a proteção imunológica está relacionada a respostas do tipo celular ou humoral. Esse paradigma é na verdade uma simplificação de uma complexa rede de mecanismos imunorreguladores. Existem evidências de que muitas infecções são controladas através de mecanismos humorais e celulares. A imunorregulação de infecções difere em

relação aos tipos celulares envolvidos, as citocinas e mediadores secretados, assim como os seus efeitos supressores ou indutores sobre respostas imunes do tipo Th1 e Th2 (COX, 1997; BROWN *et al.*, 1998).

A resposta imune de humanos e bovinos contra determinados antígenos é heterogênea, existindo uma predominância da resposta do tipo Th1 ou Th2 (BROWN *et al.*, 1993). Esta heterogeneidade relaciona-se com o perfil de citocinas produzidas e secretadas. Outras diferenças estão relacionadas com as classes de imunoglobulinas produzidas: em bovinos, tanto a IgG1 quanto a IgG2 fixam complemento, sendo que a IgG2 tem maior atividade opsonizante em relação à IgG1 (McGUIRE *et al.*, 1979). A produção de IgG1 por linfócitos B é induzida pela interleucina-4 (IL-4) enquanto que o IFN- $\gamma$  estimula a produção de IgG2 (ESTES *et al.*, 1995).

Mais relevante ainda, é que em bovinos, além dos “clusters” CD (CD<sub>4</sub> e CD<sub>8</sub>), há os WC (“workshop clusters”), os quais ainda não têm uma função definida, mas que, segundo HOWARD *et al.* (1999a), podem apresentar uma pluripotencialidade para a apresentação de antígenos a “clusters” CD ou WC e que estão presentes em maior número em animais jovens, circulando do sangue para a pele, onde podem interagir com as células dendríticas, células altamente especializadas na apresentação de antígenos e muito numerosas nos linfonodos que drenam a pele de bovinos (HOWARD, *et al.*, 1999b).

As interações com antígenos virais e bacterianos são bastante claras, com respostas Th1 e Th2, respectivamente (BRACHMANN e KOPF, 1999). Entretanto, novos tipos de antígenos com potencial imunogênico estão sendo desenvolvidos e, conseqüentemente, novas implicações imunológicas vão surgindo. Para os imunógenos recombinantes, BONA *et al.*, (1998) citam que estes antígenos se mostram bons imunógenos e não perdem as propriedades imunogênicas da proteína nativa, pelo contrário, as intensificariam. Acrescentam, ainda, que bons imunógenos deveriam ter como características principais: a capacidade de ser internalizados e processados pelas APCs e a afinidade pelo MHC I ou II. Para peptídeos sintéticos, os mesmos autores relatam que o número de peptídeos que se ligam ao MCH II é maior do que o que naturalmente ocorre, intensificando a resposta. Consideram também, que os peptídeos sintéticos

podem interagir diretamente com o MHC II, embora muitas vezes podem ser pobres imunógenos por causa do pequeno tamanho e da pequena meia-vida, sendo rapidamente degradados por enzimas proteolíticas e que para minimizar tal ação, poderiam ser associados a adjuvantes como os ISCOMs. ABBAS (1997) relata que o tamanho do antígeno é importante, mas que o MHC II tem a capacidade de apresentar determinantes antigênicos a partir de 30 aminoácidos e o MHC I, entre 8 e 11.

A memória imunológica é um fator extremamente importante que deve ser considerado no desenvolvimento de vacinas, pois a proteção está relacionada com uma resposta rápida e protetora, seja ela celular ou humoral (BRACHMANN e KOPF, 1999). Para *antígenos escondidos* de *B. microplus*, a exposição natural do parasita ao hospedeiro não vai estimular a memória imunológica, já que eles não estão presentes na interrelação natural com o sistema imune do hospedeiro, razão pela qual os programas de vacinação com tais antígenos requerem repetidas imunizações, sendo o número delas dependente do nível de duração dos anticorpos circulantes (FLOYD, *et al.*, 1995).

Para a Bm86, no Brasil, são utilizadas revacinações a cada 6 meses (MORA HERNÁNDEZ, 1996). Para o peptídeo sintético SBm4912, PORTELA *et al.* (1999) demonstraram que, 6 meses após uma terceira inoculação, os níveis de anticorpos dos animais imunizados estavam próximos àqueles apresentados pelo controle e que com uma revacinação esses níveis de anticorpos se triplicaram já aos 7 dias.

### **3.8. Adjuvante saponina**

Saponinas são compostos que têm capacidade de se ligar fortemente a moléculas como o colesterol e formar pequenos complexos, interagindo com membranas celulares e podem causar efeitos adversos quando administradas em animais. Também possuem forte ação imunoestimulante (LUNDÉN, *et al.*, 1996).

Os adjuvantes, em geral, têm o papel de promover um melhor estímulo do sistema imune do hospedeiro, não só pela liberação de forma lenta e gradual

do antígeno, como também por atrair um maior número de APCs intensificando a interação do antígeno com o MHC II (ABBAS, 1997).

Existem quatro fontes reconhecidas de saponinas: *Smilax ornata* (sarzaparilla), *Gypsophilla paniculata*, *Saponaria officianalis* e *Quillaja saponaria molina* (LUNDÉN, *et al.*, 1996). Essa última é a mais conhecida e é extraída de cascas de árvores da América do Sul (*Quillaja saponaria*).

Cavalos, cães e gatos parecem ser, razoavelmente, mais sensíveis à saponina, sendo disponíveis comercialmente vacinas contra o vírus da influenza equina, parvovirose canina e leucemia felina a vírus que contém Quil A como adjuvante (DALSGAARD *et al.*, 1999).

As saponinas também tem a capacidade de formar complexos de alta estabilidade com o colesterol, fosfolípidos e múltiplas cópias de antígenos, formando os complexos imunoestimulantes ou ISCOMs (LUNDÉN, *et al.*, 1996). Os ISCOMs têm uma capacidade imunoestimulante maior que as saponinas e teriam a capacidade de induzir respostas do tipo Th1 e Th2, ao contrário de adjuvantes como o hidróxido de alumínio que, essencialmente, induzem a Th2 (LUNDÉN, *et al.*, 1996). O uso de ISCOMs já é indicado para uso com vacinas recombinantes ou peptídeos sintéticos (LUNDÉN, *et al.*, 1996).

JACKSON e OPDEBEECK (1994), trabalhando com a Bm86 recombinante adicionada de saponina Quil A como adjuvante, observaram melhor proteção, embora parcial, e altos níveis de anticorpos para os antígenos intestinais quando comparado com outros adjuvantes.

## 4 – MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local de estudo

O experimento foi desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite CNPGL-EMBRAPA no município de Coronel Pacheco/MG (21°45'35''S e 43°15'W) e no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/DVT/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa-Viçosa/MG.

### 4.2. Campo experimental

Os animais foram mantidos a campo sob o manejo de rotina do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite CNPGL-EMBRAPA, numa área de 56 hectares com *Brachiaria decumbens*. Os piquetes destinados ao experimento foram infestados artificialmente com teleóginas de *B. microplus* por um período de 3 meses antes que os animais tivessem acesso ao pasto.

### **4.3. Área de confinamento**

A área de confinamento consistiu de baias individuais cimentadas e cobertas.

### **4.4. Animais utilizados e manutenção**

Foram utilizados 30 novilhas *Bos taurus taurus* da raça holandesa, com média de grau de sangue de 91,16% (H/Z) e com média de idade de 10,4 meses, pertencentes à EMBRAPA-CNPGL, os quais mantiveram contato prévio com carrapatos.

Após a entrada dos animais nos piquetes, esperaram-se por 60 dias até que houvesse uma alta infestação com carrapatos em todos os animais dos grupos, o mais uniformemente possível, para somente depois se iniciar o experimento.

Durante a permanência no campo experimental, os animais receberam água *ad libitum*, suplementação alimentar com sal mineral e estiveram expostos a condições estressantes como variações sazonais e infestações por ectoparasitas e endoparasitas diversos, bem como submetidos a vacinações rotineiras da produção leiteira regional, como aftosa, brucelose e clostridiose.

Durante a fase de confinamento, os animais receberam capim picado e ração balanceada com 17% de proteína, fornecida uma vez ao dia e água *ad libitum*.

### **4.5. Peptídeo sintético**

O peptídeo sintético SBm7462 é baseado na estrutura da proteína Bm86 e foi sintetizado de acordo com técnica descrita por MERRIFIELD (1963). A escolha deste peptídeo 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 e WOODS, 1981), potencialidade de alfa e beta hélice e Beta Sheet (CHOU e FASMAN, 1978),

hidrofobicidade e hidrofiliçidade (KYTE e DOOLITTLE, 1982). O peptídeo foi desenhado no LBCH/BIOAGRO/DVT da Universidade Federal de Viçosa e sintetizado com auxílio do "Instituto de Inmunologia del Hospital San Juan de Dios" em Bogotá, Colômbia.

Segundo PORTELA (2000), a metodologia empregada foi a "Good Manufacture Procedure" (GMP), na qual se usa um suporte sólido, no caso a resina MBH4 (4-metilbenzidrilamina) com coeficiente de substituição 0,49 meq/g, pesada de acordo com a quantidade de peptídeo a ser sintetizado e aminoácidos protegidos em suas cadeias laterais pelo grupo t-boc (terbutilcarbonilo). A resina foi colocada em uma bolsa de poliestireno, que foi selada a quente. Aplicou-se uma solução de 100ml de diisopropiletilamina (DIEA) 5% em diciclohexilcarbodiimida (DCC) para ativação da resina. Secou-se a bolsa e adicionou-se a solução do primeiro aminoácido dissolvido em solvente diclorometano (DCM) ou solução de DCM e dimetilformamida (DMF) mais o ativador DCC, sendo que a quantidade de aminoácido depende de seu peso molecular e da quantidade e tipo de resina empregada. Incubou-se a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora. Após essa incubação, retirou-se a bolsa de material sintético, cortou-se uma extremidade e retirou-se uma pequena fração de resina, para verificar o completo acoplamento do aminoácido à resina, através de teste de ninhidrina. Com o teste positivo, repetiu-se o acoplamento utilizando-se hidrato de 1-hidroxibenzotriazole (HOBT). Com o teste negativo, prosseguiu-se a síntese, através da adição de 100ml de ácido trifluoroacético (TFA) 5% em DCM para desproteção dos grupos aminos, lavagens com DCM e isopropanol e incubação com o próximo aminoácido da sequência do peptídeo. Com o término da síntese, o material foi submetido a clivagens para retirada dos grupos t-boc e da resina e a cromatografia HPLC para determinação do grau de eficiência e pureza da síntese, posteriormente liofilizados e então estocados à temperatura de -20°C em tubos de "ependorff". A sequência do peptídeo SBm7462 é resultado da síntese contínua dos peptídeos, 4822 (a.a. 398-411), 4824 (a.a. 132-145) e 4823 (a.a. 21-35).

#### 4.6. Adjuvante

O adjuvante utilizado foi a saponina (Saponine®<sup>3</sup>) na dose de 1,5mg/animal diluído em água milli Q estéril para o grupo de animais que recebeu 2,0mg de peptídeo SBm7462 e de 1,0mg/animal para o grupo que recebeu 1,0mg do referido peptídeo.

#### 4.7. Esquema de inoculação

Os 30 animais utilizados no experimento foram distribuídos em três grupos de 10 animais pelo peso médio deles, de forma que a infestação a campo por carrapatos em cada grupo foi aleatória. Esses animais foram inoculados em bretes de contenção, pela via subcutânea, de acordo com o esquema abaixo:

- GRUPO 01 - PEPTÍDEO SINTÉTICO SBm7462 (2,0mg): animais que receberam três doses do peptídeo sintético SBm7462 juntamente com 1,5 mg de adjuvante, sendo a primeira dose no dia 0 (20 de novembro de 2000), a segunda no dia 30 (20 de dezembro de 2000) e a terceira no dia 60 (19 de janeiro de 2001).
- GRUPO 02 - PEPTÍDEO SINTÉTICO 7462 (1,0mg): animais que receberam três doses de 1,0mg do peptídeo sintético SBm7462, juntamente com 1,0 mg de adjuvante, aos 0, 30 e 60 dias.
- GRUPO 03 - CONTROLE: animais que não receberam inóculo ao longo do experimento, embora estiveram sob as mesmas condições de manejo zootécnico dos demais grupos.

Cada animal foi identificado com brincos numerados na orelha e para melhor auxiliar na identificação por grupo, cada animal recebeu uma corda de nylon no pescoço de uma cor diferente para cada grupo.

