

SIDIMAR SOSSAI

**POLIMORFISMOS DO GENE *bm86* DE *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) E
ANÁLISE DA CONSERVAÇÃO GENÉTICA DE PEPTÍDEOS INTEGRANTES DA VACINA
SINTÉTICA SBm7462**

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**

2004

“A alegria está na luta,
na tentativa, no sofrimento envolvido.
Não na vitória propriamente dita.” (*Mahatma Gandhi*)

AGRADECIMENTOS

À DEUS, Jesus Cristo e à querida Virgem da Penha quem me guiam pela vida.

À minha família, meus pais principalmente, razão de toda minha luta.

À Universidade Federal de Viçosa a quem devo toda minha formação acadêmica e pela acolhida nesses anos de luta.

Ao Professor Joaquín Patarroyo, pela compreensão, orientação, amizade, confiança, disponibilidade nas horas difíceis e principalmente, por apostar em meu potencial.

À Francismar do LabGene por todo apoio e boa vontade em auxiliar-me durante todo o decorrer de meu trabalho.

À Andréia do laboratório de sequenciamento e análises de fragmento/BIOAGRO/UFV meu muito obrigado pela paciência e disponibilidade em esclarecer as muitas interrogações que surgiram de todos os lados.

Ao Wagner do Biomol/BIOAGRO/UFV pela disponibilidade em ceder alguns reagentes para Biologia Molecular.

À Professora Simone Guimarães e à mestranda Danielle do Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia pela abertura das portas de seu laboratório para o sequenciamento de algumas amostras.

À Professora Glória Regina Franco e suas orientadas Paula e Isabelle pela disponibilidade de realizar o sequenciamento das minhas amostras.

Aos Professores Mauro Pires Moraes e Márcia Rogéria por disponibilizar as instalações de seu laboratório para realização de boa parte deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório Virologia Molecular Animal/BIOAGRO/UFV, principalmente à Fernandinha, quem muito me ajudou nas primeiras extrações de RNA e Síntese de cDNA.

Aos companheiros das “segundas culturais” na Vila Gianette: Policarpo, Priscila e Giselle. Momentos bons aqueles!!

À todos aqueles que nos auxiliaram na aquisição de amostras de carrapatos: Raquel (Betim – MG), Atílio José Mangold (cepas Argentinas); Gilson Pereira de Oliveira (UNESP Jaboticabal); João Ricardo Martins (cepas gaúchas); Amauri Apolônio de Oliveira (cepa sergipana); Lílían (Paraíba Sul); Ulises Cuore (cepas Uruguaias); à EMBRAPA São Carlos e Piauí, e aos demais meu muito obrigado.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/BIOAGRO/UFV e agregados: Carolina, Carlinha Medeiros, Larissa, Policarpo, Carlos, Danni e Ferdinan.

À bolsista de iniciação científica Ana Paula Peconick, por todo o auxílio prestado no decorrer do experimento.

À amiga Aline Prates pela introdução às técnicas laboratoriais e pelas conversas incentivadoras.

Ao amigo Márcio Mendes, pelas dicas de socialização, as quais abriram muitas portas no BIOAGRO para realização deste trabalho.

Aos funcionários da cozinha setorial do BIOAGRO (autoclave) pela disponibilidade de esterilizar todos os materiais necessários.

À secretária da Pós-Graduação do Departamento de Veterinária, Rosi, por sua dedicação aos pós-graduandos.

Ao colega Thiago Silveira pelo rateio dos recursos escassos e à CAPES por disponibilizar esses recursos.

À FAPEMIG, pela concessão dos recursos para realização deste trabalho.

À Elisângela, pela sua Companhia, Amor e Carinho, fatores indispensáveis para qualquer caminhada.

Enfim, a todos que nos ajudaram direta e indiretamente nesses dois anos de luta e quatro anos de laboratório. Obrigado a todos (...).

BIOGRAFIA

SIDIMAR SOSSAI, filho de Osvaldo Antônio Sossai e Josefina Spadeto Sossai, nasceu aos 24 dias do mês de maio, do ano de 1976, na cidade de Venda Nova do Imigrante, no estado do Espírito Santo.

Concluiu o 1º Grau, em 1991, na Escola de Primeiro e Segundo Graus “Fioravante Caliman”, em Venda Nova do Imigrante - ES e o curso médio e técnico profissionalizante na Escola Agrotécnica Federal de Alegre - Alegre - ES, em 1993.

Em Março de 1997 ingressou no curso de Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG, finalizando em maio de 2002. Iniciou-se na pesquisa pelo programa PIBIC/FAPEMIG (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica) com o projeto “Experimento de três Peptídeos Sintéticos Como Vacinas para Controle do Carrapato *B. microplus*” de Março 1999 a Fevereiro de 2000. Prosseguiu de Março de 2000 a Fevereiro de 2001 com o projeto “Moléculas de Adesão em *Babesia bovis*: Identificação e Caracterização”, ambos no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/Bioagro/UFV sob a orientação do Prof. Joaquin Patarroyo, onde permaneceu de Março de 2001 a Setembro de 2002 como estagiário.

Em setembro de 2002 ingressou no Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, pelo Departamento de Medicina Veterinária.

ÍNDICE

	Página
Resumo.....	X
Abstract.....	XI
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	5
2.1. Objetivo Geral.....	5
2.2. Objetivos Específicos.....	5
3. Revisão de Literatura.....	6
3.1. Vacinas anti- <i>B. microplus</i>	6
3.2. Imunógeno sintético derivado da proteína Bm86.....	10
3.3. Heterogeneidade genética do <i>B. microplus</i>	12
4. Materiais e Métodos.....	15
4.1. Populações de carrapatos analisadas.....	15
4.2. Extração de RNA total de <i>B. microplus</i>	16
4.3. Síntese de cDNA por RT-PCR.....	17
4.4. Amplificação dos fragmentos A e B do gene Bm86.....	18
4.5. Purificação dos fragmentos de DNA de géis de agarose.....	19
4.6. Produção de células competentes DH5a.....	20
4.7. Clonagem dos fragmentos A e B.....	21
4.8. Identificação de colônias positivas.....	22

4.9. Crescimento bacteriano em meio líquido.....	23
4.10. Congelamento de <i>E. coli</i> DH5a contendo os fragmentos A e B.....	23
4.11. Extração de DNA plasmidial dos clones contendo os fragmentos A e B.....	23
4.12. Sequenciamento das amostras.....	24
4.13. Análise dos dados.....	26
5. Resultados e Discussão.....	28
5.1. Polimorfismos no gene <i>bm86</i>	28
5.2. Polimorfismos no peptídeo 4824.....	43
5.3. Filogenia entre populações de <i>B. microplus</i> analisadas.....	46
6. Conclusões.....	50
7. Referências bibliográficas.....	51

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Proteínas candidatas à antígenos vacinais.....	9
Tabela 2 – Populações de <i>B. microplus</i> analisadas.....	15
Tabela 3 – Seqüências dos primers utilizados para amplificação dos fragmentos A e B.....	19
Tabela 4 – Programa da reação de sequenciamento para o ABI310.....	25
Tabela 5 – Avaliação de polimorfismos.....	41
Tabela 6 – Análise da diversidade entre seqüências de populações heterozigóticas.....	43
Tabela 7 – Polimorfismos das populações UFV e Porto Alegre e eficiência vacinal com o SBm7462.....	45
Tabela 8 – Local de mutações nas regiões do peptídeo 4824.....	46

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da reação de PCR com os primers 4824.....	30
Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da reação de PCR com os primers 4822.....	31
Figura 3 – Alinhamento das seqüências parciais do fragmento A.....	33
Figura 4 – Análise da seqüência do fragmento B.....	44
Figura 5 - Desenho da vacina sintética SBm7462.....	44
Figura 6 – Cladograma com as seqüências parciais do gene <i>bm86</i>	47
Figura 7 – Matriz genética dos 38 alelos estudados.....	48

RESUMO

SOSSAI, Sidimar M. S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2004. **Polimorfismos do gene *bm86* de *Boophilus microplus canestrini*, 1887 (acari: ixodidae) e análise da conservação genética de peptídeos integrantes da vacina sintética SBm7462.** Orientador: Joaquín H. Patarroyo Salcedo. Conselheiros: Marlene Isabel Vilória Vargas e Everaldo Gonçalves de Barros

O carrapato *B. microplus* é considerado o principal ectoparasita para a pecuária bovina mundial. Seu controle repousa pesadamente sobre a utilização de acaricidas que a cada ano que passa se mostram menos eficientes devido a aquisição de resistência pelo parasita. Como alternativa ecologicamente segura para controlar este parasito, tem sido desenvolvidas vacinas derivadas de antígenos ocultos para o sistema imune do hospedeiro. Porém, falhas vacinais com a glicoproteína Bm86 recombinante já tem sido descritas devido à polimorfismos no seu gene em diferentes populações de *B. microplus*. Já foi descrito variações de até 8.6% na seqüência deste gene. Uma variante da Bm86, denominada Bm95, foi identificada e também utilizada como vacina recombinante, revertendo os resultados negativos naquelas populações que foram resistentes à vacinação com a Bm86, mas com eficiências variáveis. Pesquisadores do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários, da Universidade Federal de Viçosa, MG desenvolveram uma vacina sintética composta de três peptídeos derivados da Bm86, sendo que um deles, o 4824, é considerado o principal indutor da produção de anticorpos anti-SBm7462. Com o intuito de avaliar mutações no gene *bm86* e a conservação da seqüência peptídica 4824

foram analisadas 30 populações de carrapatos *B. microplus*, de regiões geograficamente distintas do Brasil e países vizinhos. Para isso foi sintetizado, através do RNA total extraído das amostras, o cDNA que serviu de molde nas reações de PCR para amplificação da sequência nucleotídica compreendida entre os nucleotídeos 278 – 1071. O material amplificado foi clonado em vetor pGEM[®] e seqüenciado em seqüenciador automático pelo método enzimático. A análise foi feita através de alinhamento de múltiplas seqüências pelo programa BioEdit versão 5.0.5 e a verificação de polimorfismos por inspeção visual. As análises confirmaram as conservações das seqüências nucleotídicas e aminoácidas do peptídeo 4824 e revelaram variabilidade genética dentro do gene bm86 entre as amostras pesquisadas. Através do sequenciamento do fragmento que codifica o peptídeo 4822 foi possível determinar que os testes realizados com a vacina sintética SBm7462 foram em amostras que divergiam em dois aminoácidos da sequência peptídica da vacina, além de apresentarem variações superiores a 4.94% na sequência da glicoproteína intestinal.