---

<sup>3</sup>Saponine® UCB Leuven-Belgium

#### **4.8. Manutenção da colônia de *Boophilus microplus***

Foi utilizada a cepa de carrapatos “Porto Alegre” em todas as fases do experimento, pertencente ao Laboratório de Sanidade Animal da EMBRAPA-CNPGL, mantida em estufa B.O.D. a 28°C e 80% de umidade, sensível a todos os carrapaticidas. Para o desafio em confinamento, foram feitas 90 alíquotas de 1.500 ovos (0,075g) cada uma (considerando a relação de 1 grama equivalente a 20.000 ovos, pressuposta por HITCHCOCK em 1955b) em seringas de 5ml. Tais alíquotas foram mantidas em estufa até a eclosão, de forma que as larvas provenientes teriam no máximo duas semanas de eclosão quando usadas para desafio.

#### **4.9. Desafio**

O programa de desafio com carrapatos foi dividido em duas etapas:

##### **4.9.1. Desafio a campo**

Os animais foram colocados em piquetes previamente infestados com larvas de *Boophilus microplus*. No segundo dia após a primeira inoculação, receberam uma dose do carrapaticida Acatak<sup>®4</sup>(1ml/10kg), de forma a zerar a infestação de carrapatos dentro de algumas semanas em todos os grupos e se fazer o acompanhamento do número de carrapatos entre os grupos ao longo do experimento, bem como para evitar problemas sanitários devido à alta infestação verificada no dia 0. Os animais dos três grupos permaneceram nos mesmos piquetes.

---

<sup>4</sup>Acatak Pour-On (Fluazuron) – Novartis Saúde Animal Ltda.

#### **4.9.2. Desafio artificial em estábulo**

A segunda fase se refere ao desafio artificial em baias de confinamento individual para onde os animais foram enviados duas semanas após a terceira inoculação quando receberam um outro banho carrapaticida com produto de pequeno poder residual - Carbeson®<sup>5</sup> (1:400). O desafio foi feito 23 dias após a terceira inoculação e 9 dias após o banho carrapaticida. No dia anterior ao desafio, todos os animais foram banhados com água e escovados para eliminar possíveis resíduos de acaricidas.

O desafio consistiu em colocar 1.500 larvas/dia por animal, durante 3 dias consecutivos em todos os animais nas regiões do peito e barbela, entre os membros anteriores e posteriores, dorso e região perianal, durante o início da manhã. Foram colocados cabrestos e as caudas foram amarradas por 2 horas para que houvesse a fixação das larvas nos hospedeiros.

#### **4.10. Contagem de carrapatos a campo**

Semanalmente, a partir do dia 0, era feita a contagem de carrapatos com diâmetro acima de 4mm de todos os animais em brete de contenção. A contagem era feita em um antímero e multiplicada por dois, de forma que se tinha a estimativa do número de carrapatos que parasitavam o animal, segundo MORA HERNÁNDEZ, *et al* (1998). A contagem se realizou até a segunda semana após a terceira inoculação, data em que os animais foram enviados ao estábulo.

#### **4.11. Avaliação dos parâmetros biológicos das teleóginas desprendidas dos animais**

##### **4.11.1. Parâmetros biológicos de teleóginas desprendidas e de seus ovos**

No 18<sup>o</sup> dia, após o desafio com larvas de carrapatos em confinamento, iniciou-se a coleta manual de todas as teleóginas que se desprendiam

---

<sup>5</sup>Carbeson (D.D.V.P, Clorfenvinfos) – Leivas Leite S/A – Indústrias Químicas e Biológicas

naturalmente dos animais e que eram encontradas no chão das baias e nos cochos. A coleta sempre iniciava antes de se raspar as baias para limpeza diária. Eram feitas três coletas durante a manhã e uma quarta no início da tarde para evitar ao máximo o pisoteio. A coleta terminou no 30º dia após o desafio, quando não haviam mais carrapatos para se desprender.

As fêmeas coletadas a cada dia eram pesadas individualmente em balança de precisão e acondicionadas em placas de cultura de 24 “wells”, identificando-as. As teleóginas foram colocadas em estufa B. O. D. a 28°C e 80% de umidade para fazer a postura durante 15 dias; logo depois, fez-se a pesagem de ovos de cada fêmea em balança de precisão.

#### **4.11.2. Relação peso larvas/grama de ovos**

Do total de ovos, foram separadas vinte alíquotas de 0,5g (10.000 ovos) por grupo em tubos de centrífuga, perfazendo um total de 10 gramas de ovos por grupo. Os tubos foram tampados com chumaço de algodão e foram incubados por 26 dias em estufa B. O. D. As alíquotas foram feitas em mais de um dia de pesagem dos ovos. Para a obtenção dos resultados, foram empregadas as técnicas descritas por MASSARD *et. al.* (1995).

#### **4.11.3. Fórmulas para avaliação dos parâmetros biológicos**

Com o objetivo de avaliar o efeito do imunógeno sobre os parâmetros biológicos do carrapato, foram usadas as fórmulas preconizadas por DE LA FUENTE (1995) empregadas para a rBM86, para os grupos vacinal 2,0mg e 1,0mg e para o grupo controle, como mostrado a seguir:

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

onde:

DT(%) - porcentagem de redução do número de teleóginas

NTV- nº teleóginas para cada grupo vacinal

NTC - nº teleóginas grupo controle.

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

onde:

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

PMTV - peso médio das teleóginas para cada grupo vacinal;

PMTC - peso médio das teleóginas grupo controle.

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

onde:

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

PMOV - peso médio dos ovos para cada grupo vacinal

PMOC - peso médio dos ovos grupo controle.

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

onde:

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

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

onde:

EF(%) - eficácia do imunógeno

CRT - redução no número de fêmeas adultas

CRO - redução na capacidade de ovipostura

CRF - redução na fertilidade

#### **4.12. Análise de sobrevivência de larvas nas pastagens**

Durante a pesagem dos ovos para análise dos parâmetros biológicos foram feitas 12 alíquotas de 0,025g de ovos (500 larvas), acondicionados em 12 malhas de aço, finas o suficiente para impedir a entrada de formigas ou aranhas, vedadas com tampas de borracha e identificadas, de forma que se teve a seguinte distribuição por grupo:

Quadro 1 – Distribuição das alíquotas de peso de ovos de *Boophilus microplus* para teste de sobrevivência de larvas na pastagem

Grupo	Peso/malha (g)	Número de malhas
2,0mg	0,025	4
1,0mg	0,025	4
Controle	0,025	4

Todas as malhas foram levadas para estufa B. O. D. a 28°C e 80% de umidade relativa por um período de 2 dias, quando, então, foram enviadas para o campo experimental e colocadas em dois lugares distintos nas pastagens, sob o abrigo dos raios solares, de forma que se tinha 2 malhas de cada grupo em cada local.

Uma malha de cada grupo foi coletada 30 e 60 dias após envio para as pastagens, nos dois locais, e enviada para o laboratório onde se procedeu a contagem de larvas vivas, sobre papel milimetrado e com o auxílio de lupa estereoscópica.

#### **4.13. Coleta de sangue dos animais para a obtenção de soro**

A coleta de sangue dos animais foi feita semanalmente a partir da semana 0 até a semana 19, sendo que a primeira coleta foi realizada antes da primeira inoculação.

O sangue foi coletado na veia caudal utilizando frascos de “vaccuntainer” de 10ml sem anticoagulante. O sangue foi enviado para o Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/Departamento de Veterinária/BIAGRO/UFV, extraído o soro, e este, aliquotado em tubos “eppendorf” e conservado a -20°C.

#### **4.14. Pesagem dos animais**

Todos os animais foram pesados na semana 0 usando fita métrica. A pesagem se deu antes da inoculação e os animais foram separados uniformemente quanto ao peso, de forma que a infestação de carrapatos foi aleatória.

#### **4.15. Teste de ELISA anti-SBm7462 para medição da resposta imune humoral**

A cinética de anticorpos anti-SBm7462 foi medida utilizando-se o teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), de acordo com a técnica utilizada rotineiramente no LBCH e adaptada para peptídeos sintéticos. Para cada amostra foram feitas triplicatas. Para cada dia da realização de um teste, eram usados soros dos animais dos 3 grupos.

As placas de ELISA Hemobag®<sup>6</sup> foram sensibilizadas com uma solução de Tampão Carbonato pH 9,6 (0,159g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,293g NaHCO<sub>3</sub>; H<sub>2</sub>O milli Q q.s.p. 100ml), na qual se diluiu o peptídeo na quantidade de 2µg/well, deixando-se adsorver a 4°C “overnight”. Decorrido este período, as placas eram lavadas duas vezes com Tampão de Lavagem (9,0g de NaCl; 0,5ml Tween 20, H<sub>2</sub>O dd q.s.p. 1000ml) e adicionada a solução de bloqueio – Caseína 2% em PBS pH 7,6 (4,25g NaCl; 0,64g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,068g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; H<sub>2</sub>O milli Q q.s.p. 500ml) por uma hora à temperatura ambiente. Lavou-se as placas duas vezes e, posteriormente, adicionou-se 100µl/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) e deixou-se incubar por duas horas à temperatura ambiente. Lavou-se as placas seis vezes com Tampão de Lavagem e procedeu-se à incubação, por duas horas à temperatura ambiente, do anticorpo secundário – IgG de coelho anti-IgG bovina conjugada com peroxidase

---

<sup>6</sup>Placas de ELISA 96 wells – Hemobag Produtos Cirúrgicos Ltda.

(Sigma®<sup>7</sup> título 1:20.000), diluída em Tampão de Incubação, no volume de 100µl/well. Lavou-se as placas 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,19g ácido cítrico e H<sub>2</sub>O milli Q q.s.p. 1000ml), 4mg de O. P. D. ( θ- fenildiaminobenzeno) e 2,5µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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 ELISA a 492nm (Titer Multiskan® PLUS<sup>8</sup>).

Todos os resultados de absorbância obtidos dos testes de ELISA foram corrigidos para uma placa padrão, conforme PASSOS (1993). Tal critério foi adotado devido à grande sensibilidade que possui o teste de ELISA para diversos fatores que interferem nos resultados finais, como pequenas diferenças de diluições, condições de temperatura e umidade relativa e, principalmente, pelos testes serem feitos em dias diferentes e em várias placas. Sendo assim, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{FATOR (F)} = \frac{\text{Po} - \text{No}}{\text{Pt} - \text{Nt}}$$

$$\text{Valor ajustado} = \mathbf{F (\text{St} - \text{Nt}) + \text{No}}$$

Onde:

**Po** = média dos controles positivos na placa padrão

**No** = média dos controles negativos na placa padrão

**Pt** = média dos controles positivos na placa teste

**Nt** = média dos controles negativos na placa teste

**St** = média da amostra testada

Para se obter a placa padrão, foi realizado um ELISA testando várias diluições do peptídeo (0,5, 1 e 2µg/well), de soros sabidamente positivo e negativo de experimentos anteriores (1:100 e 1:200) e dos anticorpos secundários marcados com peroxidase (1:10.000 e 1:20.000), todos em triplicata

<sup>7</sup>Anti Bovine IgG Peroxidase Conjugate (Antibody Developed in Rabbit) 1:20.000-Sigma,USA.

<sup>8</sup>Titertek Multiskan PLUS – USA.

Para discriminar o ponto de corte entre positivo e negativo para a resposta sorológica mensurada no teste de ELISA, usou-se a adição de dois desvios padrões aos controles negativos.

#### **4.16. Análise estatística**

Utilizou-se do teste de Análise de Variância (ANOVA) para comparação entre diversos ensaios. Para cada ensaio era testada a homogeneidade das amostras (Teste de Lewine), feito o teste de ANOVA e, posteriormente, o teste de Tukey. Considerando os parâmetros biológicos, foram comparadas as médias de peso dos ovos das teleóginas.

A Análise de Medidas Repetidas se fez necessário para comparar as médias de teleóginas no decorrer das contagens a campo, as médias de teleóginas no decorrer das coletas diárias em confinamento e as médias de absorvâncias dos testes de ELISA para mensuração de resposta imune humoral. O teste “a posteriori” também foi o teste de Tukey.

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software Statistic® Versão 6.0.

Para a análise de sobrevivência de larvas nas pastagens não se pode realizar teste estatístico em decorrência do pequeno número de amostras.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Predição computacional do peptídeo sintético SBm7462

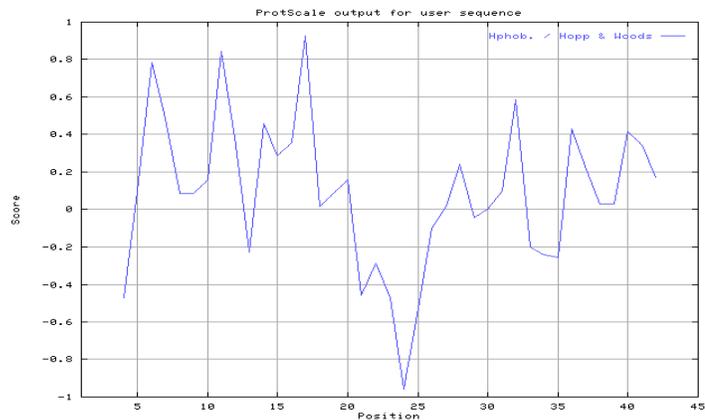
A conformação e análise computacional do peptídeo SBm7462, para os diferentes parâmetros utilizados em seu desenho estão apresentados na Figura 1.

O peptídeo 7462 apresenta um alto grau de hidrofobicidade, significando que ele pode ter uma boa imunogenicidade e pouca antigenicidade (Figura 1A). Por outro lado, o SBm7462 apresenta uma baixa tendência a formação "coil" (Figura 1B) e uma alta tendência a formações  $\alpha$  - hélice (Figura 1C).

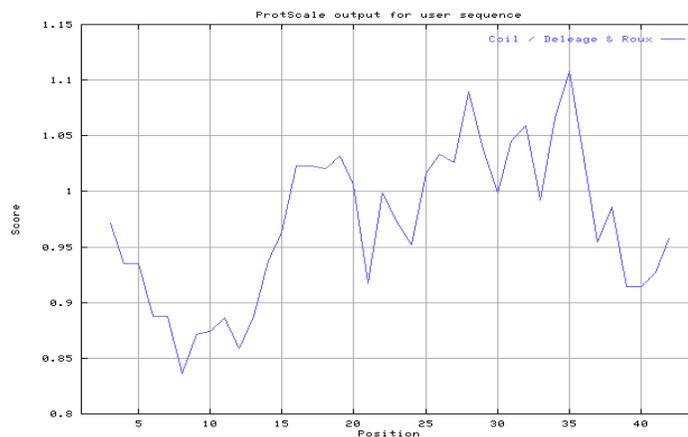
SPOUGE *et al.* (1987) definem que uma das características a serem consideradas na construção e desenho de uma vacina sintética é a existência de uma região protéica com propensão à formação de estruturas  $\alpha$  - hélice, e pouca ou nenhuma propensão à formação "coil", características presentes no SBm 7462. Por outro lado, a hidrofobicidade é um fator fundamental para imunógenos que usam a saponina como adjuvante (DALSGAARD *et al.*, 1999).

Os fatos encontrados na análise computacional coincidem com os resultados encontrados quando do uso deste peptídeo como imunógeno "in vivo".

### A - Hidrofobicidade (HOOP e WOODS, 1981)



### B - "Coil" (DELEAGE e ROUX, 1987)



### C - Alpha-hélice (CHOU e FASMAN, 1978)

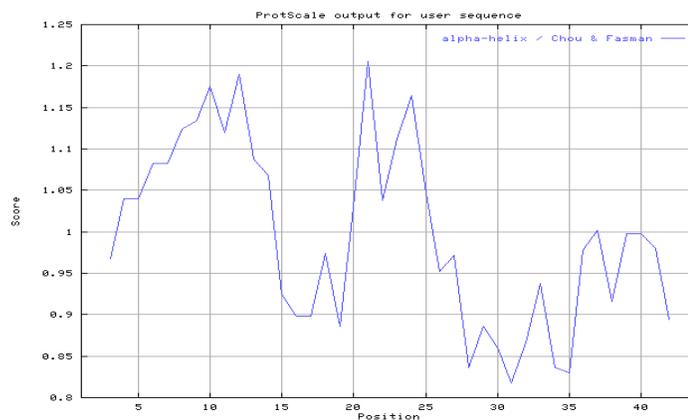


Figura 1 – Estudo de predição computacional de hidrofobicidade, propensão a conformação “coil” e potencial  $\alpha$ -hélice do peptídeo sintético SBm7462 (aplicativo ProtScale).

## 5.2. Contagem de carrapatos a campo

Como apresentado no Quadro 2 e Figura 2, não houve diferença estatística quando se comparou a média de carrapatos dos animais dos diferentes grupos no decorrer das semanas do experimento a campo, embora se note um menor número de carrapatos para o grupo 1,0mg e 2,0mg. Estes dados podem ser justificados pelo fato dos animais dos três grupos permanecerem no decorrer do experimento nos mesmos piquetes, altamente infestados e com condições bioclimáticas favoráveis ao parasitismo por *B. microplus*, como pode ser visto no Quadro 3, sendo que a primeira inoculação se deu em 19 de novembro de 2000, e os animais retirados dos piquetes em fevereiro de 2001.

Houve, nesta etapa, uma variação grande do número de carrapatos dentro de cada grupo, como pode ser visto pelos desvios-padrão na Figura 2. Em análises de número de carrapatos por animal é difícil estabelecer uma média que seja representativa do grupo. MORA HERNÁNDEZ (1996) demonstra, ao usar a Gavac<sup>TM</sup>, que o número de carrapatos por animal era bastante disperso podendo variar de 6 a 260, sendo as maiores infestações em animais com grau de sangue europeu. Neste trabalho, tal fato poderia ser menos evidenciado com um número de animais maior e com uma permanência maior dos animais a campo, conforme tem sido observado em trabalhos a campo com a proteína recombinante rBm86.

Devido a isso, optou-se por verificar a eficácia do imunógeno sintético em um desafio programado, servindo esta presente etapa para se verificar a performance do imunógeno frente às condições de manejo, como variações sazonais, vacinações e parasitismo concomitante, bem como uma prévia de um teste a campo em fazendas.

## 5.3. Cinética de anticorpos anti-peptídeo sintético SBm7462

Os resultados obtidos nos testes de ELISA, corrigidos pela fórmula proposta por PASSOS (1993) encontram-se no Quadro 4, e na figura 3.

A escolha da técnica de ELISA para mensuração da resposta imune humoral (IgG) ao peptídeo sintético utilizado neste experimento se deu pela boa sensibilidade e especificidade dessa técnica, aliada ao baixo custo e praticidade.

Quadro 02 – Média de carrapatos a campo de animais imunizados com SBm7462. Os valores correspondem à média de carrapatos em 10 animais. Letras diferentes (a, b) indicam diferenças estatísticas, entre as colunas, em teste de ANOVA.

Média de carrapatos a campo de animais imunizados com SBm7462												
Grupo	Semanas											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Controle</b>	49,00 <sup>a</sup>	36,00 <sup>a</sup>	21,40 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	6,80 <sup>a</sup>	6,20 <sup>a</sup>	8,00 <sup>a</sup>	9,40 <sup>a</sup>	27,40 <sup>a</sup>	18,44 <sup>a</sup>
<b>1,0mg</b>	49,00 <sup>a</sup>	36,40 <sup>a</sup>	9,00 <sup>a</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	1,80 <sup>a</sup>	2,20 <sup>a</sup>	4,40 <sup>a</sup>	5,00 <sup>a</sup>	17,00 <sup>a</sup>	11,11 <sup>a</sup>
<b>2,0mg</b>	43,60 <sup>a</sup>	33,40 <sup>a</sup>	12,40 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,40 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	2,80 <sup>a</sup>	4,80 <sup>a</sup>	20,60 <sup>a</sup>	14,80 <sup>a</sup>

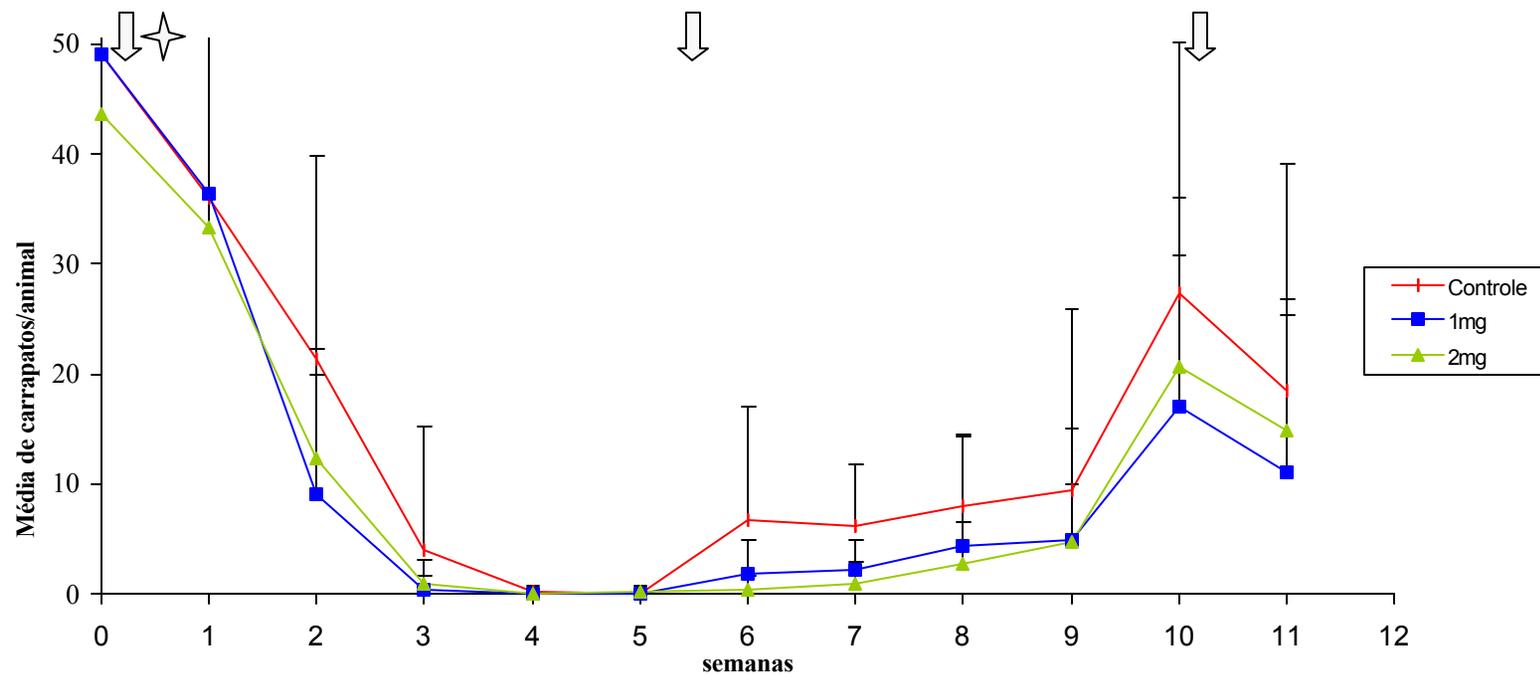


Figura 2 – Contagem de carrapatos a campo dos animais imunizados com SBm7462. As setas indicam as inoculações e a estrela de quatro pontas a aplicação de carrapaticida.

Quadro 3 – Dados climáticos, em média, da Estação Meteorológica de Coronel Pacheco EMBRAPA-CNPGL nos meses de experimento.

<b>Mês/ano</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Umidade Relativa (%)</b>	<b>Pluviosidade (mm<sup>3</sup>)</b>
Jun/00	16,8	81	0,8
Jul/00	16,7	80	6,4
Ago/00	18,0	78	51,5
Set/00	19,8	79	106,6
Out/00	23,3	70	51,1
Nov/00	22,4	82	178,7
Dez/00	23,9	80	252,2
Jan/01	24,5	75	75,0
Fev/01	25,0	76	133,1
Mar/01	24,9	79	236,8
Abr/01	23,9	77	15,7
Mai/01	20,6	77	36,9

Alguns autores citam o emprego dessa técnica em antígenos derivados de carrapatos, como extratos de intestino e ovos de carrapatos (KIMARO e OPDEBEECK, 1994), extratos de fêmeas adultas (KEMP *et al.*, 1986; JACKSON e OPDEBEECK, 1994), extratos purificados de Bm86 (WILLADSEN *et al.*, 1989), formas recombinantes de Bm86 (WILLADSEN e MCKENNA, 1991) e peptídeos sintéticos baseados na estrutura de Bm86 (OLIVEIRA, 1998; PORTELA, 2000).

O quadro 4 e a figura 3 demonstram o quanto a técnica de ELISA empregada no experimento foi eficaz em identificar os anticorpos anti-SBm7462. As diferenças estatísticas começaram a se evidenciar após a segunda inoculação com SBm7462, o que se deve ao fato da resposta imune após a primeira inoculação ser uma resposta primária com uma eliciação de clones de linfócitos B específicos produzindo níveis baixos de anticorpos da classe IgG. A resposta imune humoral se mostrou clássica, com maiores níveis de IgG em resposta secundária, o que é muito evidente após a terceira inoculação e com uma manutenção desses anticorpos a níveis estatisticamente diferentes até a semana 19 entre os grupos vacinados e o controle e estatisticamente iguais para 1,0mg e 2,0mg em quase todos os pontos de coleta.