ABSTRACT

SOSSAI, Sidimar M. S., Universidade Federal de Viçosa, october of 2004.
Polimorphisms of the gene *b*m86 of *Boophilus microplus* canestrini, 1887 (acari: ixodidae) and analysis of the genetic conservation of integral peptides of the synthetic vaccine SBm7462. Adviser: Joaquim H. Patarroyo Salcedo. Committee members: Marlene Isabel Vilória Vargas and Everaldo Gonçalves de Barros.

The tick *B. microplus* is considered the main ectoparasite for the world bovine cattle. Its control rests heavily about the acaricides use that are less efficient due to resistance acquisition on the part of the parasite to every year that passes. As alternative ecologically holds to control this parasite, it has been developed derived vaccines of canceled antigens for the immune system of the host. Even so, flaws vaccinate with the protein Bm86 recombinant it has already been described due to the polymorphisms of its gene in different populations of *B. microplus*. It was already described variations of up to 8.6% in the sequence of this gene. A variant of Bm86, denominated Bm95, it was identified and also used as vaccine recombinant, reverting the negative results in those populations that were resistant to the vaccination with for Bm86 but with variable efficiencies. Researchers of the Laboratory of Biology and Control of Hematozoários, of the Federal University of Viçosa, MG developed a synthetic vaccine composed of three derived peptides of Bm86, and one of them, the 4824, the main inductor of the production of antibodies anti-SBm7462 is considered. With the intuit of evaluating mutations in the gene

bm86 and the conservation of the sequence peptides 4824, 30 populations of ticks *B. microplus* were analyzed, of areas geographically different from Brazil and neighboring countries. For that it was synthesized, through extracted total RNA of the samples, the cDNA that served as mold in the reactions of PCR for amplification of the sequence of nucleotides understood among the nucleotides 278 - 1071. The amplified material was cloned in vectorial pGEM® and sequenced in automatic sequencer for the enzymatic method. The analysis was made through alignment of multiple sequences by the program BioEdit version 5.0.5 and the polymorphisms verification for visual inspection. The analyses confirmed the conservations of the sequences nucleotides and amino acids of the peptides 4824 and they revealed genetic variability inside of the gene bm86 among the researched samples. Through the sequencing of the fragment that codes the peptides 4822 it was possible to determine that the tests accomplished with the synthetic vaccine SBm7462 were in samples that diverged in two amino acids of the sequence peptides of the vaccine, besides they present superior variations at 4.94% in the sequence of the intestinal protein.

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são considerados pertencentes às primeiras linhagens de aracnídeos terrestres, o que vem gerando muitas controvérsias entre os autores, no que diz respeito à sua origem. LINDQUIST (1984) comenta que sua origem se deu entre 443 a 417 milhões de anos atrás (m.a.a.); OLIVER (1989) 417 a 362 m.a.a.; HOOGSTRAAL e AESCHLIMANN (1982) 290 – 248 m.a.a.; BALASHOV (1989, 1984) 248 – 206 m.a.a.; FILLIPOVA (1977) 144 – 65 m.a.a. e KLOMPEN *et al.* (1996) 120 m.a.a..

Postula-se que os membros da família Ixodidae desenvolveram-se como parasitos obrigatórios de répteis em climas quentes e úmidos. Supõe-se que quando esses répteis ramificaram-se em numerosas formas de vida, preenchendo nichos aquáticos e terrestres, seus carrapatos mais primitivos evoluíram em duas principais famílias, Argasidae e Ixodidae (HOOGSTRAAL, 1985).

De acordo com PEREIRA (1982), no que diz respeito à situação taxonômica das espécies de *Boophilus*, há cinco espécies reconhecidas: *Boophilus annulatus*, *B. decoloratus*, *B. microplus*, *B. Kohlsi* e *B. geigyi*, sendo o *B. microplus* o único encontrado no Brasil.

Taxonomicamente o carrapato *B. microplus* pode ser classificado da seguinte forma, conforme NUÑEZ *et al.* (1982):

Filo: Arthropoda

Classe: Arachnida

Ordem: Acari

Subordem: Metastigmata

Família: Ixodidae

Subfamília: Rhipicephalinae

Gênero: *Boophilus*

Espécie: *B. microplus*

Estudos recentes, tendo como fundamentos análises filogenéticas, levam a crer que a origem dos carrapatos da subfamília *Rhipicephalinae* tenham sido na região Afro-tropical e/ou Afro-oriental (BARKER e MURREL, 2002). Mesmo o *B. microplus* não sendo de origem autóctone, do continente americano, os cinco séculos que tem transcorrido desde sua possível chegada, com os primeiros animais dos colonizadores europeus, os possibilitou desenvolver alto grau de adaptação ao ambiente, tornando se pragas em muitos países do continente. Ele está 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. (ESTRADA – PEÑA, 1999).

Levantamento, realizado pelo ministério da agricultura no ano de 1983, demonstrou que o carrapato *B. microplus* está presente em 96% dos municípios informantes (75.37% dos municípios brasileiros), sendo muito freqüente em 80% deles (BRASÍLIA, 1985).

Os prejuízos causados pelo *B. microplus* são evidenciados pela ingestão de fluidos corporais podendo ingerir entre 0,5 a 3,0 ml de sangue, perdas na qualidade do couro, devido cicatrizes irreversíveis, ocasionadas durante a alimentação e transmissão de agentes patogênicos como *Babesia bovis* e *B. bigemina*; tendo, também, a participação na epidemiologia de *Anaplasma marginale* e da *Theileria equi* em eqüinos (SEIFERT *et al.*, 1971, PATARROYO, 1994, GUIMARÃES *et al.*, 1998 e GOMES, 2000).

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), os prejuízos causados pela infestação por carrapatos e as doenças, por eles transmitidas, ultrapassam 7 bilhões de dólares anuais. Recentemente, estudos realizados por GRISI *et al.* (2002), indicaram prejuízos da ordem de 2 bilhões de dólares anuais. Na Argentina, país que adota uma campanha nacional de erradicação do carrapato bovino, as perdas superam 100 milhões de dólares anuais (SIGNORINI, 1991). No México, calcularam em 30 Kg de carne por animal/ano (WOODHAN *et al.* 1983). É estimado que cada teleógina seja responsável pela queda de produção diária de 8,9 ml de leite e de 1,0 g de peso corporal (JONSSON *et al.* 1998).

O controle do *B. microplus* se processa quase que exclusivamente, pela utilização de produtos químicos durante a sua fase parasitária, o que corresponde a apenas a 5% do total da população de carrapatos no ambiente (FURLONG, 1998; FRISCH, 1999).

O uso indiscriminado de acaricidas tem levado a um interminável aparecimento de carrapatos resistentes. Com o desenvolvimento de resistência para uma classe de acaricidas, uma nova classe está sendo introduzida, para aliviar o problema, tendo hoje cepas de *B. microplus* resistentes a todas as classes de acaricidas disponíveis no mercado, sendo um dos principais entraves para a pecuária bovina (REID, 1989).

Devido aos danos ecológicos causados pelo emprego de fármacos acaricidas, à perda de eficiência das drogas devido à resistência, à maior cobrança do mercado consumidor e exigências comerciais quanto à alimentos livres de resíduos químicos, muito se tem pesquisado sobre formas alternativas para o controle do carrapato *B. microplus*. Dentre estas formas encontram-se a utilização de pastagens que agiriam na fase não parasitária do parasito (THOMPSON *et al.*, 1978); emprego de predadores naturais (LIPA, 1971, DE LA VEGA *et al.*, 1982, BRANCO E PINHEIRO, 1987, BITTENCOURT *et al.*, 1992), cruzamentos interespecíficos para geração de machos inférteis (OSBURN e KNIPLING, 1982) e vacinas (WILLADSEN *et al.*, 1996, RODRIGUEZ *et al.*, 1994, GARCÍA – GARCÍA *et al.*, 2000, PATARROYO *et al.*, 2002).

O controle imunológico contra o *B. microplus* começou a se tornar realidade quando foi isolada uma glicoproteína de membrana do intestino do carrapato *B. microplus* da amostra australiana Yeerongpilly, que sofria ação de anticorpos do hospedeiro denominadas de Bm86 (WILLADSEN *et al.*, 1989). Essa proteína foi clonada pela primeira

vez por RAND *et al.* (1989) e utilizada como vacina recombinante expressada em *E. coli* e *Pichia pastoris* (SMITH *et al.*, 1995 e RODRIGUEZ *et al.*, 1994).

Esse tipo de vacina tem apresentado eficiências variáveis quando testadas em diferentes populações de *B. microplus*, que é incriminado à variabilidade genética no gene *bm86*. Uma variante da proteína Bm86, denominada Bm95, foi isolada de uma população de carrapatos (cepa A) que era praticamente insensível à vacinação com Bm86 recombinante (rBm86). Essa nova variante foi expressa em levedura e também utilizada como vacina recombinante, controlando aquela população que foi resistente a rBm86 (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000).

PATARROYO *et al.* (2002) desenvolveram a primeira vacina sintética para o controle do *B. microplus*, onde através de modelos computacionais foram determinados possíveis epitopos de células B e T dando origem ao peptídeo SBm7462. Esse imunógeno é formado pelo agrupamento das seqüências 4822 (aa. 398-411), 4824 (aa. 132-145) e 4823 (aa.21-35) nesta ordem e com duas cisteínas no C- e N- terminais. Através do alinhamento entre as proteínas Bm86 e Bm95 encontrou-se apenas duas mudanças dentro das seqüências que constituem o SBm7462 o que leva a crer que essas seqüências se mantiveram conservadas durante a evolução deste parasita.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os polimorfismos na sequência do gene *bm86* em populações de carrapatos *B. microplus* provenientes de geograficamente distintas do Brasil e de países latino-americanos e a conservação da sequência correspondente ao peptídeo 4824 da vacina sintética SBm7462.

2.2. Objetivos específicos

- Amplificar, clonar e sequenciar o fragmento do gene *bm86* compreendido entre os nucleotídeos 278 – 1071 de *B. microplus* provenientes de regiões geográficas distintas;
- Determinar a variação de aminoácidos da proteína Bm86 compreendidos entre os aminoácidos 83 a 346, nas populações de *B. microplus* estudadas;
- Determinar a sequência de aminoácidos do fragmento 4822 das populações de carrapatos UFV e Porto Alegre submetidas à testes com a vacina sintética SBm7462.
- Determinar o perfil filogenético das populações de *B. microplus* analisadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Vacinas anti-*B. microplus*.

Vacinas anti-carrapatos tem um potencial vantajoso sobre outras formas de controle de carrapatos, que é a possibilidade de ser usada sobre qualquer animal e em qualquer lugar do mundo, dependendo exclusivamente do sistema imunológico do hospedeiro. Não há período de carência para produtos derivados de animais vacinados, fazendo-se adequado para uso em rebanhos leiteiros (FRISCH, 1999).