Estes dados concordam com os achados de OLIVEIRA (1998) e de PORTELA (2000) nos quais o pico de produção de IgGs específicas para peptídeos sintéticos ocorreu após a terceira inoculação. Estes resultados também estão de acordo com experimentos desenvolvidos em bovinos da raça Hereford por JACKSON e OPDEBEECK (1994). Porém, diferentemente destes autores, a variação das respostas individuais entres os animais de um mesmo grupo foi maior no presente trabalho, o que é verificado pelos altos desvios-padrão nos grupos vacinados (Figura 3). Isso pode ser justificado porque os animais deste experimento possuem graus de sangue diferentes dentro de uma mesma raça (Quadro 6), podendo, geneticamente possuírem características distintas quanto ao processamento e apresentação de antígenos pelo MHCII.

COBON, *et al.* (1995) já citavam diferentes níveis de produção de anticorpos entre raças diversas de bovinos inoculados com rBm86. PORTELA (2000) relata, em seu trabalho, que embora se tenha usado animais da raça Jersey

Quadro 4 - Médias de absorvância óptica (492nm) em teste de ELISA. Os números representam as médias de absorvância, sendo que para cada soro de cada amostra de soro foram feitas três repetições. Letras diferentes (a, b, c) seguindo os resultados, na mesma coluna, significam diferença estatística em Teste de Tukey ( $p < 0,01$ ).

Médias de Absorvância Óptica (492 nm)																				
Grupos	Semanas																			
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<b>Controle</b>	0,886 <sup>a</sup>	0,979 <sup>a</sup>	0,999 <sup>a</sup>	0,753 <sup>a</sup>	0,959 <sup>a</sup>	0,939 <sup>a</sup>	0,982 <sup>a</sup>	0,625 <sup>a</sup>	0,706 <sup>a</sup>	0,822 <sup>a</sup>	0,680 <sup>a</sup>	0,997 <sup>a</sup>	0,853 <sup>a</sup>	0,733 <sup>a</sup>	0,654 <sup>a</sup>	0,585 <sup>a</sup>	0,863 <sup>a</sup>	0,967 <sup>a</sup>	0,757 <sup>a</sup>	0,772 <sup>a</sup>
<b>1,0mg</b>	0,838 <sup>a</sup>	1,144 <sup>a</sup>	1,120 <sup>a</sup>	0,942 <sup>a</sup>	0,838 <sup>a</sup>	1,163 <sup>a</sup>	1,190 <sup>a</sup>	1,667 <sup>b</sup>	1,106 <sup>b</sup>	1,078 <sup>a,b</sup>	1,040 <sup>b</sup>	1,980 <sup>b</sup>	1,319 <sup>b</sup>	1,273 <sup>b</sup>	1,338 <sup>b</sup>	1,283 <sup>b</sup>	1,430 <sup>b</sup>	1,119 <sup>a,b</sup>	0,917 <sup>b</sup>	1,069 <sup>b</sup>
<b>2,0mg</b>	0,831 <sup>a</sup>	1,109 <sup>a</sup>	1,068 <sup>a</sup>	1,096 <sup>b</sup>	0,860 <sup>a</sup>	1,191 <sup>a</sup>	1,230 <sup>b</sup>	1,811 <sup>b</sup>	1,112 <sup>b</sup>	1,251 <sup>b</sup>	1,216 <sup>c</sup>	1,990 <sup>b</sup>	1,648 <sup>c</sup>	1,290 <sup>b</sup>	1,377 <sup>b</sup>	1,447 <sup>b</sup>	1,300 <sup>b</sup>	1,480 <sup>b</sup>	1,020 <sup>b</sup>	1,178 <sup>c</sup>

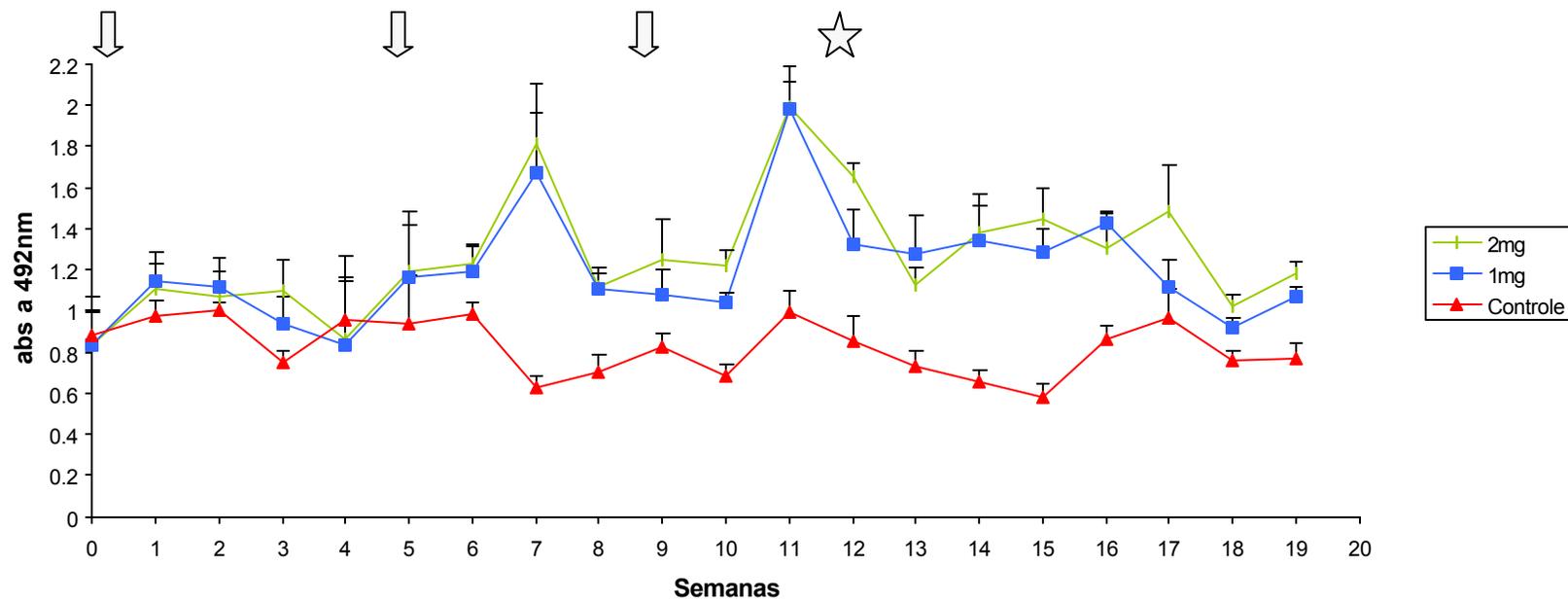


Figura 3 – Cinética de anticorpos em animais imunizados com SBm7462. As setas indicam as inoculações com SBm7462 e a estrela o desafio com larvas de *Boophilus microplus* em estábulo.

puros, não havia homozigose e que as respostas não foram uniformes, sendo que um dos animais vacinados não respondeu ao peptídeo SBm7462 em estábulo. Este aspecto é extremamente importante ao se avaliar um imunógeno, pois justifica os diferentes índices de eficácia quando se usa a Bm86 recombinante ou peptídeos sintéticos em rebanhos diversos.

Nota-se que o adjuvante saponina utilizado permitiu um bom desempenho nos níveis de anticorpos produzidos. JACKSON E OPDEBEECK (1994), trabalhando com o mesmo adjuvante, demonstraram que a saponina promovia uma melhor potencialização da resposta imune humoral para antígenos de carrapatos.

Neste trabalho optou-se por não se usar um grupo saponina baseando-se nos trabalhos de OLIVEIRA (1998) e PORTELA (2000), nos quais se demonstrou não haver diferença estatística entre o controle negativo e o grupo adjuvante.

#### **5.4. Avaliação dos parâmetros biológicos de *Boophilus microplus* provenientes de animais inoculados com peptídeo sintético SBm7462**

Na primeira semana do experimento em estábulo um dos animais veio a óbito. Sendo assim, para a análise dos parâmetros biológicos foram considerados nove animais por grupo, sendo retirados aqueles que comprometiam a homogeneidade da amostra em cada grupo, de acordo com o Teste de Lewine.

Os valores relativos a contagem de teleóginas, pesagem de ovos e de larvas e eficácia do imunógeno são mostrados no Quadro 5; valores relativos apenas à redução do número de teleóginas em estábulo são mostrados no Quadro 6 e Figura 4.

Pode-se observar no Quadro 5 que:

- Quanto ao número de teleóginas, o grupo 2,0mg é estatisticamente diferente do grupo 1,0mg e controle ( $p < 0,05$ ) e, estes, iguais entre si;

Quadro 5 - Parâmetros biológicos de *Boophilus microplus* provenientes de animais inoculados com o peptídeo sintético SBm7462 e do grupo controle. As letras diferentes (a, b), numa mesma linha, indicam diferença estatística significativa ao nível de significância de 0,05% no Teste de Tukey.

<b>PARÂMETROS BIOLÓGICOS</b>			
	<b>CONTROLE</b>	<b>1,0mg</b>	<b>2,0mg</b>
<b>NÚMERO DE TELEÓGINAS</b>	1187 <sup>a</sup>	1064 <sup>a</sup>	619 <sup>b</sup>
<b>PESO MÉDIO OVOPOSIÇÃO (gr)</b>	0,1168 <sup>a</sup>	0,1138 <sup>a</sup>	0,1104 <sup>b</sup>
<b>PESO LARVAS / GRAMA OVOS (gr.)</b>	0,7841	0,756	0,7432
<b>REDUÇÃO PESO OVOS (DO)</b>		2,57% <sup>a</sup>	5,48% <sup>b</sup>
<b>REDUÇÃO TELEÓGINAS (DT)</b>		10,36 <sup>a</sup>	47,85 <sup>b</sup>
<b>REDUÇÃO FERTILIDADE (DF)</b>		3,58%	5,22%
<b>EFICÁCIA (EF)</b>		<b>15,8%<sup>a</sup></b>	<b>53,29%<sup>b</sup></b>

Quadro 6 (a) – Efeito biológico no número de teleóginas desprendidas de animais do grupo controle em estábulo. O primeiro dia de desprendimento corresponde ao 19º dia pós infestação artificial com larvas de *B. microplus*. O grau de sangue indicado se refere à relação holandês/zebu (H/Z), de acordo com registros da EMBRAPA-CNPGL. Os animais 442 e 9563 estiveram em uma única baia.

### Grupo Controle

Animais/dia	Grau de sangue (%)	Dias de coleta											TOTAL
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<b>442+</b>	<b>93,75</b>												
<b>9563</b>	<b>96</b>	0	4	29	131	117	29	6	12	3	2	1	<b>334</b>
<b>411</b>	<b>92,9</b>	0	1	4	15	32	27	4	6	0	3	1	<b>93</b>
<b>408</b>	<b>95,3</b>	0	14	18	36	86	54	30	10	4	3	1	<b>256</b>
<b>9556</b>	<b>93,75</b>	0	2	18	51	42	25	4	4	4	0	1	<b>151</b>
<b>9579</b>	<b>96</b>	1	2	12	48	4	3	7	1	0	1	0	<b>79</b>
<b>8525</b>	<b>96,87</b>	0	7	6	32	31	20	20	5	5	2	2	<b>130</b>
<b>433</b>	<b>72,65</b>	0	1	7	16	20	13	3	4	3	2	0	<b>69</b>
<b>427</b>	<b>96</b>	1	4	3	16	29	12	3	2	0	5	0	<b>75</b>
<b>MÉDIA</b>		<b>0,25</b>	<b>4,375</b>	<b>12,125</b>	<b>43,125</b>	<b>45,125</b>	<b>22,875</b>	<b>9,625</b>	<b>5,5</b>	<b>2,375</b>	<b>2,25</b>	<b>0,75</b>	<b>1187</b>

Quadro 6 (b) – Efeito biológico no número de teleóginas desprendidas de animais do grupo 1,0mg em estábulo. O primeiro dia de desprendimento corresponde ao 19º dia pós infestação artificial com larvas de *B. microplus*. O grau de sangue indicado se refere à relação holandês/zebu (H/Z), de acordo com registros da EMBRAPA-CNPGL. Os animais 9517 e 465 estiveram em uma única baia.