O desenvolvimento de vacinas anti-carrapatos representam uma das mais promissoras alternativas de controle ao *B. microplus* e tem a vantagem de ser espécie alvo-específica, apresentar segurança ambiental e à saúde humana, bem como a animal, fácil administração e custo acessível. Avanços no entendimento da imunologia bovina, biologia molecular e biotecnologia têm feito da pesquisa com vacinas anti-*B. microplus* uma realidade.

A primeira consideração para imunidade contra carrapatos foi referida por NUTTAL (1911) à imunidade natural de humanos. Na década de 1930 as primeiras investigações sobre a resistência imunológica contra carrapatos começaram a aparecer, culminando com inúmeros trabalhos acerca do tema desenvolvidos atualmente (LABARTHE, 1994).

TRAGER (1939) foi o pioneiro em estudar a imunidade adquirida contra carrapatos. Em seu trabalho ficou evidenciado que após infestações repetidas de *Dermacentor*

variabilis, em cobaias e coelhos, houve um aumento da resistência capaz de reduzir o número de adultos, o peso ao desprendimento e diminuição da ovoposição e larvas viáveis.

FELDMAN-MUHSAM (1964) observou que ratos, após sucessivas infestações com *Rhipicephalus sanguineus*, tornaram-se imunes a esses carrapatos, um processo considerado imunização do hospedeiro.

ALLEN *et al.* (1977) demonstraram que antígenos de glândula salivar de *D. andersoni* estavam presentes na pele de *guinea pigs* infestados com este carrapato. ALLEN e HUMPHREY (1979) imunizaram bovinos com células do trato intestinal e genital de *D. andersoni*, e observaram que, os animais vacinados inibiam a fertilidade dos carrapatos que se alimentavam de seu sangue.

ALLEN *et al.* (1977 e 1979) notaram que os antígenos de glândula salivar verificados na pele estavam associados a células dendríticas, na epiderme, confirmando-as mais tarde como células de Langerhans. Essas células foram observadas em menor número no local da picada em animais susceptíveis e em maior número em animais resistentes (NITHIUTHAI e ALLEN (1984a). Os mesmos pesquisadores mostraram que a depleção dessas células tornou impossível a expressão de resistência desses animais a carrapatos (NITHIUTHAI e ALLEN (1984b).

ACKERMAN *et al.* (1980) imunizaram cobaias com extratos de *Dermacentor variabilis* inteiro e com extrato de intestino, tendo o segundo se apresentado mais eficiente em retardar o desprendimento, diminuindo a ovoposição e a fertilidade dos ovos. Foi através deste trabalho que se definiu o conceito de “concealed antigens”, ou antígenos ocultos, os quais ficam normalmente fora do alcance do sistema imune do hospedeiro, mas que, ao serem inoculados formam uma resposta imune protetora.

O uso destes imunógenos não está relacionada com uma resposta de hipersensibilidade ou uma amplificação desta resposta, como ocorre na resposta imune naturalmente adquirida, mas sim, em uma resposta imune induzida contra um antígeno alvo não exposto na inter-relação natural parasita hospedeiro.

JOHNSTON *et al.* (1986) observaram maior imunidade naqueles animais imunizados com extratos brutos de *B. microplus* do que naqueles animais não imunizados. Este trabalho revelou lesões histopatológicas no intestino deste carrapato, indicando esse órgão como alvo dos anticorpos produzidos pela resposta imunológica. OPDEBEECK *et al.*

(1988) confirmou que a imunidade é essencialmente induzida por antígenos localizados no intestino médio do *B. microplus*.

Finalmente, em 1989, foi isolada e purificada uma proteína da amostra australiana Yeerongpilly, que causava as mesmas patologias no intestino de *B. microplus* que extratos brutos, quando estes parasitas se alimentavam sobre bovinos imunizados (WILLADSEN *et al.*, 1989). Essa proteína foi denominada Bm86, com peso estimado de 89 kDa e pI de 5.5. RAND *et al.* (1989) clonou e sequenciou o gene dessa proteína, determinando suas seqüências nucleotídicas e aminoacídicas. Essa proteína é constituída de 650 aminoácidos, revelando muitas similaridades, entre algumas de suas regiões, com precursor do fator de crescimento epidérmico (EGF) e outras repetições tipo EGF. WILLADSEN *et al.* (1989) complementa que esta glicoproteína encontra-se em pequenas quantidades no intestino do carrapato.

GOUGH e KEMP, (1993) e OLIVEIRA (1998) determinou a localização e distribuição da Bm86 no intestino do carrapato por técnicas imuno-histoquímicas e painéis de monoclonais, mostrando ser encontrada nas microvilosidades da membrana das células epiteliais do intestino e altamente concentrada próximo à membrana basal.

Com a finalidade de se obter um antígeno mais seguro e de maneira mais cômoda, foi realizada a clonagem do gene bm86 em *E. coli*, em *Aspergillus nidulans* e em *Baculovirus* (TURNBULL *et al.*, 1990; TELLAM *et al.*, 1992). Em 1994 foi lançada a primeira vacina comercial contra carrapatos denominada TickGard® (Hoeschst Animal Health, Austrália), através da clonagem do gene bm86 isolado da amostra Yeerongpilly em *E. coli*, produzindo a proteína Bm86 recombinante (SMITH *et al.*, 1995).

No mesmo ano foi desenvolvida em Cuba (Heber Biotec AS, Havana, Cuba) através de recombinação do gene da glicoproteína Bm86 (estoque cubano da amostra Yeerongpilly) com o fungo *Pichia pastoris* a vacina cubana GAVAC®. Em experimentos sobre condições de campo foram mostrados que este imunógeno não apenas afetou a redução do número de carrapatos, mas também a redução do peso das teleóginas ingurgitadas, diminuição da postura e viabilidade dos ovos. (RODRIGUEZ *et al.* (1994)

Testes conduzidos com uma amostra Argentina (Cepa A) de *B. microplus* resultou em mínima eficiência da vacina GAVAC® contendo a proteína recombinante Bm86. Este resultado levou ao isolamento, nesta amostra, de uma nova proteína muito similar à Bm86,

denominada Bm95. Esta proteína foi expressa em *P. pastoris* e utilizada como antígeno vacinal apresentando melhor eficácia na população insensível à Bm86 recombinante (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000).

As proteínas Bm86 e Bm95 são as únicas moléculas utilizadas comercialmente como antígenos vacinais para o controle do carrapato *B. microplus* (RODRIGUEZ *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 1995; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 1999; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000, DE LA FUENTE e KOCAN, 2003).

Outros exemplos de antígenos que conferem proteção à carrapatos tem sido isolados e identificados como demonstrado na tabela 1 adaptada de WILLADSEN (2001) e DE LA FUENTE E KOCAN, 2003. Alguns desses antígenos já foram avaliados como antígeno recombinante como os antígenos Bm86, Bm95, Bm91 e BmTI para o carrapato *B. microplus*.

Outras pesquisas têm sido desenvolvidas com a finalidade de se obter novos antígenos vacinais contra o carrapato *B. microplus*. A análise dos padrões da expressão de genes por meio de EST (expressed sequence tags) serve como meio para estudo da biologia do carrapato e descoberta de novas formas para controlar este parasito. Eles podem indicar novos candidatos para o controle imunológico, biológico e estratégias de controle químico (SANTOS *et al.*, 2004). Nova técnica denominada ELI (expression library immunization) em combinação com a análise de EST vem sendo utilizada para identificação de antígenos candidatos a vacinas contra carrapatos (ALMAZAN *et al.*, 2003).

Tabela 1: Proteínas candidatas à antígeno vacinal contra o carrapato *B. microplus*

Espécies	Proteína/Antígeno	Função	Tipo de Uso
<i>B. microplus</i>	Bm86	Proteína com múltiplos domínios EGF –like Endocitose	Vacinação com nativo, recombinante e peptídeo sintético
<i>B. microplus</i>	Bm95	Homologia com Bm86	Vacinação com antígeno recombinante
<i>B. microplus</i>	Bm91	Carboxidipeptidase; metabolismo de hormônios peptídicos em carrapatos	Vacinação com antígeno nativo e recombinante
<i>B. microplus</i>	BMA7	Proteína tipo mucina	Vacinação com proteína nativa
<i>B. microplus</i>	Pro-cathepsina	Precursor de enzimas proteolítica	Vacinação com antígeno e inoculação de anticorpos monoclonais
<i>B. microplus</i>	β-N-acetilhexosaminidase	Hidrólise de oligossacarídeos	Injeção com anticorpos monoclonais
<i>B. microplus</i>	Vitelina	Proteína de estoque em ovos	Vacinação com proteínas nativas
<i>B. microplus</i>	Antígeno B	Desconhecido	Vacinação com proteínas nativas
<i>B. microplus</i>	BmTI	Inibidor de serinoproteases	Vacinação com proteínas recombinantes

3.2. Imunógeno sintético derivado da proteína Bm86

A primeira ocorrência da utilização de peptídeos sintéticos, para eliciar proteção imunológica contra carrapatos, foi feita por SHARP *et al.* (1990). Em seu trabalho foram sintetizados e purificados quatro oligopeptídeos desenvolvidos a partir de cálculos preditivos da seqüência de aminoácidos da glicoproteína Bm86. Três desses peptídeos foram conjugados com proteínas carreadoras e inoculados em coelhos e bovinos para produção de anti-soro. Todos os anticorpos foram capazes de reconhecer a proteína Bm86 e a rBm86 pela técnica de Western blotting. Entretanto, apenas um anti-soro produzido foi capaz de reconhecer a Bm86 nativa no teste de imunofluorescência indireta.

Muitas técnicas estão disponíveis para geração de frações peptídicas com características de epitopos antigênicos para linfócitos B ou T, que são realizadas levando-se em consideração a estrutura primária da proteína. Técnicas como cristalografia com raios X, anticorpos monoclonais, engenharia genética e softwares capazes de simular a estrutura protéica são utilizadas para este fim (MELNICK, 1986).

Baseando-se no fato de que a estrutura primária determina a estrutura terciária, alguns pesquisadores desenvolveram modelos matemáticos que levam em consideração algumas propriedades das proteínas 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) para predição de possíveis sítios imunogênicos da proteína integra.

Fazendo-se uso dessas ferramentas matemáticas, pesquisadores do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/BIOAGRO/Departamento de Veterinária/ Universidade Federal de Viçosa – MG desenharam três seqüências peptídicas denominadas 4822 (aa 398 – 411), 4823 (aa 21 – 35) e 4824 (aa 132 – 145). Os números dos peptídeos foram dados de acordo com sua catalogação no livro de seqüências do Instituto de Imunologia Del Hospital San Juan de Dios em Bogotá – Colômbia, onde foram sintetizados.