#### Grupo 1,0mg

Animais/dia	Grau de sangue (%)	Dias de desprendimento											TOT AL	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
<b>9517+</b>	<b>73,43</b>													
<b>465</b>	<b>86,71</b>	0	4	19	28	33	7	2	18	3	3	2	<b>119</b>	
<b>429</b>	<b>96</b>	0	6	20	48	60	9	5	2	2	6	1	<b>159</b>	
<b>9576</b>	<b>96,87</b>	0	11	9	46	44	30	10	2	0	2	0	<b>154</b>	
<b>9558</b>	<b>95,3</b>	0	2	4	6	9	7	5	3	0	2	0	<b>38</b>	
<b>9497</b>	<b>93,75</b>	1	13	30	47	48	19	6	1	2	2	0	<b>169</b>	
<b>9582</b>	<b>96,87</b>	1	1	1	4	7	3	2	0	0	0	0	<b>19</b>	
<b>415</b>	<b>93,75</b>	6	27	31	37	45	18	8	9	3	3	1	<b>188</b>	
<b>9493</b>	<b>93,75</b>	3	23	20	57	52	35	11	10	2	5	0	<b>218</b>	
<b>MÉDIA</b>		<b>1,37</b>	<b>10,87</b>	<b>16,75</b>	<b>34,1</b>	<b>37,2</b>	<b>16</b>	<b>6,1</b>	<b>5,6</b>	<b>1,5</b>	<b>2,87</b>	<b>0,5</b>	<b>1064</b>	

Quadro 6 (c) – Efeito biológico no número de teleóginas desprendidas de animais do grupo 2,0mg em estábulo. O primeiro dia de desprendimento corresponde ao 19º dia pós infestação artificial com larvas de *B. microplus*. O grau de sangue indicado se refere à relação holandês/zebu (H/Z), de acordo com registros da EMBRAPA-CNPGL. Os animais 414 e 425 estiveram em uma única baia.

#### Grupo 2,0mg

animais/dia	Grau de sangue (%)	Dias de coleta											TOTAL
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<b>414+</b>	<b>86,7</b>												
<b>425</b>	<b>84,67</b>	0	3	16	52	36	29	2	6	2	2	0	<b>148</b>
<b>9522</b>	<b>93,75</b>	1	0	0	6	3	3	4	4	0	1	0	<b>22</b>
<b>9540</b>	<b>96,87</b>	0	1	2	18	15	5	2	1	1	2	0	<b>47</b>
<b>9567</b>	<b>95,3</b>	0	3	2	28	24	7	8	1	0	0	0	<b>73</b>
<b>400</b>	<b>93,75</b>	0	0	14	9	14	16	6	0	0	2	0	<b>61</b>
<b>9554</b>	<b>73,43</b>	0	3	3	13	18	7	2	3	1	2	0	<b>52</b>
<b>9492</b>	<b>86,3</b>	0	0	15	18	19	11	5	8	2	1	0	<b>79</b>
<b>424</b>	<b>93,75</b>	0	0	0	40	44	38	9	3	1	0	2	<b>137</b>
<b>MÉDIA</b>		<b>0,125</b>	<b>1,25</b>	<b>6,5</b>	<b>23</b>	<b>21,62</b>	<b>14,5</b>	<b>6,56</b>	<b>3,25</b>	<b>0,87</b>	<b>1,25</b>	<b>0,25</b>	<b>619</b>

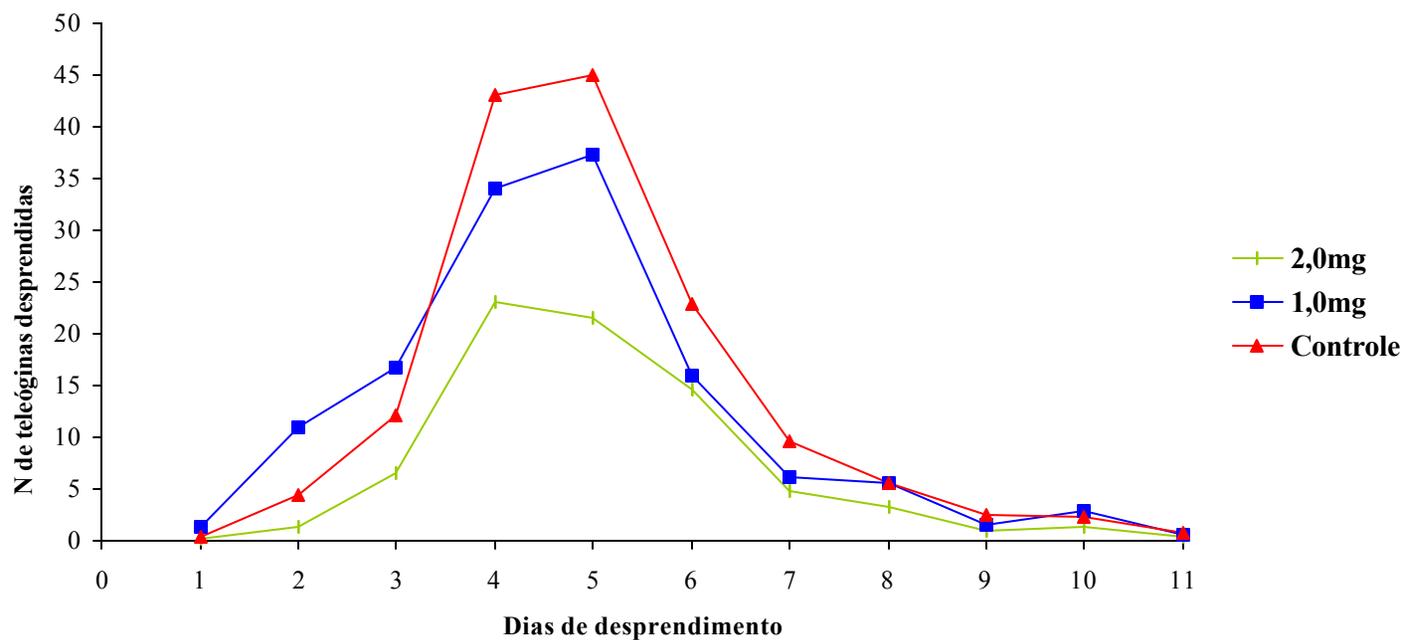


Figura 4 – Efeito biológico sobre o número de teleóginas desprendidas de animais inoculados com SBm7462 em teste de estábulo. O primeiro dia de desprendimento correspondeu ao 19º dia pós infestação artificial com larvas de *B. microplus*. O dia modal da queda de teleóginas corresponde ao 21º dia pós infestação.

- Quanto ao peso das teleóginas, não houve diferença estatística entre os grupos vacinais e controle. Já em relação ao peso dos ovos pode-se verificar que os grupos controle e 1,0mg são estatisticamente iguais, porém ambos diferentes ao grupo 2,0mg ( $p < 0,05$ ). Esses achados indicam que a ação do imunógeno interfere na relação direta de que o peso dos ovos é proporcional ao peso das teleóginas descrita por DE LAVEGA (1976), corroborando que a resposta imune induzida pelo peptídeo sintético SBm7462 atua de forma evidente na performance reprodutiva do *B. microplus*;
- Na relação larvas/grama de ovos, nota-se também uma maior redução de larvas entre os grupos vacinais, em especial no grupo 2,0mg, quando comparado com o controle;
- A eficiência do SBm7462 foi de 15,8% para a dose de 1,0mg e de 53,29% para a dose de 2,0mg, chegando a um nível equiparado às vacinas recombinantes para *B. microplus*, considerando a dose de 2,0mg.

O peptídeo SBm7462 se mostra como um bom imunógeno estimulando uma produção de anticorpos que, por sua vez, interage com as células intestinais do parasita promovendo alterações em vários aspectos biológicos, principalmente na redução do número de teleóginas e redução da fertilidade dos ovos provenientes de carrapatos de bovinos inoculados. A interação dos anticorpos induzidos pelo peptídeo sintético nas estruturas celulares do intestino do *B. microplus* pode ser evidenciada por imunofluorescência ou imunoperoxidase e os danos celulares podem ser vistos em cortes histológicos de carrapatos provenientes de animais imunizados (PORTELA, 2000)

O quadro 7 mostra uma comparação entre este experimento misto e diversos experimentos realizados com antígenos recombinantes e sintéticos baseados na estrutura da Bm86 com animais em isolamento e em condições de desafio programado.

Quadro 7 – Comparação dos resultados obtidos neste experimento com resultados obtidos por PORTELA (2000), usando peptídeo sintético e por RODRIGUEZ, *et al.* (1994), PENICHET, *et al.* (1994), FRAGOSO, *et al.* (1995) e MASSARD, *et al.* (1995), usando a Bm86 recombinante.

Experimento	Amostra (origem)	Raça	Eficácia (%)
1	Porto Alegre (Brasil)	Holandês	53,29
2	Viçosa 1 (Brasil)	Jersey	81,05
3	Camcord (Cuba)	Holandês	76
4	Camcord (Cuba)	Holandês	91
5	Yeerongpilly (Austrália)	Holandês	75
6	Cenapa (México)	Holandês	84
7	Tuxpan (México)	Holandês	51
8	Tuxpan (México)	Aberdeen angus	56
9	Mora (México)	Aberdeen angus	58
10	Amostra de campo (Brasil)	Jersey	51

<sup>1</sup> – Resultados obtidos neste experimento com peptídeo sintético SBm7462 em animais estabulados e a campo.

<sup>2</sup> – PORTELA (2000), utilizando peptídeo sintético SBm7462, em estábulo.

<sup>3</sup> – RODRIGUEZ, *et al.* (1994), em estábulo.

<sup>4, 5, 6, 7</sup> – PENICHET, *et al.* (1994), em estábulo.

<sup>8, 9</sup> – FRAGOSO, *et al.* (1995), em estábulo.

<sup>10</sup> – MASSARD, *et al.* (1995), em estábulo.

A eficácia do peptídeo SBm7462 em estábulo se mostra superior à maioria dos testes realizados com rBm86 na mesma situação, exceto quando comparado ao teste com as amostras Camcord e Cenapa, em bovinos da raça holandesa (PENICHET, *et al.*, 1994). Já os resultados deste trabalho evidenciam que o peptídeo sintético produz uma resposta imune protetora contra o *B. microplus*, mesmo sob as condições de estresse devidas ao manejo, com uma eficácia equiparada aos demais ensaios com rBm86 sob condições apenas de estábulo.

Os resultados de análise biológica e a eficiência do imunógeno neste trabalho não chegam ao nível encontrado por PORTELA (2000), utilizando o SBm7462 em Jersey confinados, o que pode ser justificado por vários fatores como:

- a) A raça utilizada no presente experimento (holandesa) é, segundo WHARTON e NORRIS (1980), UTECH *et al.* (1978) e LEMOS (1986) considerada naturalmente muito sensível ao *B. microplus*, ao contrário da raça Jersey; RODRIGUEZ *et al.* (1995) relatam uma menor infestação natural média em bovinos da raça Jersey quando em comparação com outras raças, além de um número de teleóginas menor quando utilizado a rBm86 como imunógeno.
- b) As condições de estresse na qual os animais do presente experimento estavam submetidos poderiam levar a uma menor performance imunológica ou protetora, devido a condições climáticas, parasitismo por ecto e endoparasitas, vacinações diversas e manejo, concordando com SUTHERST *et al.*(1983) que afirmam que o bom desempenho imunológico do hospedeiro do *B. microplus* depende da raça envolvida, idade, estado nutricional e carga parasitária de outros parasitas concomitantes;
- c) Neste trabalho fez-se o uso de uma outra cepa de carrapatos (“Porto Alegre”), até então não testada com peptídeos sintéticos, que pode apresentar uma sensibilidade diferente quanto ao imunógeno. COBON *et al.* (1995), GARCIA-GARCIA *et al.* (1999) e DE LA FUENTE *et al.* (2000) citam que existem diferenças de eficácia da rBm86 quando testada em cepas de carrapatos diferentes em diversas regiões do mundo, não se sabendo desta possibilidade para antígenos sintéticos, até então. Diferenças morfológicas entre diversas cepas de carrapatos são comuns, especialmente com respeito ao peso da fêmea ingurgitada (0,18g para a cepa Yerongpilly, australiana; 0,19g para a cepa Camcord, cubana; 0,33g para a cepa Tuxpan, mexicana e 0,34g para a cepa Cenapa, também mexicana) (PENICHET, *et al.*, 1994), indicando uma possível diferença genética. Em amostras mexicanas, australianas, cubanas, argentinas e venezuelanas, GARCIA-GARCIA, *et al.* (1999) mostram que há sugestões de se fazer uma relação inversa entre a eficácia da vacinação com Bm86 e a sequência de

variação no *locus* da Bm86 com um  $R^2=0,7$  e que o grau de mutação nesse *locus* está entre 0,02 a 0,1 aminoácidos por ano.

Neste trabalho, o animal 9550 (grupo 2,0mg) não apresentou resposta imunológica quanto ao número de carrapatos desprendidos em estábulo. PORTELA (2000) também verificou um dos animais não reagente. A mais provável explicação seria a da característica polimórfica dos genes que codificam as moléculas do MHC, fundamentais para a apresentação de antígenos e do reconhecimento do próprio e não-próprio (HUGHES e YEAGER, 1998).

Tendo em conta a diferença no número de teleóginas por animal que se apresentou neste experimento, o que concorda com dados de outros experimentos (MORA HERNÁNDEZ, 1996), se tem o fator mais difícil ao se analisar uma vacina para carrapatos, pois, mesmo em graus de sangue próximos, os animais podem apresentar número de carrapatos diferentes. Neste trabalho, poder-se-ia ter uma maior homogeneidade entre os grupos se os animais fossem separados, no início do experimento, pela carga parasitária e não pelo peso, como foi feito.