A junção das seqüências de aminoácidos dos três peptídeos 4822 – 4824 – 4823, nesta ordem, deu origem ao antígeno vacinal SBm 7462¹ cuja tecnologia já tem sido

¹ Produto já se encontra patentado.

repassada à indústria de medicamentos. O peptídeo sintético SBm 7462 foi testado em experimentos distintos:

PATARROYO *et al.* (2002) testaram o antígeno sintético, com adjuvante saponina, em 12 bovinos *Bos taurus taurus*, da raça Jersey, mantidos estabulados em local a prova de artrópodes. Soros de animais imunizados com o peptídeo foram capazes de detectar a proteína “*in situ*” através da técnica de imunoperoxidase indireta. Foi observado aumento do título de anticorpos específicos anti-peptídeo no soro desses animais após cada inoculação e manutenção da memória imunológica pelas células B após revacinação. A eficiência vacinal, nestas condições, alcançou 81,05% de redução do número de carrapatos.

COUTO PIMENTEL (2002) realizou o teste com o peptídeo sintético SBm7462 em condições extremamente diferentes que o anterior e em duas concentrações: 1,0 mg e 2,0 mg, também com o adjuvante saponina. Foram utilizados neste trabalho 30 bovinos *Bos taurus taurus*, da raça Holandesa, mantidos a campo previamente infestados com larvas de *B. microplus* sob diversidades ambientais e estresses causados por outros fatores. Concordando com o primeiro teste realizado, neste também houve aumento do título de anticorpos específicos e redução do número de teleóginas, do peso médio da ovoposição, da relação peso das larvas/peso dos ovos, redução do peso dos ovos, redução das teleóginas e redução da fertilidade dos ovos, alcançando uma eficiência final de 53,29% para o grupo vacinado com 2,0 mg do peptídeo SBm7462.

De acordo com os achados de COUTO - PIMENTEL (2002) e PATARROYO *et al.* (2002) a eficácia do peptídeo SBm7462 em estábulo se mostra superior à maioria dos testes realizados com rBm86 na mesma situação e produz uma resposta imune protetora contra *B. microplus*, mesmo sob condições de estresse, devido ao manejo, com uma eficácia equiparada aos demais ensaios com rBm86 sob condições apenas de estábulo (RODRIGUEZ *et al.*, 1994; PENICHET *et al.*, 1994; FRAGOSO *et al.*, 1995; MASSARD *et al.*, 1995).

Outros dois experimentos foram realizados com SBm7462, com a finalidade de testar um modelo de liberação lenta em microesferas biodegradáveis PLGA (poliésteres derivados dos ácidos láctico e glicólico) e avaliar a resposta imune de bovinos vacinados (SALES-JÚNIOR, 2003 e GONZÁLEZ LOMBANA, 2003).

No primeiro trabalho, foram analisados, em camundongos Balb/c, dois adjuvantes diferentes (saponina e PLGA) para a vacinação com SBm7462. Os resultados obtidos por SALES-JÚNIOR (2003) revelaram que a saponina potencializa melhor resposta imune do peptídeo SBm7462, tendo sido também esta resposta mais precoce e que, as microesferas PLGA mostram-se viáveis a serem utilizadas como sistema de liberação para este peptídeo, necessitando-se, porém, de estudos adicionais para promoção de uma melhor eficácia de encapsulação.

Na avaliação da resposta imune elicitada pelo SBm7462, GONZÁLEZ LOMBANA (2003) demonstrou que o SBm7462 estimulou a produção de imunoglobulinas antígeno-específicas, com predominância estatisticamente diferente do isótipo IgG1 sobre o isótipo IgG2. De acordo com seus achados, considera-se que o peptídeo sintético SBm7462 induz eficientemente uma resposta imune antígeno-específica que envolve mecanismos do sistema imune tanto celulares quanto humorais.

3.3. Heterogeneidade Genética do *B. microplus*

Vários trabalhos têm sido propostos para se detectar a variabilidade genética em *B. microplus*. BAXTER e BARKER (1998) estudou cDNA da acetilcolinesterase (AChE) em *B. microplus* resistentes e susceptíveis a organofosforado chegando a conclusão que a resistência a organofosforado não é conferida por mutações em alelos do gene da AChE, pois não foram encontradas divergências entre os genes analisados. Esses dados vão de encontro ao encontrado em *Drosophilla melanogaster* onde a resistência é devida a mutações neste gene (MUTERO *et al.*, 1994). Em *B. microplus*, a resistência pode ser devida a outro gene da AChE não descoberto ou modificações pós-transducional (BAXTER e BARKER, 1998).

GUERRERO *et al.* (2001), a PCR alelo específica, determinou que apenas uma substituição nucleotídica, no gene que codifica os domínios do canal de sódio, leva a insensibilidade a piretróides, mecanismo que leva a resistência de carrapatos a esta base química.

HERNANDEZ *et al.*, (2000) identificou um ponto de mutação no gene de uma esterase em diferentes populações de *B. microplus*. Foi determinado que uma mutação produziu uma substituição de aminoácido que foi determinada em populações de carrapatos

resistentes a organofosforados. Essa pequena modificação pode ser responsável por um aumento na produção da esterase, levando a maior potencial de detoxificação de bases químicas como organofosforados e piretróides. Resultados similares foram encontrados por HERNANDEZ *et al.* (2002).

Em um trabalho realizado no Brasil, PASSOS *et al.* (1999) demonstraram variação genética entre sete isolados de *B. microplus*, de regiões geograficamente distintas do estado do Rio Grande do Sul, usando três diferentes sondas de cDNA por meio da técnica de RFLP (Polimorfismo de Tamanho em Fragmentos de Restrição). Este trabalho foi o pioneiro da utilização da técnica de RFLP em *Boophilus spp.*

Por meio da técnica de RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado Aleatoriamente) populações de *B. microplus* sensíveis e resistentes a organofosforados foram analisadas. Neste estudo HERNANDEZ *et al.* (1998) detectaram diferentes perfis de amplificação do material genético em cepas resistentes, quando comparada com cepas sensíveis, indicando variabilidade genética entre essas populações, podendo ser responsável pela insensibilidade a acaricidas.

Com a finalidade de se estudar possíveis implicações relacionadas à mutações no gene responsável por expressar proteína formadora do receptor da octopamine, BAXTER e BARKER (1999a) isolaram e estudaram sua seqüência, em populações resistentes e sensíveis a amitraz. Não foi encontrada nenhuma variação na seqüência do cDNA deste receptor, indicando que a resistência ao amitraz, em *B. microplus*, aparentemente, não é conferida por mutações pontuais no gene do receptor octopamine. Especula-se que a resistência a esta classe química seja devida ao *B. microplus* ter mais que um receptor para octopamine ou interferência de processos metabólicos responsáveis pela detoxificação deste acaricida.

No que se refere a antígenos vacinais, COBON *et al.* (1995) inferiu pela primeira vez que as diferentes suscetibilidades encontradas em populações de *B. microplus* australianas à vacina TickGard® seria devido fatores fisiológicos ligados à variações genéticas.

GARCÍA-GARCÍA *et al.* (1999) estudaram a variação dentro do locus Bm86 de amostras australianas, mexicanas, cubanas, mexicanas, venezuelanas e argentinas encontrando variações de 5,7% a 8,6% na seqüência de aminoácidos preditos da proteína

Bm86. Foi devido ao alto grau de polimorfismos encontrados na Cepa A (argentina) que GARCÍA-GARCÍA *et al.* (2000) isolaram, clonaram e caracterizaram a nova variante denominada Bm95.

DE LA FUENTE *et al.* (2000) estudaram a variabilidade genética entre populações do México, Cuba, Argentina e Austrália, empregando seqüências derivadas da região que codifica a proteína Bm86. A seqüência do fragmento, localizado entre os nucleotídeos 1674 – 1752 do gene foi analisada para dez populações de *B. microplus* apresentando menos que 1% de variação entre a seqüência de indivíduos da mesma população. Quando se alinharam todas as populações foram encontrados até 7,5% de nucleotídeos variáveis.

O presente trabalho tem a intenção de mostrar a variabilidade genética do antígeno utilizado na vacina entre as populações deste parasito, mais especificamente da porção 4824, que é o principal indutor da produção de anticorpos anti-Bm86 protetores desta vacina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Populações de carrapatos analisadas

As amostras de carrapatos foram provenientes de diferentes regiões brasileiras e de outros países latino-americanos (tabela 2). Elas foram obtidas nos estádios de ovo embrionado; adultos (teleóginas) e larvas vivas ou conservadas em etanol 70%. Aquelas adquiridas na forma de teleóginas foram incubadas em estufa B.O.D a temperatura de 28°C e 80% de umidade relativa para postura; os ovos foram incubados nas mesmas condições até eclosão. Com o intuito de conservar amostras, teleóginas e as larvas foram alíquotadas em criotubos e conservadas em nitrogênio líquido. Amostras remetidas conservadas em álcool 70% foram lavadas em água milliQ, secadas e conservadas em nitrogênio líquido.

Tabela 2: Populações de *B. microplus* utilizadas para análise de polimorfismos.

Origem geográfica			
País	Estado	Município	População
Brasil	Espírito Santo	Alegre	Alegre
		Venda Nova do Imigrante	Vnova
		Betim	Betim
		Montes Claros	MClaros
	Minas Gerais	Bugre	Bugre
		Viçosa	UFV
		São Miguel do Anta	SMA
	São Paulo	Jaboticabal	Jaboti
		São Carlos	Scarlos
		Guararema	Guará
	Rio de Janeiro	São Sebastião do Alto	SSalto

Continua...

Origem geográfica			
País	Estado	Município	População
Brasil	Paraná	Paraíba do Sul	Psul
		Teresina	Teresina
		São Luiz	Sluiz
		Tucuruí	Tucuruí
		Colorado do Oeste	Coeste
		Coxim	Coxim
		Porto Alegre	PAlegre
		Itaqui	Itaqui
		Santana do Livramento	Slivra
		São Gabriel	Sgabriel
	Rio Grande do Sul	Butiá	Butiá
		Las Cejas	La Cejas
		La Paz	La Paz
		Mar das Caraíbas	Cara
		Palma del Vino	PDV
		Mozo	Mozo
		San José	SJose
		Isolado A	VeneA
		Isolado B	VeneB

4.2. Extração de RNA total de *B. microplus*.

O ácido ribonucléico (RNA) de *B. microplus* e demais espécies foram extraídos usando Trizol[®] (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante com algumas modificações.

Aproximadamente 100 mg de larvas de carrapatos foram trituradas com nitrogênio líquido dentro de tubos de polipropileno de 1,8 ml com o auxílio de uma ponteira de 1000 µl com a ponta fechada pelo calor em bico de bunsen até ser obtido um fino pó homogêneo.

Para as amostras que utilizaram exemplares adultos, ½ teleóquina foi triturada em almofariz e o pó transferido para um tubo de 1,8 ml.

Em cada tubo foram adicionados 250 µl de H₂O milliQ tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) e 750 µl do reagente Trizol[®]. Após homogeneização a solução foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Após este passo, 200 µl de clorofórmio

foram adicionados a cada amostra, homogeneizadas por 15 segundos e centrifugadas a 12000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o RNA total foi transferido para um novo tubo e precipitado com 1 ml de isopropanol 100% por 2 horas a -20°C. Posteriormente as amostras foram submetidas à centrifugação por 15 minutos a 12000xg à 4°C. Os “pellets” resultantes de cada amostra foram submetidos a duas lavagens sucessivas com 1 ml de etanol 75% por centrifugação a 9000xg por 10 minutos a 4°C e secos por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram ressuspensos em 20 µl de H₂O milliQ tratada com DEPC por 10 minutos em banho-maria a temperatura de 55°C ou até a dissolução dos “pellets”.

As concentrações e a pureza dos RNAs foram determinadas por espectrofotometria a comprimentos de onda de 260 e 280 nm e armazenadas em freezer -70°C até o uso.

4.3. Síntese de cDNA por RT – PCR.

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com o kit SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) de acordo com a seguinte sequência de passos: na primeira etapa 5 µg de RNA total foram adicionados a 1 µl de oligo d(T) com um volume de água DEPC suficiente para completar 12 µl em tubos de 0,2 ml. A reação foi incubada a 70°C por 10 minutos e posteriormente em banho de gelo por um minuto. Todas as incubações foram feitas no termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems).

Na segunda etapa 7 µl do “mix” contendo 2 µl do tampão RT 10X; 2 µl de MgCl₂ (25 mM); 1 µl de dNTP (10 mM) e 2 µl de DTT (0,1 M) foram adicionados em cada tubo e incubados por 42°C por 5 minutos. Na terceira etapa 0,5 µl de SuperScriptTM II RT foram adicionados em cada tubo, homogeneizados e incubados a 42°C por 50 minutos e em seguida a 70°C por 15 minutos, finalizando com um banho de gelo por 1 minuto.

Na última etapa da reação foi realizado um tratamento com 0,5 µl de RNase H por 20 minutos a 37°C com a finalidade de degradar as fitas de RNA complementares ao cDNA, deixando apenas as fitas de cDNA no produto final. Estes foram estocados a -20°C em tubos de polipropileno de 0,8 ml até o momento do uso.

Não foram realizados tratamentos com DNase após a síntese do cDNA para nenhuma das amostras testadas.

4.4. Amplificação dos fragmentos A e B do gene *bm86*.

Dois pares de primers (tabela 3) foram desenhados através do software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) para flanquear as regiões do gene *bm86* (cepa Yeerongpilly) compreendidas entre os nucleotídeos 1078 a 1477 (fragmento B), que contém a sequência que codifica o peptídeo 4822, e entre os nucleotídeos 278 a 1071 (fragmento A) que contém a sequência que codifica o peptídeo 4824.

As reações de PCR foram definidas com uma temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C por 60 segundos para o fragmento A e 53°C para o fragmento B e 72°C por 60 segundos para extensão das fitas pela *Taq* DNA polimerase. Ao final dos ciclos foi realizada uma extensão final de 7 minutos à 72°C.

As reações foram constituídas por 1X de PCR buffer 10X (100 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl); 2,5 mM de MgCl₂; 0,3 mM de dNTPs; 2 µl do cDNA; 2 U de Platinum® *Taq* DNA Polimerase e 0,4 µM de cada primer em um volume final de 25 µl.

Devido às amostras UFV e Porto Alegre terem sido testadas com a vacina sintética SBm7462, somente essas populações foram submetidas ao PCR como os primers 4822.

Para cada população de *B. microplus* foram feitas três reações independentes e como controle foram efetuadas reações sem cDNA com a finalidade de detectar possíveis contaminações.

Ao término das reações, foram adicionados 4 µl de tampão de amostra tipo IV (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose) em cada tubo, e aplicados em gel de agarose de alta resolução 1,5% em TBE (Tris-borato 0,09 M e EDTA 0,002 M) e corado com brometo de etídio (0,2 µg/ml) e submetidos à voltagem de 120 volts em cuba de eletroforese horizontal. Padrão de tamanho molecular foi corrido em uma das canaletas do gel para identificar a banda de importância.

Tabela 3: Seqüências dos primers utilizados para amplificações dos fragmentos A e B.

Primers	Seqüências 5'- 3'
4824 Forward	GGC AGG TCT GTT TTT GCT CA
4824 Reverse	TGA AAG TAA CCC GAG CAA GG
4822 Forward	GAG GAT CGT GTT TTG GAA GC
4822 Reverse	TGC AAG AAA CTC CAG CTT TAC A

4.5. Purificação dos fragmentos de DNA de géis de agarose.

Devido à amplificação de dois fragmentos pela reação de PCR com cDNA de *B. microplus* (para os primers 4824), foi necessário a extração da banda de interesse do gel de agarose (fragmento A), para posterior clonagem em vetor plasmidial. Para isso foi utilizado o kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). Após a corrida dos produtos de PCR em géis de agarose 1,5%, foram identificadas duas bandas no gel com tamanhos distintos. A banda no gel de tamanho de 794 pb (fragmento A) foi excisada sob luz ultravioleta, com auxílio de uma lâmina de bisturi e condicionada em tubos de 1,8 ml e pesados. Apenas para uma amostra, afim de determinar sua seqüência, foi excisada a banda de 330 pares de bases.

Para cada mg de gel excisado, 1 µl de solução de ligação à membrana fornecida pelo kit foi adicionada. As amostras foram incubadas em banho-maria a 60°C até completa dissolução do gel. As soluções foram transferidas para mini-colunas e incubadas por 1 minuto à temperatura ambiente. Os conjuntos formados pelos tubos coletores e mini-colunas foram centrifugadas por 1 minuto a 10000xg em microcentrífuga descartando-se os líquidos residuais.

Em cada mini-coluna foram adicionados de 700 µl da solução de lavagem de membrana e submetida à centrifugação por 1 minuto a 10000xg. Os líquidos residuais foram descartados e novas lavagens com 500 µl da solução de lavagem foram realizadas por centrifugações de 5 minutos a 10000xg.

As mini-colunas foram montadas em tubos novos de 1,8 ml e foram adicionados 20 µl de água milliQ livre de nuclease. As amostras foram incubadas por 1 minuto à

temperatura ambiente e centrifugadas por 10000xg por 1 minuto. Os líquidos residuais contêm os fragmentos de DNA que foram separados no gel de agarose. As amostras foram conservadas a -20°C até o momento do uso para reação de ligação em vetor plasmidial.

4.6. Produção de Células Competentes DH5

As clonagens dos fragmentos purificados no item 4.5 foram feitas em *E. coli* DH5 . de acordo com INOUE *et al.*(1990).

E. coli DH5 foram ativadas em placa contendo meio LB (10 g de Triptona; 10 g de NaCl; 5 g de Extrato de Levedura; 1,5% de ágar e água milliQ q.s.p 1000 ml) sem antibiótico. Três colônias foram inoculadas em 100 ml de meio SOB (20g de Triptona; 5g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; 10 ml de KCl 0,25 M; 5 ml de MgSO₄ 2 M e 100 µl de NaOH 5 M) em erlenmeyer de 500 ml. As colônias foram crescidas a 18°C sob 150 rpm até atingir uma OD600 igual a 0,6.

Uma vez atingida a OD desejada, a cultura foi transferida para dois tubos falcon de 50 ml, mantidas no gelo por 10 minutos e centrifugadas a 2000xg por 20 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante os “pellets” foram ressuspensos gentilmente em 15 ml de TB gelado ((10 mM de Pipes; 15 mM de CaCl₂ e 250 mM de KCl pH 6.7) + 55 mM de MnCl₂) e incubados no gelo por 10 minutos. Posteriormente, juntando os dois volumes em um único tubo, nova centrifugação a 1000xg por 10 minutos foi realizada e o “pellet” ressuspendido em 8 ml de TB gelado enriquecido com 7% de DMSO e incubado no gelo por 10 minutos. As células foram aliquotadas em volume de 200 µl, congeladas em nitrogênio líquido e armazenada a -70°C.

A eficiência da transformação das *E. coli* DH5 foi calculada através da transformação com o plasmídeo pUC 18. Para realização desse cálculo 0,2 ng do vetor pUC18 foi utilizado para transformar 200 µl de células competentes em 800 µl de meio SOC (20 g de Triptona; 5 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; 10 ml de KCl 0.25 M; 5 ml de MgSO₄ 2 M e 100 µl de NaOH 5 M e 20 ml de glicose 1M). Assim a concentração final do vetor pUC18 é de 0,0002 ng/µl. O protocolo de transformação foi o mesmo utilizado para o vetor pGEM-T, com exceção das placas com LB que não foram enriquecidas com X-gal nem com IPTG (próximo tópico).

Após incubação por 16 horas em estufa à 37°C, a placa foi dividida em quatro quadrantes onde se contou o número de colônias de um quadrante, multiplicando o valor encontrado por quatro, obtendo-se a quantidade final de colônias. O cálculo da eficiência foi realizado pela divisão do número total de colônias (UFC) pela concentração do DNA plaqueado obtendo-se uma eficiência de 6×10^6 UFC/ng do vetor.

4.7. Clonagem dos fragmentos A e B em *E. coli* DH5

O fragmento B contendo o peptídeo 4822 (para as amostras UFV e Porto Alegre) e o fragmento A contendo o peptídeo 4824 (todas as amostras) foram ligados ao vetor pGEM®-T Easy Vector (Promega USA). Esse vetor é preparado pelo corte do pGEM®-T Easy Vector com a enzima de restrição EcoR V e adição nas extremidades 3' de uma timina. Isso aumenta a eficiência de ligação do produto de PCR dentro do plasmídeo, pois as polimerases termoestáveis freqüentemente adicionam uma simples desoxiadenosina no final 3' do fragmento amplificado e ainda impede a sua re-circularização.

Para cada população de *B. microplus* foi feita uma reação de ligação e uma clonagem em *E. coli* DH5 , totalizando 30 clonagens. As reações de ligação foram realizadas em tubos de 0,6 ml e constituíram-se de 5 µl de 2X “Rapid Ligation Buffer” do kit; 0,5 µl (25 ng) de pGEM® - T Easy Vector; 2 µl (50 ng) do produto de PCR; 0,5 µl de T4 DNA ligase e 2 µl de água milliQ autoclavada. As reações foram homogeneizadas, por pipetagem, e mantidas a 4°C por 12 horas para aumentar a eficiência de ligação.