Os resultados obtidos no presente experimento reforçam o fato que o peptídeo sintético SBm7462 apresenta-se como um bom candidato a imunógeno para o controle de *B. microplus*, todavia, para um melhor aproveitamento dos antígenos sintéticos de carrapatos deve-se utilizar em conjunto técnicas de manejo de raças mais resistentes e de boa produção.

Os antígenos para *B. microplus*, de um modo geral, não vêm eliminar o uso de carrapaticidas, mas permitir um maior intervalo de aplicação desses produtos (MASSARD *et al.*, 1995) e diminuição da população de carrapatos no decorrer dos anos, chegando a um nível de parasitismo com um mínimo de perdas econômicas. Além do mais, a eficácia desses imunógenos está diretamente ligada a fatores como condições climáticas, raças de bovinos utilizados, amostras de carrapatos e densidade, manejo, pasto e uso ou não de acaricidas associados (DE LA FUENTE, 1995) e que a imunidade deve ser vista como uma imunidade de rebanho e não individual para que se tenha sucesso (COBON, *et al.*, 1995).

Cabe lembrar que as boas respostas de memória imunológica aos peptídeos sintéticos demonstradas pela alta produção de IgG em um curto intervalo de tempo após revacinação com peptídeo sintético (PORTELA *et al.*

1999) corroboram para um maior sucesso do controle imunológico do *B. microplus* no decorrer de inoculações periódicas promovendo uma maior redução da população de carrapatos no decorrer dos anos em um programa de controle.

A redução na quantidade de teleóginas, no peso destas, no peso dos ovos e na eclodibilidade e suas interações por fórmulas matemáticas, como parâmetros para avaliar vacinas contra carrapatos, segue a proposta de WILLADSEN *et al.* (1989), preconizada também por AGBEDE e KEMP (1986) e DE LA FUENTE (1995). As alterações destacadas acima sobre os parâmetros da fase não parasitária também foram observadas em diversos outros experimentos, seja da utilização de proteína Bm86 nativa purificada (JOHNSTON *et al.*, 1986; OPDEBEECK *et al.*, 1988 e WILLADSEN *et al.*, 1989), Bm86 recombinante (RODRIGUEZ *et al.*, 1994 e MORA HERNÁNDEZ, 1996) e peptídeos sintéticos baseados na estrutura da Bm86 (OLIVEIRA, 1998; PORTELA, 2000).

A principal hipótese para a causa das alterações nos parâmetros biológicos 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 linfocinas, com as proteínas de membrana das células digestivas, reduzindo a capacidade digestiva do carrapato, seu ingurgitamento e conseqüente conversão de componentes sangüíneos em vitelogenina (BALASHOV, 1972; SONENSHINE, 1991b). A vitelogenina é o principal componente dos ovos, sendo a substância responsável pela nutrição do embrião e da larva. A falta desse componente básico dos ovos seria então o principal fator de diminuição do peso dos ovos e da eficiência de eclodibilidade.

##### **5.5. Análise de sobrevivência de larvas de *Boophilus microplus* provenientes de animais inoculados com peptídeo sintético SBm7462 a campo**

A análise de sobrevivência das larvas é um dos aspectos menos estudados quando se analisam vacinas contra carrapatos, mas que tem uma importância grande ao se levar em conta que um imunógeno para o *B. microplus* tem como finalidade a redução do número de carrapatos nas gerações subsequentes, não somente pela redução do número de teleóginas e no número de

ovos, como também de uma redução na fertilidade desses ovos. MORA HERNÁNDEZ (1996) comparou a taxa de sobrevivência de larvas, em condições controladas, provenientes de carrapatos de animais vacinados a campo com a Bm86 recombinante (Gavac<sup>TM</sup>) e verificou que as larvas das colônias testes perdem viabilidade de infestação a partir da quinta semana de eclosão, com mortalidade crescente a partir da sexta semana, conseguindo sobreviver entre 58 e 63 dias, em contraste aos 160 dias do grupo controle.

Os dados de sobrevivência de larvas nas pastagens podem ser vistos no Quadro 8.

Quadro 8 - Análise de sobrevivência de larvas de *Boophilus microplus*, aos 60 dias, provenientes de animais inoculados com SBm7462 nas pastagens.

ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS NAS PASTAGENS				
Tempo	Grupo	Peso de ovos (n de larvas)	N de larvas vivas	% mortalidade
60 dias	Controle	0,1g (2000 larvas)	767	61,65
	1,0mg	0,1g (2000 larvas)	545	72,75
	2.0mg	0,1g (2000 larvas)	510	74,5

Pelos presentes dados, não se pôde fazer uma análise estatística pelo pequeno número de amostras, embora se verifique uma porcentagem de mortalidade de 61,65% para o grupo controle, 72,75% para o grupo 1,0mg e de 74,5% para o grupo 2,0mg ao final dos 60 dias.

A possível explicação para a redução na sobrevivência das larvas dos grupos vacinados está na associação entre as condições climáticas, concordando com HITCHCOCK (1955b), LONDT (1975), CORDOVÉS (1997) e FURLONG (1998), os quais citam que a fase não-parasitária sofre enorme influência das condições ambientais e, possivelmente, na ação de anticorpos sobre a superfície das células intestinais, uma vez que os ovos são mais susceptíveis a desidratação e a ação dos antígenos escondidos devido à restrição da ingestão de partícula heme, essencial para o desenvolvimento dos oócitos (MORA HERNÁNDEZ, 1996).

As condições climáticas, nas quais as larvas estavam submetidas, se referem aos meses de abril e maio de 2001, favorável à sobrevivência larval, como se pode ver no quadro 3.

WILLADSEN (1997) cita que a Bm86 está presente em larvas, ninfas e adultos de *B. microplus*; PORTELA (2000) relata o reconhecimento por soros provenientes de animais imunizados com SBm7462 em estruturas do saco vitelino de larvas de *B. microplus* através de testes imunohistoquímicos. Esses achados fortalecem a hipótese de uma interação entre os anticorpos elicitados e estruturas internas de larvas de *B. microplus* reforçando uma ação deletéria sob a viabilidade das larvas a campo, o que pode justificar um menor número de teleóginas nos grupos vacinados.

## 6 – CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste experimento, pode-se concluir que:

As condições de estresse ambiental a campo não interferiram na geração de uma resposta imune induzida pelo peptídeo sintético SBm7462 nos bovinos.

O peptídeo sintético foi capaz de induzir uma resposta imune protetora contra a amostra “Porto Alegre” de *Boophilus microplus* em bovinos da raça holandesa em teste misto.

O número de teleóginas desprendidas dos grupos vacinados foi menor que do grupo controle.

As teleóginas provenientes de animais imunizados com o peptídeo SBm7462 realizam menor ovopostura.

A taxa de eclodibilidade dos ovos provenientes de teleóginas dos grupos vacinados foi menor do que a de teleóginas provenientes de animais do grupo controle.

A dose de 2,0mg se mostrou mais protetora que a de 1,0mg.

A eficácia do peptídeo sintético SBm7462, considerando os parâmetros biológicos do *Boophilus microplus* nos grupos testados, foi de 53,29% para a dose de 2,0mg e de 15,8% para a dose de 1,0mg.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K. **Celular and molecular immunology**. Philadelphia: Saunders, 494p., 1997.
- ACKERMAN, S., FLOYD, M., SONENSHINE, D. E. Artificial immunity to *Dermacentor variabilis* (Acari: ixodidae): vaccination using tick antigens. **J. Med. Entomol.**, v.17, n.5, p.391-397, 1980.
- AGBEDE, R.I., KEMP, D. H. Digestion in the cattle tick *Boophilus microplus*: Light microscope study of the gut cells in nymphs and females. **Int. J. Parasitol.** , v. 15, p.147-157, 1985.
- ALGER, N. E., CABRERA, E. J. A increase in death rate of *Anopheles stephensi* fed on rabbits immunized with mosquito antigen. **J. Econ. Entomol.**, v.65, n.1, p.165-168, 1972.
- ALLEN, J. R. Host resistance to ectoparasites. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** , v. 13, n. 4, p.1287-1303, 1994.
- ALLEN, J. R., HUMPHREY, S. J. Immunization of guinea-pigs and cattle against ticks. **Nature**, v.,280, n.5722, p.491-493, 1979.
- ALVARADO, R. U., GONZALES, J. C. A postura e a viabilidade do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae) em condições de laboratório. **Rev. Lat-amer. Microbiol.**, v. 21, p. 31-36, 1979.
- ARTHUR, D. R. **Ticks. A monograph of the Ixodidea. On the genera Dermacentor, Anocentor, Cosmiomma, Boophilus e Margaporus** . London: Cambridge University Press, 215p., 1960.

- AUDIBERT, F., JOLIVET, M., CHEDID, L., ARNON R., SELA M. Successful immunization with a totally synthetic diphtheria vaccine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 5042-506, 1982.
- BALASHOV, I. S. **Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure** Amer: ESA Press, 432p., 1972.
- BARRIGA, O. O. A review on vaccination against protozoa and arthropods of veterinary importance. **Vet. Parasitol.**, v.55, n.1-2, p.29-55, 1994.
- BERZOFISKY, J. A. Progress toward an artificial vaccine for HIV: identification of helper and cytotoxic T-cell epitopes and methods of immunization. **Biotechnol. Ther.**, v. 2, p. 123-135, 1991.
- BILLINGSLEY, P. F. Vector-parasite interactions for vaccine development. **Int. J. Parasitol.**, v. 24, n. 1, p. 53-58, 1994.
- BITTENCOURT, V. R. E. P., MASSARD, C. L., LIMA, A. F. The use of fungal *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, on the control of tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arq. Univ. Fed. Rur. R. de J.**, v.15, p.197-202, 1992.
- BONA, C. A., CASARES, S., BRUMEANU, T., D. Towards development of T-cell vaccines. **Immunol. Today**, v. 19, n. 3, p.126-132., 1998.
- BOUE, O., REDONDO, M., MONTERO, C., RODRIGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. Reproductive and safety assessment of vaccination with Gavac against the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Theriogenology**, v. 51, n. 8, p.1547-1554, 1999.
- BRACHMANN, M. F., KOPF, M. The role of B cells in acute and chronic infections. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, p. 332-339, 1999.
- BRANCO, F. P. A., PINHEIRO, A. C., MACEDO, J. B. R. Efeito da infestação pelo carrapato *Boophilus microplus* no desenvolvimento ponderal das raças Hereford e Ibagé. **Coletânea de Pesquisas EMBRAPA/CNPO**, p. 229-234, 1987.
- BRASÍLIA. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. **Carrapato, berne e bicheira no Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura, 153p., 1985.
- BROSSARD, M., WIKEL, S. K. Immunology of interactions between ticks and hosts. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 7, p. 5-13, 1989.
- BROSSARD, M. Immunologic relations between cattle and ticks, specifically between cattle and *Boophilus microplus*. **Acta Trop.**, v.33, n.1, p.15-36, 1976.
- BROWN, W.C., RICE-FICHT, A.C., ESTES, D.M. Bovine type 1 and type 2 responses. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.63, p. 45-55, 1998.

- BROWN, W.C., ZHAO, S., WOODS, V.M., DOBBELAERE, D.A.E., RICE-FIGHT, A.C. *Babesia bovis*-specific CD4+T cell clones from immune cattle express either the Th0 or Th1 profile of cytokines. **Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v. 46, n. 1-2, p. 65-69, 1993.
- BUXTON, D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. **Parasitol. Today**, v. 9, p. 335-337, 1993.
- 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.
- CHOU, P. Y., FASMAN, G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v.47, p. 45-148, 1978
- COBON, G. S., WILLADSEN, P. Vaccines to prevent cattle tick infestations. In: WOODROW, G. C., LEVINE, M. M. **New generation vaccines**. New York: Marcel Dekker, p.910-917., 1990.
- COBON, G., HUNGERFORD, WOODROW M., SMITH, D., WILLADSEN, P. Vaccination against *Boophilus microplus*: the Australian field experience. **Recombinant Vaccines for the control of cattle tick**. Habana: Elpos Scientiae, 280 p., 1995
- CORDOVÉS, C. O. **Carrapato: Controle ou erradicação**. Guaíba: Agropecuária, 1997.
- CORDOVÉS, C. O., CRUZ, J. DE LA, TAMAYO, S., MESEJO, J., FEITES, R. Experiências y perspectivas del control y erradicación de la garrapata en la república de Cuba. **Rvta. Cub. Cienc. Vet.** v. 17 n. 1-2, p.1-3, Havana, Cuba, 1986.
- CORY, S. Regulation of lymphocyte survival by the *bcl-2* gene family. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 513-544, 1995.
- COX F.E. Designer vaccines for parasitic diseases. **Int. J. Parasitol.**, v.27, p 1147-1157, 1997.
- DA SILVA, V. I. JR., LOGULLO, C., SORGINE, M., VELLOSO, F. F., ROSA DE LIMA, M. F., GONZALES, J. C., MASUDA, H., OLIVEIRA, P. L., MASUDA, A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 66, n.3-4, p. 331-341, 1998.