Para as transformações bacterianas seguiu-se o seguinte protocolo: Os tubos, contendo as células competentes, foram retirados do freezer -70°C e colocados em banho de gelo até descongelarem. Posteriormente, 5 µl da reação de ligação foi adicionada em cada tubo, homogeneizado por movimentos gentis e mantidos em banho de gelo por 30 minutos.

Após esse período, as células foram submetidas ao choque térmico à 42°C por 90 segundos. Depois foram adicionados a elas 800 µl de meio SOC e permanecidas por 1 hora a 37°C por 180 rpm em shaker.

Nesse intervalo de tempo, as placas de petri com meio LB sólido, contendo 100 µg/ml de ampicilina, foram suplementadas com 100 µl de IPTG (100 mM) e 20 µl de X-gal (50 mg/ml).

As placas suplementadas com 100 mM de IPTG e 50 mg/ml de X-gal foram semeadas com 100 µl de células transformadas, fechadas, vedadas com filme plástico, invertidas e mantidas à 37°C por 16 a 18 horas.

4.8. Identificação das colônias positivas.

As colônias portadoras do fragmento de interesse foram identificadas pela coloração da colônia e pela técnica de PCR de colônias.

A cor branca que a colônia positiva adquire está relacionada à possibilidade ou não da *E. coli* degradar a galactosidase. As colônias brancas contêm o inserto adicionado ao plasmídeo, interrompendo o gene responsável pela síntese de -galactosidase, enzima capaz de degradar o açúcar X-gal e dar cor azul às colônias negativas.

Outra forma de identificação das colônias positivas, para o inserto de interesse, foi através da PCR, utilizando como molde a própria colônia bacteriana branca. A utilização desta técnica teve como objetivo evitar a seleção de colônias brancas falsas portadoras do inserto de interesse (A ou B).

As reações de PCR foram constituídas por 1X de PCR buffer 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl); 2,0 mM de MgCl₂; 0,3 mM de dNTPs; 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase e 0,4 µM dos primers M13 forward (5' GGTGTAAAACGACGGCCAGT 3') e M13 reverse (5' – CAGGAAACAGCTATGACC - 3') e água milliQ autoclavada para completar um volume final de 25 µl.

As reações foram submetidas a 94°C por 10 minutos, para rompimento das células e desnaturação inicial do molde; 35 ciclos sucessivos a 94°C por 30s; 55°C por 60s e 72°C por e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

De cada placa foram analisadas 4 colônias, das quais, considerou-se positivas, apenas aquelas que apresentaram uma banda, em gel de agarose 1,5%, de tamanho próximo de 800 pb.

4.9. Crescimento bacteriano em meio líquido.

As colônias positivas foram crescidas em 6 ml de meio LB líquido, enriquecido com 100 µg/ml de ampicilina. Com o auxílio de uma alça de platina, em capela de fluxo laminar, na presença de bico de bunsen, as colônias positivas foram transferidas para os tubos, identificadas com o número da colônia e localidade da amostra e colocadas para crescer em shaker, com agitação a 180 rpm à temperatura de 37°C por um período de 12 a 14 horas.

4.10. Congelamento de *Escherichia coli* DH5a contendo os fragmentos A e B.

Após o crescimento em meio LB líquido, uma alíquota de 250 µl das culturas contendo células transformadas com plasmídeos contendo os fragmentos A e B foi adicionada a 750 µl de glicerol, homogeneizada, congelada em nitrogênio líquido e transferidas para racks em freezer -70°C. Esses clones foram estocados para eventuais necessidades de re-extrações de DNA.

4.11. Extração de DNA plasmidial dos clones contendo os fragmentos A e B.

Para descartar possíveis erros de incorporação de nucleotídeos pela *Taq* DNA polimerase e evitar interpretações equivocadas, na edição das seqüências de DNA, foram feitos extração de DNA plasmidial de dois clones independentes, para serem seqüenciados. As extrações foram realizadas utilizando-se o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

O primeiro passo da extração plasmidial foi centrifugar à 10000xg por 5 minutos os tubos contendo as culturas de *E. coli* DH5α e descartar o sobrenadante. Em cada tubo foram adicionados 250 µl da solução de ressuspensão celular o “pellet” dissolvido gentilmente até completa homogeneização. Uma vez transferidos os conteúdos para tubos de 1,8 ml, foram adicionados 250 µl da solução de lise celular. Inverteram-se os tubos quatro vezes, com movimentos suaves, para homogeneizar as soluções e foi feita uma incubação de no máximo 5 minutos, tempo necessário para clarear toda a suspensão.

Posteriormente, foram adicionados 10 µl da solução de proteinase alcalina em cada tubo, homogeneizados por quatro suaves inversões e incubados por 5 minutos (este passo, tem como objetivo, inativar endonucleases e outras proteínas liberadas durante a lise das células bacterianas, que podem interferir na qualidade do DNA isolado). A inativação da proteinase alcalina foi realizada pela adição 350 µl da solução de neutralização em cada tubo e homogeneizado por quatro inversões suaves. O conteúdo final foi centrifugado a 14000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente.

Os sobrenadantes, contendo o DNA plasmidial, foram transferidos para as mini-colunas, previamente montadas nos tubos coletores, e submetidas à centrifugação por um minuto a 14000xg. Os resíduos, nos tubos coletores, foram descartados e as mini – colunas lavadas com 750 µl da solução de lavagem e submetidas à centrifugação por um minuto. O mesmo passo foi repetido, porém com 250 µl da solução de lavagem, e centrifugação por 2 minutos.

As eluições dos DNAs, presente nas colunas, foram realizadas com 50 µl de água livre de nuclease, em novos tubos, por centrifugação de um minuto à 14000xg.

Os DNAs foram quantificados por espectrofotometria, a comprimentos de onda de 260, 280 e 320 nm, e por eletroforese em gel de agarose, com padrões de concentração molecular. O DNA foi estocado em racks à -20°C até o momento do uso para sequenciamento.

4.12. Sequenciamento das amostras.

As análises dos clones foram realizadas e MegaBace1000 (Amersham Biosciences) pelo método enzimático descrito por SANGER *et al.* (1977), onde cada clone foi sequenciado duas vezes utilizando-se o primer M13 forward e duas reações utilizando-se o primer M13 reverse

Para o sequenciador ABI310, as reações de sequenciamento foram constituídas de 2 µl de tampão *save money* (200 mM Tris pH 9,0; 5 mM MgCl₂); 1 µl do primer (M13 forward ou M13 reverse 10µM); 0,7 µl do Kit Big Dye Terminator (dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq gold DNA polimerase, MgCl₂ e Tampão Tris-HCl); 5,3 µl de água milliQ e 100 ng de DNA totalizando um volume final de 10 µl.

As reações de amplificação foram conduzidas pela amplificação linear por PCR, usando o termociclador (MJ Research, Inc), modelo PTC-100, programado conforme o esquema na tabela 4.

Tabela 04: Programa utilizado para reação de sequenciamento com o seqüenciador ABI310.

Passo	Temperatura	Tempo
1	96°C	20 segundos
2	- 46°C	1°C a cada segundo
3	50°C	10 segundos
4	10°C	1°C a cada segundo
5	60°C	4 minutos
6	44 vezes para passo 1	
7	4°C	Infinito

As reações de sequenciamento foram purificadas utilizando-se o seguinte protocolo: A cada amostra foram adicionados 72 µl de isopropanol 75% mais 18 µl de água milliQ. Os tubos contendo os produtos da reação foram agitados por cinco segundos e centrifugados a 10000xg por 10 segundos para recolher todo o conteúdo da parede. Estes foram mantidos a temperatura ambiente por 20 minutos. Após este tempo foram centrifugados a 10000x gpor 30 minutos. Este passo tem a finalidade de precipitar todo o DNA contido na reação.

Posteriormente, foram feitas três lavagens sucessivas com etanol 70%. Em cada tubo foram adicionados 200 µl do álcool. As soluções foram agitadas e centrifugadas por cinco minutos a 10000xg. De todos os tubos, o sobrenadante foi descartado.

Os “pellets” foram secos à 50°C, até evaporar todo líquido e ressuspendidos em 25 µl de formamida HI-DI, por agitação, e desnaturados por 5 minutos a 95°C em termociclador. Posteriormente as amostras foram encaminhadas ao seqüenciador automático ABI310.

Para o MegaBace1000, as reações de sequenciamento foram feitas em placas de 96 “wells” constituídas de 4 µl de DYEnamic ET Kit reagent premix (Amersham Biosciences), 2 µl dos primers (M13 forward ou M13 reverse 10 µM), 2 µl de DNA

plasmidial (100 ng/μl) e 2 μl de água milliQ autoclavada, totalizando um volume final de 10 μl em cada “well”.

As reações de amplificação foram conduzidas pela amplificação linear por PCR, usando o termociclador (MJ Research, Inc), modelo PTC-100, de acordo com o seguinte programa: 29 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 80 segundos.

A precipitação, purificação e ressuspensão das amostras foram realizadas de acordo com o seguinte protocolo: Em cada “well” foi adicionado 1 μl de acetato de amônio e o conteúdo misturado por leves batidas da placa na bancada. Depois, 80 μl de etanol absoluto foram adicionados por “well”. A placa foi agitada e um “spin” realizado para recolher o conteúdo das paredes dos poços. Fez-se uma incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. Por 45 minutos, foi realizada uma centrifugação a 10000xg e o sobrenadante descartado sobre papel toalha. Os “pellets” foram lavados com 100 μl de etanol 70% adicionados lentamente na parede dos poços e centrifugação a 10000xg por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e a placa submetida a um “spin”. O líquido residual foi deixado evaporar, por 10 minutos, com a placa coberta com papel alumínio. Os “pellets” foram ressuspensos em 10 μl de loading buffer (Amersham Biosciences), vortexados por 2 minutos, submetidos a um “spin” e analisados em seqüenciador automático MegaBace1000®.

4.13. Análises dos dados.

As quatro reações de sequenciamento de cada clone foram analisadas em conjunto pelo Programa *Seqman* do pacote DNASTAR (DNASTAR Inc.) comparando os eletroferogramas com as seqüências nucleotídicas e editando-as manualmente.

A busca de similaridades com seqüências estocadas no GenBank™ foi através do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) desenvolvido por ALTSCHUL *et al.*(1990). O alinhamento das seqüências nucleotídicas com dedução dos aminoácidos correspondentes foram realizados no software BioEdit® versão 5.0.5.(HALL, 1999).

A análise de polimorfismos nas seqüências nucleotídicas e de aminoácidos deduzidos foram realizadas manualmente e os valores transferidos para uma planilha Excel para determinar a percentagem de polimorfismos de cada população.

Para evidenciar a relação de parentesco entre os pares de seqüências de nucleotídeos das populações de *B. microplus* analisadas neste estudo, foi utilizado o programa TCS (Versão 1.18), desenvolvido por CLEMENT *et al.* (2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Polimorfismos no gene *bm86*

Para a análise de polimorfismos do gene e da proteína Bm86 nós selecionamos 30 amostras de *B. microplus* cobrindo todas as regiões geográficas brasileiras que apresentam diferentes particularidades ambientais, tais como clima e relevo, além de amostras deste carrapato de outros países latino-americanos (tabela 2). Este estudo tem sido, até então, o que avaliou o maior número de populações deste carrapato para polimorfismos no locus *bm86*, o que aumenta a probabilidade de mapear alelos divergentes que inferiram na história e nos processos evolutivos dos polimorfismos observados (ESCARLANTE *et al.*, 2001).

Vários trabalhos têm sido propostos com a finalidade de mostrar variabilidade genética entre populações de *B. microplus*. Análises de RFLP, RAPD, sequenciamento de genes responsáveis por resistência a acaricidas e do gene da glicoproteína intestinal Bm86 utilizadas como antígeno vacinal, os quais vem mostrando variações genéticas entre populações deste carrapato podendo estar relacionadas à isolamento geográfico das populações ou pressões seletivas do ambiente (PASSOS *et al.*, 1999, HERNANDEZ *et al.*, 1998 e 2000, BAXTER e BARKER, 1998, GUERRERO *et al.*, 2001; GARCÍA – GARCÍA *et al.*, 1990 e 2000; DE LA FUENTE *et al.*, 2000).

A intenção de avaliar a variabilidade genética dentro do locus *bm86* é devido ao aparecimento de eficiências variáveis de vacinas recombinantes derivadas das proteínas Bm86 e Bm95 em populações distintas de *B. microplus* (COBON *et al.*, 1995; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, (1999 e 2000). Esses efeitos vacinais variáveis podem estar relacionados a

variações devido a mudanças de aminoácidos na proteína “in vivo” no carrapato, levando à diminuição da especificidade dos anticorpos produzidos pelo hospedeiro bovino a essa proteína. Isso ocasionaria menores efeitos deletérios às microvilosidades intestinais, que são os locais onde essas proteínas se encontram, afetando negativamente no efeito esperado da vacinação nesses parasitos. Assim sendo, todos os antígenos recombinantes derivados da proteína Bm86 e suas variantes parecem ter propriedades imunogênicas, mas variam na capacidade antigênica em produzir anticorpos protetores (GARCÍA – GARCÍA *et al.*,1999).

Variações genéticas dessas proteínas podem provocar mudanças fisiológicas afetando o tempo da ingestão de sangue, diminuindo sensivelmente a concentração imunoglobulinas e outros elementos que afetariam negativamente os resultados da vacinação (WIKEL, 1999, LAWRIE *et al.*,1999). Outro fato seria a grande quantidade de epitopos antigênicos existentes numa longa proteína recombinante para limitada quantidade de moléculas de MHC (WIKEL, 1996).

A sequência parcial de 794 pb amplificada (fragmento A) de todas as populações (figura 1A e 1B e 3) corresponde a 35,7% da sequência completa do gene *bm86* (tamanho total 2225 pb) e a sequência de 263 aminoácidos deduzidos que equivale a 40,46% da proteína total (650 aminoácidos). Esta sequência inicia-se no nucleotídeo 278 do gene e termina no nucleotídeo 1071. A proteína inicia-se no aminoácido 83 (ácido glutâmico) e termina no aminoácido 263 (treonina).

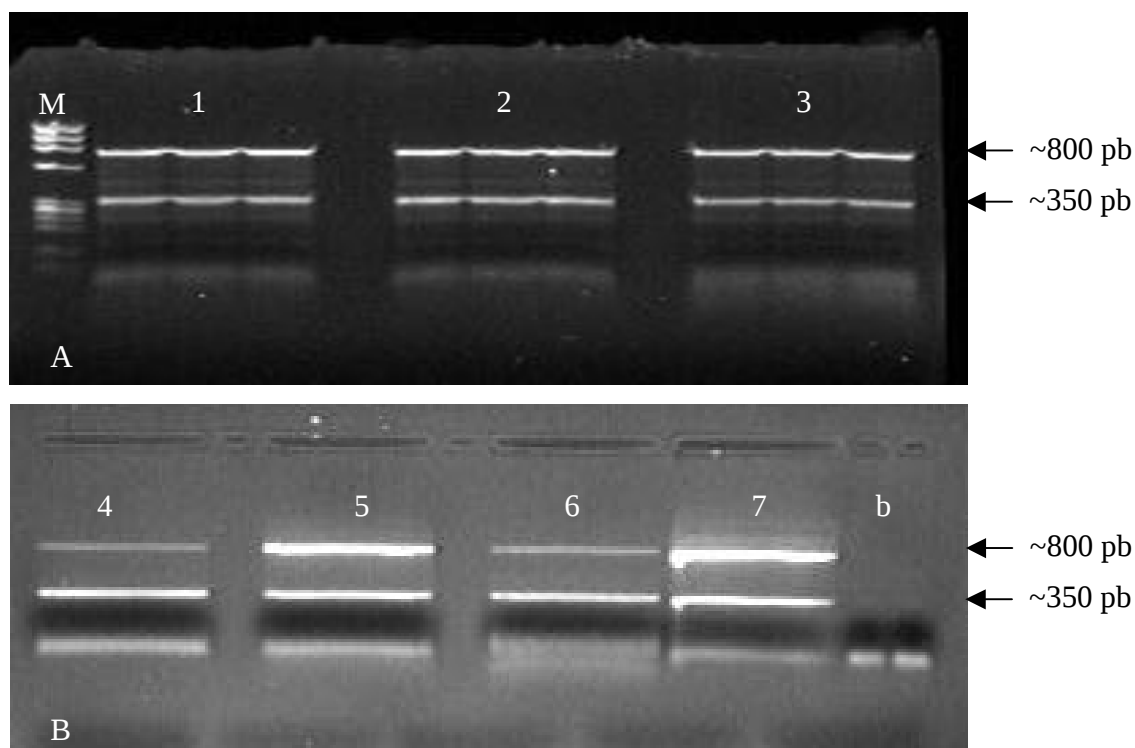


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados de sete diferentes populações de *B. microplus* com os primers 4824 forward e 4824 reverse.. M) Marcador de Tamanho; A: Linhas 1) Amostra UFV; 2) Amostra Porto Alegre; 3) Amostra Las Cejas; B: Linhas 4) Amostra Mozo; 5) Amostra San José; 6) Amostra Tucuruí; 7) Amostra Piauí; b) Branco.

A segunda região amplificada apresentou um tamanho de 330 nucleotídeos (figura 1). Esse fragmento foi visto em todas as reações de PCR, para todas as populações analisadas. A única população analisada para este fragmento foi a Alegre e sua sequência não revelou nenhuma similaridade com sequências estocadas no GenBankTM. Devido não termos realizado o tratamento das amostras de cDNA com DNase, este material amplificado deve ser do DNA genômico de *B. microplus*, sendo uma sequência ainda não reportada deste parasito.

A região de 399 pb (fragmento B) amplificada das populações UFV e Porto Alegre (figuras 2 e 4) renderam ao sequenciamento um fragmento do gene de 257 pb (11,55% do gene total) iniciando-se na posição 1124 e terminando na posição 1381 do gene *bm86*. A

proteína deduzida equivale a 12,7% da proteína total (83 aminoácidos) iniciando-se na alanina da posição 366 e terminando na tirosina da posição 449 da proteína Bm86.

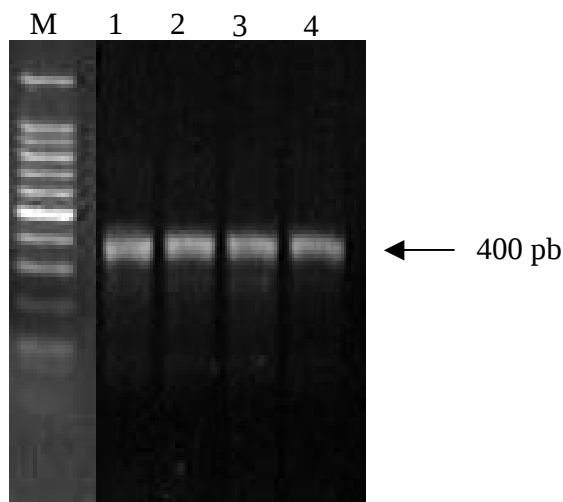


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 1,5% do fragmento B de duas diferentes populações de *B. microplus* com os primers 4822 forward e 4822 reverse. Linhas 1 e 2) Amostra Porto Alegre; 3 e 4) Amostra UFV; M) Marcador de Tamanho de 100 pb.

Para todas as populações dois clones independentes foram analisados, sendo cada um seqüenciado duas vezes. Embora a maioria das populações se mostrarem homozigóticas para o alelo *bm86*, algumas se apresentaram heterozigóticas, sendo encontrados dois alelos divergentes entre si (figura 3 e tabela 6). Nas populações que apresentaram apenas um alelo expresso mostraram variações de 1,76% a 3,65% e 0,50% a 3,15% quando comparadas com os genes *bm86* e *bm95* respectivamente e 3,42% a 6,08% e 1,14% a 4,56% quando comparadas com as proteínas Bm86 e Bm95 respectivamente (tabela 5).

Neste trabalho, as variações encontradas na proteína Bm86 das populações analisadas, em sua grande maioria, foram inferiores às encontradas nas amostras mexicana Tuxpan (5,7%), (CANALES *et al.*, 1997), australiana YBm22M8 (5,7%) (COBON *et al.*, 1996), argentina Cepa A (8,9%); porém nesses trabalhos apenas um fragmento de 35 aminoácidos foi analisado correspondendo a apenas 5% da proteína total. Em amostras que tiveram 610 aminoácidos analisados a taxa de variação na proteína Bm86 variou de 0,2% no estoque cubano da cepa Yeerongpilly (PENICHET *et al.*, 1994) até 3,4% na CepaA (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 1999). Em nosso trabalho, analisando 263 aminoácidos da

proteína em comparação com a proteína Bm86, obtivemos resultados maiores aos descritos na literatura. Avaliando com a Bm95 encontramos valores de até 4,56% de polimorfismos na sequência protéica.