- D'ALESSANDRO U., LEACH A., DRAKELEY C. J., BENNETT S., OLALEYE B. O., FEGAN G. W., JAWARA M., LANGEROCK P., GEORGE M. O., TARGETT G. A. Efficacy trial of malaria vaccine SPf66 in Gambian infants. **Lancet**, v. 346, p.462-467, 1995.
- DALSGAARD, K., HILGERS, L., TROUVE, G. Classical and new approaches to adjuvant use in domestic food animals. In: SCHULTZ, R. D. **Vet. Vaccines and Diagnostics**. London: Academic Press, 820 p., 1999.
- DALTON, J. P., MULCAHY, G. Parasite vaccines – a reality? **Vet. Parasitol.**, 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. **Vet. Parasitol.**, 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. **Vet. Parasitol.** v. 99, p. 41-52, 2001.
- DA SILVA VAZ, I., JR., LOGULLO, C., SORGINE, M., VELLOSO, F. F., ROSA DE LIMA, M. F., GONZALES, J. C., MASUDA, H., OLIVEIRA, P. L., MASUDA, A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 66, n.3-4, p. 331-341, 1998.
- DE LA FUENTE, J. **Recombinant vaccines for the control of cattle tick**. Habana: Elpos Scientiae, 280 p., 1995.
- DE LA FUENTE, J., RODRÍGUEZ, M., GARCIA-CARCIA, J. C. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 916, p.617-621, 2000.
- DE LA VEGA, R. Contribución al estudio de la biología de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) en Cuba. **Acad. Ci. Cuba. Ser. Biol.**, v. 64, p. 1-8, 1976.
- DE VOS, S., ZEINSTRA, L., TAOUFIK, O., WILLADSEN, P., JONGEJAN, F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other ticks species. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 25, n. 3, p. 245-261, 2001.
- DOLAN, T. T. Control of East Coast Fever. **Parasitol. Today**, v.3, p. 3-6, 1987
- ESTES, D.M., HIRANO, A., HEUSSLER, V.T., DOBBELAERE, D.A.E., BROWN, W.C. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of

- recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation *in vitro*. **Cell. Immunol.**, v. 163, p. 268-279, 1995.
- ESTRADA-PENÑA, 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. **Vet. Parasitol.** 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.
- FIVAZ, B. H., NORVAL, A. Immunological responses of the rabbit host to infestation by the brown ear tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 9, p. 219-238, 1990.
- FLOYD, R. B., SUTHERST, R. W., HUNGERFORD, J. Modelling the field efficacy of a genetically engineered vaccine against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Int. J. Parasitol.**, v. 25, n. 3, p.285-291, 1995.
- FRAGOSO, H., ORTIZ, M. RODRIGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. Evaluation of the efficacy of the recombinant vaccine (Gavac™) in cattle artificially infested with *Boophilus microplus* (Can). **Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick**. Habana: Elpos Scientiae, 280 p., 1995
- FURLONG, J. Carrapato dos bovinos: Conheça bem para controlar melhor. **Circular Técnica Embrapa**, v. 46, 1998.
- 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.
- GALUN, R. Research into alternative arthropod control measures against livestock pests (Part I). **Workshop on the ecology and control of external parasites of economic importance on bovines in latin America**. Colombia: Centro International de Agricultura Tropical (CIAT), p.155-161, 1975.
- GARCIA-GARCIA, J. C., GONZALEZ, I. L., GONZALEZ, D. M., VALDES, M., MENDEZ, L., LAMBERTI, J, D’AGOSTINO, B., CITRONI, D., FRAGOSO, H., ORTIZ, M., RODRIGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. Séquense variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 23, n. 11, p.883-895, 1999.

- GARCIA-GARCIA, J. C., MONTERO, C., REDONDO, M. VARGAS, M., CANALES, M., BOUE, O., RODRIGUEZ, M. JOGLAR, M., MACHADO, H., GONZALEZ, I. L., VALDES, M., MENDEZ, L., DE LA FUENTE, J. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 18, n. 21, p.2275-2287, 2000.
- GOUGH, J. M., KEMP, D. H. Localization of a low abundance membrane protein (bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labelling. **J. Parasitol**, v. 79, p. 900-907, 1993.
- GREEN, P. E. An unusual host for *Boophilus microplus*. **Aust. Vet. J.** , v. 47, p. 179-180, 1971.
- 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.
- GUIMARAES, 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. **Parasitol. Res.**, v. 84, p. 69-74, 1998.
- HASHEMI-FESHARKI, R. Control of *Theileria annulata* in Iran. **Parasitol. Today**, v. 4, p. 36-40, 1988.
- HILBURN, L. R., DAVEY, R. B. Test for assortative mating between *Boophilus microplus* and *B. anullatus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 29, n. 4, p. 690-697, 1992.
- HITCHCOCK, L. F. Studies on the non-parasitic stages of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). **Aust. J. Zool.**, v. 3, p. 295-311, 1955a.
- HITCHCOCK, L. F. Studies on the parasitic stages of the cattle ticks, *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). **Aust. J. Zool.**, v. 3, p. 145-155, 1955b.
- HOOGSTRAAL, H. Argasidae and nutaeliellidae ticks as parasites and vectors. **Adv. Parasit.**, v. 24, p. 136-220, 1985
- HOOP, T. P., WOODS, K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. 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 Vet.**, v.4, n.1, p.12-32, 1985.
- HOWARD, C. J., COLLINS, R. A., SOPP, P., BROOKE, G. P., KWONG, L. S., PARSONS, K. R., WEINANTS, V., LETESSON, J. J., BEMBRIDGE, G. P. T-cell

- responses and the influence of dendritic cells in cattle. **Adv. Vet. Med.**, v. 41, p.275-288, 1999a.
- HOWARD, C. J., BROOKE, G. P., WERLIN, D., SOPP, P., HOPE, J. C., PARSONS, K. R., COLLINS, R. A. Dendritic cells in cattle: phenotype and function. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 72, p.119-124, 1999b.
- HUGHES A. L., YEAGER M. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. **Annu Rev Genet**, v. 32, p.415-435, 1998.
- HUNGEFORD, J., PULGA, M., ZWITSCH, E. Efficacy of TickGard in Brazil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, **Proceedings...**, Acapulco, p. 139., 1995.
- INOKUMA, H., KERLIN, R.L., KEMP, D.H., WILLADSEN, P. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. **Vet. Parasitol.**, v.47, n.1-2, p.107-118, 1993.
- 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.
- JOHNSON, K. S., HARRISON, G. B. L., LIGHTOWLERS, M. W., HOY, K. L., COUGLE, W. G., DEMPSTER, R. P., LAWRENCE, S. B., VINTON, J. G., HEATH, D. D., RICKARD, M. D. Vaccination against ovine cysticercosis using a recombinant antigen. **Nature**, v. 338, p. 585-587, 1989.
- JOHNSTON, L. A., KEMP, D. H., PEARSON, R. D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on ticks populations. **Int. J. Parasitol.**, v.16, n.1, p.27-34, 1986.
- JONES T. R., HOFFMAN S. L. Malaria vaccine development. **Clin Microbiol Rev**, v.7, p.303-310, 1994.
- 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. **Vet. Parasitol**, v. 78, p. 65-77, 1998.
- KAUFMAN, W. R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitol. Today**, v. 5, p. 47-56, 1989.
- KEMP, D. H., AGBEDE, R. I.S., JOHNSTON, L. A. Y.; GOUGH, J. M. immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts deriver from adult female ticks: feeding and survival of parasite on vaccinated cattle. **Int. J. Parasitol.**, 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*. **Vet. Parasitol.**, v.52, n.1-2, p.61-70, 1994.
- KLIPSTEIN, F. A., ENGERT, R. F., HOUGHTEN, R. A. Immunisation of volunteers with a synthetic peptide vaccine for enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Lancet**, v.1, n.8479, p.471-472, 1986.
- KYTE, J., DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **J. Mol. Biol.**, v.157, n.1, p.105-132, 1982.
- LABARTHE, N. V. Biological control of tick populations: review and reflections. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v.10, n.1, p.47-52, 1994.
- LABRUNA, M. B., LEITE, R. C. Vacinas contra carrapatos. **Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG** v. 27, p. 27-42, 1999.
- LEE, R. P., OPDEBEECK, J. P. Antigens identified by monoclonal antibodies in tissue sections of *Boophilus microplus*. **Int. J. Parasitol.**, v. 25, p. 241-248, 1994.
- LEMOS, A. M. A resistência genética dos bovinos e controle do carrapato. **EMBRAPA –CNPGL**, Documentos, n.6, 42p, 1986.
- LIGHTOWLERS, M. W., FLISSER, A. GUACI, C. G., HEATH, D. D., JENSEN, O., ROLFE, R. Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. **Parasitol. Today**, v.16, p.191-196, 2000.
- LIPA, J. J. Microbial control of mites and ticks. In: BURGESS, H. D., HUSSEY, N. W. **Microbial control of insects and mites**. 2.ed. London: Academic, p.357-374, 1971..
- 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. **Prev. Vet. Med.**, v.38, p 47-63, 1999.
- LONDT, J. G. H. A rapid spectrophotometric method for the monitoring of embryonic development in ticks (Acarina: Ixodidae). **Onder. J. Vet. Res.**, v. 42 p. 103-108, 1975.
- LONDT, J. G. H. The peroviposition period of *Boophilus decoloratus* (Koch, 1844) (Acarina: Ixodidae). **J. Ent. Soc. Sth. Afr.**, v.37, p 405-412, 1974.
- LUNDÉN, A., BENGTSSON, K. L., SJÖLANDER, A., UGLLA, A. Iscoms in parasitological research. **Parasitol. Today**. v. 12, n. 8, p.320-323, 1996.
- MARTINOD, S. Vaccination practices in Veterinary Medicine: Standardization versus tailored to needs? In: SCHULTZ, R. D. **Veterinary Vaccines and Diagnostics**. London: Academic Press, 820p., 1999.

- MASSARD, C. L., FONSECA, A. H., BITTENCOURT, V. R. E. P., SILVA, K. M. M. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm86 "GAVAC™" contra o carrapato *B. microplus* no Brasil. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.17, n.4, p.167-173, 1995.
- McGUIRE, T.C., MUSOKE, A.J., KURTTI, T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. **Immunology**, v. 38, p. 249-256, 1979.
- MCKENNA, R. V., RIDING, G. A., JARMEY, J. M., PEARSON, R. D., WILLADSEN, P. Vaccination of cattle against the *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. **Parasit. Immunol.**, v. 20, p. 325-336, 1998
- MELNICK J. L. Virus vaccines: 1986 update. **Prog. Med. Virol.**,v. 33, p. 134-170, 1986.
- MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v.85, p.2149, 1963.
- MORA HERNÁNDEZ, C. A. **Avaliação a campo do imunógeno recombinante rBm 86 no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) no Brasil.** Dissertação (doutorado). Rio de Janeiro: UFRRJ, 100p., 1996.
- MORA HERNÁNDEZ, C. A., MASSARD, C. L., FONSECA, A. H., SOARES, C. O., COSTA, F. A. Avaliação da infestação de carrapatos a campo em bovinos vacinados com o imunógeno recombinante Bm86. **R. Bra. Med. Vet.**, v. 20, n. 4, p.165-168, 1998.
- MORA HERNÁNDEZ, C. A., MASSARD, C. L., SOARES, C. O. FONSECA, A. H. Influência do antígeno vacinal rBm86 sobre os parâmetros biológicos da fase não-parasitária do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **R. Bras. Ci. Vet.**, v. 6, n.1, p. 26-30, 1999.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIELDIN, M.A., COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cel clone: I. Definition according two profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, p. 2348-2357, 1986.
- 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. **Aust. Vet. J.**, v.43, n.9, p.389-394, 1967.
- NEWTON, S. E., MUNN, E. A. The development of vaccines against gastrointestinal nematodes, particularly *Haemoncus contortus*. **Parasitol Today**, v.15, p.116-122, 1999.

- NUÑEZ, J. L., MUÑOZ, C. M. E., MOLTEDO, H. L. ***Boophilus microplus: La Garrapata Común del Ganado Vacuno***. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1982. 184p.
- NUSSENZWEIG V., NUSSENZWEIG, R. S. Experimental basis for the development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria sporozoites. **Ciba Found Symp.**, v.119, p.150-163, 1986.
- NUTTAL, G. H. F. Symptoms following tick-bites in man. **Parasitology**, v.4, p.89-93, 1911.
- 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.
- OPDEBEECK JP, SLACEK B. An attempt to protect cats against infestation with *Ctenocephalides felis felis* using gut membrane antigens as a vaccine. **Int J Parasitol**, v. 23, p. 1063-1067, 1993
- OPDEBEECK, J. P., WONG, J. Y. M., JACKSON, L. A., DOBSON, C. Vaccines to protect Hereford cattle against the tick, *Boophilus microplus*. **Immunol.**, v.63, n.3, p.363-367, 1988.
- OSBURN, R.L., KNIPLING, E. F. The potencial use of sterile hybrid *Boophilus* tick (acari: Ixodidae) as a supplemental eradication technique. **J. Med. Entomol.**, v.19, n.6, p.637-644, 1982.
- PASSOS, L.M.F. **Immunological studies on bovine babesiosis with particular reference to Brazil, using "in vitro" culture-derived antigens**. Dissertação (PhD.). Edinburgh: Centre for Tropical Veterinary Medicine. 344p., 1993.
- 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., 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., 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., VARGAS, M. I. **Fatores de resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 9p., 1982.

- PATARROYO, M. E., AMADOR, R., CLAVIJO, P., MORENO, A., GUZMAN, F., ROMERO, P., TASCÓN, R., FRANCO, A., MURILLO, L. A., PONTÓN, G. A. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v.332, n.6160, p.158-161, 1988.
- PATARROYO, M. E., ROMERO, P., TORRES, M. L., CLAVIJO, P., MORENO, A., MARTINEZ, A., RODRÍGUEZ, R. GUZMAN, F. CABEZAS, E. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. **Nature**, v.128, p. 629-632, 1987.
- PEACOCK, R., POINTER, D. Field experience with a bovine lungworm vaccine. In: TAYLOR, A. E., MULLER, R. **Vaccines against parasites.**, Oxford: Blackwell, 148p., 1980
- PENICHER, 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 Immunol.**, v. 16, p.493-500, 1994.
- PEREIRA, M. C. ***Boophilus microplus* – revisão taxionômica e morfo-biológica.** Rio de Janeiro: Químico Divisão Veterinária, 1982.
- PORTELA, R. W. D. **Comparação experimental de três peptídeos sintéticos como imunógeno no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887).** Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV, 87p., 2000.
- PORTELA, R. W. D., OLIVEIRA, R. C., PATARROYO, J. H., PIMENTEL, J. C., PRATES, A. A. Memória imunológica em bovinos inoculados com imunógeno sintético anti *Boophilus microplus* (SBm4912). XI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. **Anais...** Salvador: CBPV, p. 72, 1999.
- POWELL, R. T., REID, T. J. Project for tick control. **Queensland Agric. J.**, v.3, p. 279-300, 1982.
- PURNELL, R. Vaccine against piroplasms. In: TAYLOR, A. E., MULLER, R. **Vaccines against parasites.**, Oxford, 148p. 1980.
- RAND, K. N., MOORE, T., SRISKANTHA, A., SPRING, K., TELLAM, R., WILLADSEN, P., COBON, S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.86, n.24, n.24, p.9657-9661, 1989.
- RENARD, G., GARCIA, J. F., CARDOSO, F. C., RICHTER, M. F., SAKANARU, J. A., OZAKI, L. S., TERMIGNONI, C., MASUDA, A. Cloning and functional

- expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. **Insect.. Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, n.11, p.1017-1026, 2000.
- REYNOLDS, S. R., DAHL, C. E., HARN, D. A. T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for *Schistosoma mansoni* experimental vaccine triose-phosphate isomerase. **J. Immunol.**, v.152, n.1, p.193-200, 1994.
- RIDLES, P. W., NOLAN, J. Prospects for the management of arthropod resistance to pesticides. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PARASITOLOGY, **Proceedings...**, Canberra, p. 679-687, 1986.
- RIEK, R. F. Factors influencing the susceptibility of cattle to tick infestation. **Aust. Vet. J.**, v. 13, p. 532-550, 1962.
- RIEK, R. F. Studies on the reaction of animals to infestations with ticks. V. Laboratory animals as hosts for the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). **Aust. J. Agric. Res.**, v. 10. , p. 614-619, 1959.
- RIEK, R. F. The cattle tick and tick fever. **Aust. Vet. J.**, v.41, p. 211-215, 1965.
- ROBINSON, K., BELLABY, T., CHAN, W. C., WAKELIN, D. High levels of protection induced by a 40-mer synthetic peptide vaccine against the intestinal nematode parasite *Trichinella spiralis*. **Immunology**, v.86, n.4, p.495-498, 1995.
- ROCHA, U. F. Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini). **Bol. Téc. Facul. Ciênc. Agr. Vet. Jaboticabal**, v.3, p.1-32, 1984.
- ROCHA, U. F., SERRA, O. P., GROCK, R., SERRA, R. G. Infestação natural de búfalos - *Bubalis bubalis* - dos estados de São Paulo e Minas Gerais por *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) e por *Anocentor nitens* (NEUMANN, 1897), Acari, Ixodidae. **Arq. Inst. Biol.**, v. 36, p. 197-199, 1969.
- RODRIGUEZ, M., MASSARD, C. L., FONSECA, A. H., RAMOS, N. F., MACHADO, H., LABARTA, V. DE LA FUENTE, J Effect of vaccination with a recombinant Bm 86 antigen preparation on natural infestation of *B. microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine**, v.13, n.18, p.1804-1808, 1995.
- RODRIGUEZ, M., RUBIERA, R., PENICHER, M., MONTESINOS, R., CREMATA, J., FALCON, V., SANCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOVÉS, C., VALDES, M., LEONART, R., HERRERA, L., DE LA FUENTE, J. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **J. Biothec.**, v.33, n.2, p.135-146, 1994.
- ROSE J. B., SLIFKO T. R. Giardia, Cryptosporidium, and Cyclospora and their impact on foods: a review. **J. Food Prot.**, v.62, p. 1059-1070, 1999

- ROWLANDS, D. J. Synthetic peptides in foot and mouth disease vaccine research. **Endeavour**, v.8, n.3, p.123-127, 1984.
- SAUER J.R., MCSWAIN J. L., BOWMAN A. S., ESSENBERG R. C. Tick salivary gland physiology. **Annu. Rev. Entomol.**, v.40, p. 245-267, 1995
- SCHLEIN, Y., LEWIS, C. T. Lesions in haematophagous flies after feeding on rabbits immunized with fly tissues. **Physiol. Entomol.**, v.1, p.55-59, 1976.
- SCHMIDT, M. A. Synthetic peptides: prospects for a pilli (fimbriae) - based synthetic vaccine. **Curr. Trop. Microbiol. Immunol.**, v.151, p.185-204, 1990.
- SHARMA R. L., BHAT T. K., DHAR D. N. Preliminary observations on the effect of *Dictyocaulus filaria* on the blood clotting time of sheep. **Vet. Res. Commun.** , v.12, p. 109-112, 1988
- SMITH, D. R., HUNGERFOD, J., WILLADSEN, J. **The development of TickGard - a commercial vaccine against the cattle tick *Boophilus microplus***. Indooroopilly: Biotec Australia-CSIRO, 17 p., 1995.
- SMITH, W. D. Prospects for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. **Int. J. Parasitol**, v. 29, p.17-24, 1999.
- SNOWBALL, G. J. Ecological observations on the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Aust. J. Agric. Res.**, v. 8, p. 394-413, 1957.
- SONENSHINE, D. **Biology of Ticks**. v. 1. New York: Oxford University Press., 447p., 1991a.
- SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks** v. 2. New York: Oxford University Press, 465p., 1991b.
- SPOUGE, J. L., GUY, H.R., CORNETTE, J. L., MARGALIT, H., CEASE, K., BERZOFSKY, J. A., DELSI, C. Strong conformational propensities enhance T cell antigenicity. **J. Immunol.**, v.138, n.1, p.204-212, 1987.
- SPRENT, J. Immunological memory. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 9, p.371-379, 1997.
- STEAR, M. J., NICHOLAS, F. W., BROWN, S. C. Class I antigens of the bovine major histocompatibility system and resistance to the cattle tick *Boophilus microplus* assessed in three different seasons. **Vet. Parasitol.**, v. 31, p. 303-315, 1989.
- SUTHERLAND, G. B., EWEN, A. B. Fecundity decrease in mosquitoes ingesting blood from specifically sensitized mammals. **J. Insect Physiol.**, v.20, n.4, p.655-660, 1974.
- SUTHERST R. W., JONES R. J., SCHNITZERLING H. J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature** , v. 28, p.295-320, 1982.

- SUTHERST, R. W., KEER, J. D., MAYWALD, G. F. The effect of season and nutrition on the resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus*. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 34, p. 329-339, 1983.
- SZABÓ M. P., BECHARA G.H. Immunisation of dogs and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* ticks using gut extract. **Vet Parasitol** v. 68, p. 283-294, 1997
- TELLAM, R. L. SMITH, D., KEMP, D. H. Vaccination against ticks. In: YONG, W. K. **Animal parasite control using biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, p. 303-331, 1992.
- THOMPSON K. C., ROA E. J. , ROMERO N. T. Anti-tick grasses as the basis for developing practical tropical tick control packages. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v.10, p.179-82, 1978.
- TRAGER, W. Acquired immunity to ticks. **J. Parasitol**, v.25, n.1, p. 57-81, 1939.
- TURNBULL, L. F., SMITH, D., SHARP, P. J. Expression and secretion in *Aspergillus nidans* and *A. niger* of a cell surface glycoprotein from the cattle tick *Boophilus microplus*, by using the fungal *amdS* promoter system. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2847-2852, 1990.
- USHIO, H, WATANABE, N., KISO, Y., HIGUSHI, S., MATSUDA, H. Protective immunity and mast cell and eosinophil responses in mice infested with larval *Haemaphysalis longicornis* ticks. **Parasit. Immunol.**, v. 15, p. 209-214, 1993.
- UTECH, K. B. W. Prospects of selection for tick resistance in british breeds of cattle. The future of the british breeds in the ticks areas. **Queensland Agric. Coll.**, p. 30-38, 1979.
- UTECH, K. B. W., WHARTON, R. H., KERR, J. D. Resistance to *Boophilus microplus* (canestrini) in different breeds of cattle. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 29, n. 4, p.885-895, 1978.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V., BRIAND, J. P., MULLER, S., PLAUIÉ, S. **Synthetic polypeptides as antigens** (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 19). Amsterdam: ELSEVIER. 227p., 1990.
- VERÍSSIMO, C. J. Prejuízos causados pelo carrapato *Boophilus microplus*. **Zootenia**. 31 (3/4), p 97-106, 1993.
- WANG, H. NUTTALL, P. A. immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.56, n. 3-4, p. 286-295, 1999.

- WHARTON, R. H. The Current status and prospects for the control of ixodid ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. **Bull. Int. Epizoot.**, v.81, n.1-2, p.65-85, 1974.
- WHARTON, R. H., NORRIS, K. R. Control of parasitic arthropod. **Vet. Parasitol.**, v. 6, p. 135-164, 1980
- WHARTON, R. H., UTECH, K. B. W., TURNER, R. W. Tick resistance cattle for the control of *Boophilus microplus*. INTERNATIONAL CONGRESS OF ACAROLOGY. **Proceedings...**, Praga, p.697-700, 1971.
- WIKEL, S. K. Host immunity to ticks. **Annu Rev. Entomol.**, v. 41, p. 1-22, 1996
- WILLADSEN, P. Immunity to ticks. **Adv. Parasitol.**, v. 18, p. 293-313, 1980.
- WILLADSEN, P. Immunological approaches to the control of ticks. **Int. J. Parasitol.**, v. 17, n. 2, p. 671-677, 1987.
- WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Vet. Parasitol.**, v. 71, p. 209-222, 1997.
- WILLADSEN, P., MCKENNA, R.V. Vaccination with 'concealed' antigens: myth or reality? **Parasite Immunol.**, v.13, n.6, p.605-616, 1991.
- 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*. **J. Immunol.**, v.143, n.4, p.1346-1351, 1989.
- WILLADSEN, P., SMITH, D., COBON, G., MCKENNA, R. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. **Parasit. Immunol.**, v. 18, p. 241-246, 1996.
- WILLADSEN, P., WILLIAMS, P. G., ROBERTS, J. A., KERR, J. D. Responses of cattle to allergens from *Boophilus microplus*. **Int. J. Parasitol.**, v. 8, n. 2, p.89-95, 1978.
- WILLIAMS, R. B. Note sulla messa a punto e sulla efficacia del Paracox, nuovo vaccino per la coccidiosi del pollo. **Zootec. Intern.**, v. 4, p. 10-24, 1993.
- WOODMAM, C. B., GONZALES, O. A., LOPEZ, L. A., GUEREÑA, M. R. Progresos en la erradicación de las garrapatas *Boophilus* en México 1960-1980. **Rev. Mundial Zootec.**, n. 48, Roma: FAO, p. 18-24, 1983.