Nas populações heterozigóticas, cada alelo foi identificado com o nome da amostra adicionada dos números 01 e 02 a fim de diferenciá-los. As populações heterozigóticas e as taxas de polimorfismos entre seus alelos são mostradas na tabela 6. Achado similar foi verificado com a Cepa A (Argentina) onde foram encontrados dois alelos, BmA1 e BmA2, que diferiram em quatro nucleotídeos entre si (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000).

É chamada a atenção para a população Alegre, que tem mostrado dois alelos bastantes distintos dos demais analisados e também para o alelo 01 da população Betim. Devido à falta de informações mais precisas sobre os mecanismos de expressão da proteína Bm86, quanto a mecanismos pós-transducionais, não se sabe se esses são apenas alelos divergentes ou casos de duplicação gênica com a expressão num mesmo indivíduo de proteínas parálogas. Esta teoria tem sido indicada para duas principais famílias de proteínas de carrapatos: A primeira é uma semelhante a família dos inibidores de tripsina pancreática bovina (BPTI-like) e a outra a família das lipocalinas (MANS e NEITZ, 2004). Entretanto, para homologar esta teoria, novas pesquisas devem ser conduzidas em *B. microplus*, principalmente com o gene *bm86*.

Para as populações Alegre e Betim, devido as altas taxas de variações de seus alelos e proteínas expressas comparadas com os genes e proteínas Bm86 e Bm95 utilizadas como padrões, descrevemos como sendo portadoras de uma nova variante da Bm86 denominada BmIP (acesso GenBankTM AY766042; AY766043 e AY785796).

		280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	
Bu86	278	TCGAAAGTACCCGAGCGAGGCTAGCTGCGTCTGCGAGGCTGCGGACGATCTACGCTACAGTGCAGAAATTAAGAAATGACTGCGACCTGACTGCGGAAAT	377									
Bu95	278	G.....CG.....	C 377									
LasCejas	278	G.....	C 377									
LaPaz	278	G.....	C 377									
PDV	278	G.....	C 377									
Cara01	278	G.....	C 377									
Cara02	278	G.....	C 377									
Venezua	278	G.....	C 377									
VenezuaB	278	G.....	C 377									
SJose01	278	G.....	C 377									
SJose02	278	G.....	C 377									
Bozo	278	G.....	C 377									
Tucurui	278	G.....	C 377									
Rondonia	278	G.....	C 377									
Itaquí	278	G.....	C 377									
Livronne	278	G.....	C 377									
Butia	278	G.....	C 377									
SGabriel	278	G.....	C 377									
Portore	278	G.....	C 377									
Coxim	278	G.....	C 377									
Teresina	278	G.....	C 377									
SLuiz	278	G.....	C 377									
Betim1	278	G.....	C 377									
Betim2	278	G.....	C 377									
Bugre1	278	G.....	C 377									
Bugre2	278	G.....	C 377									
UFV	278	G.....	C 377									
SEA	278	G.....	C 377									
Jaboti	278	G.....	C 377									
SCarlos	278	G.....	C 377									
Guararema	278	G.....	C 377									
PSul	278	G.....	C 377									
Ssalto	278	G.....	C 377									
Alegre2	278	G.....T.....AC.....C.....G.....C.....G.....	C 377									
Alegre1	278	G.....T.....	C 377									
McLaros1	278	G.....	C 377									
McLaros2	278	G.....	C 377									

Continua...

		360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470
Bn86	378	CGAGGTGGCCTGCTAGTTCGCGACGGATGGGTTTATTCGCGCARG	CTGTGACTGTGTGTGATGGGTCGCGATGACATGACCCACCGG	ACTGTGTGCC	477								
Bn95	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
LasCejas	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N K T T R	X C V	477								
LaPaz	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N K T T R	X C V	477								
PDV	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N K T T R	X C V	477								
Cara01	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Cara02	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
VenezuA	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
VenezuB	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
SJose01	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N K T T R	X C V	477								
SJose02	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A V Y K T T R	X C V	477								
Nozo	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Pucurui	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Rondonia	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Itaguai	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Livrame	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N K T T R	X C V	477								
Butia	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N K T T R	X C V	477								
SGabriel	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Portore	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Coxin	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Teresina	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
SLuiz	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N K T T R	X C V	477								
Betin1	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N K T T R	X C V	477								
Betin2	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N K T T R	X C V	477								
Bugre1	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Bugre2	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
UFV	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
SMR	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Jahoti	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
SCarlos	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N K T T R	X C V	477								
Guararema	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N K T T R	X C V	477								
FSul	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Ssalto	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N S E T T R	X C V	477								
Alegre2	378	A.T. T.	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Alegre1	378	A.T.	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Nclaros1	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N E T T R	X C V	477								
Nclaros2	378	R G G T A K L R T D G F I G A T	C D C G E W G A N N K T T R	X C V	477								

Continua...

		430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	
Bn86	478	CTACCGGCTCTTCGTCGCTGACCTGCAAGAGCCTCTGCGAGAAAGCCTGCTTCAGAGGGATCTCGTGTGCGAGGGGTGGACACACGCA	577														
Bn95	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
LasCejas	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
LaPaz	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
PDV	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Cara01	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Cara02	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Venezua	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
VenezuB	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
SJose01	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
SJose02	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Mozo	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Tacurui	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Rondonia	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Itaguai	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Livrame	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Butia	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
SGabriel	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Portore	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Coxin	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Teresina	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
SLuiz	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Betin1	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Betin2	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Bugre1	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Bugre2	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
UEV	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
SEB	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Jahoti	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
SCarlos	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Guararema	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
PSul	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Ssalto	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Alegre2	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
Alegre1	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
McLaros1	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														
McLaros2	478	P T T C L R P D L T C K D L C E E N L L Q R D S R C C Q G G V N T A N	577														

Continua...

	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	
Bn06	578	C	T	G	T	C	A	G	C	C	677
Bn95	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
LasCejas	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
LaPaz	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
FDV	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Cara01	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Cara02	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Venezua	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
VenezuaB	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
SJose01	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
SJose02	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Mo20	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Tucurui	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Rondonia	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Itaquí	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Livrame	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Butia	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
SGabriel	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Portore	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Coxin	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Terosina	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
SLuiz	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Betin1	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Betin2	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Bugre1	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Bugre2	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
UFV	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
SM	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Jahoti	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
SCarlos	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Guararema	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
FSul	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Ssalto	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Alegre2	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
Alegre1	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
McLaros1	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677
McLaros2	578	C	S	A	A	P	P	A	D	S	677

Continua...

		650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770			
Bu86	678	TTTGTCTGCAGCATGGATGCAAGGTGCAACGGCGAGGCGTACGAGTGCACCTGCGCGAGTGGCTCTACGGTGGCGGAGATGGCATTACCTGC	AAAAGTA	777													
Bu95	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
LasCejas	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
LaPaz	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
PDV	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Cara01	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Cara02	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Venezua	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
VenezuB	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
SJose01	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
SJose02	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Mozo	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Tucuru	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Rondonia	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Itaqui	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Livrame	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Butia	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
SGabriel	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Portore	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Coxim	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Terezina	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
SLuiz	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Betim1	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Betim2	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Bugre1	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Bugre2	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
UEV	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
SGA	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Jaboti	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
SCarlos	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Guararema	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
PSul	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Saalto	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Alegre2	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
Alegre1	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
McIaros1	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777
McIaros2	678	FVVCXKHGC	CRST	D	KA	YE	CT	CP	SG	ST	V	A	ED	GI	TC	KS	777

Continua...

		760	770	780	790	800	810	820	830	840	850	860	870	
Bu86	778	TTTCGACACGCTCAGCTGCACTGCTGAGCAAAACAGACCTGCGCCGACCGGAGACTGTCGTGTCACAAAGGACTGTGTGTGTGAGTGCCTG	877											
Bu95	778	I S H T V S C T A E O K O T C R P T E D C R V H K G T V L C E C P W	877											
LasCajas	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
LaPaz	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
PDV	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Cara01	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Cara02	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Venezua	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
VenezuB	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
SJose01	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
SJose02	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Mozo	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Tucumari	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Romdonia	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Itaquí	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Livramento	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Butia	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
SGabriel	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Portore	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Coxim	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Teresina	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
SLuiz	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Betim1	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Betim2	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Bugre1	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Bugre2	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
UFV	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
SEB	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Jaboti	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
SCarlos	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Guararema	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
PSul	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Ssalto	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Alegre2	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
Alegre1	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
McLaros1	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											
McLaros2	778	I S Y T V S C T V E Q K Q T C R P T E D C R V Q K G T V L C E C P W	877											

Continua...

		880	890	900	910	920	930	940	950	960	970	
Bm86	878	GATPCACATCTAGTGGGACACGTCATATGCTGTTGGTCGACAGGAATGCCACGAGCAATTATGGACGTGTGGCTATATGGAATCGACAGGC	977									
Bm95	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
LasCejas	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
LaPaz	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
PBV	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Cara01	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Cara02	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Venezua	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
VenezuaB	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
SJose01	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
SJose02	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Bozo	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Tucurui	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Rondonia	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Itaqui	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Liviane	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Butia	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
SGabriel	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Portore	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Coxim	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Teresina	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
SLuz	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Betim1	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Betim2	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Bugre1	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Bugre2	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
UFV	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
SMA	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Jaboti	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
SCarlos	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Guararema	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
PSul	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Ssalto	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Alegre2	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
Alegre1	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
McLaros1	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									
McLaros2	878	X Q H L V G D T C I S D C V D K K C H E E F H D C G V Y H H R Q S	977									

Continua...

	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070
Bm86	978	TGCATTTGTCCTATGGAATPCRMGGAGGCGGGGCCCAATGTGCAACATCAATGATGCTCTACGAAATGAGTATTACTACACGGGTCTCTCACC								
Bm95	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
LasCejas	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E R L L D E Y Y Y T V S Y T								
LaPaz	978	C Y R P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
PDV	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Cara01	978	C Y C P U K S R K P G A D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Cara02	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Venezua	978	C Y R P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
VenezuaB	978	C Y R P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
SJose01	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
SJose02	978	C Y R P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Bozo	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Tucuru	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Rondonia	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Itaqu	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Livrame	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Butia	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
SEgabriel	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Portore	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D K C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Coxim	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Teresina	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
SLuiz	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Betim1	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T L S Y T								
Betim2	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Bugre1	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Bugre2	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
UFV	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
SLA	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Jaboti	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
SCarlos	978	C Y R P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Guararema	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
PSul	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Ssalto	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Alegre2	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
Alegre1	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
McLaros1	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								
McLaros2	978	C Y C P U K S R K P G P D V D I D E C L L D E Y Y Y T V S Y T								

Continua...

Figura 3: Alinhamento das seqüências parciais do gene *bm86* compreendidos entre os nucleotídeos 278 a 1071 e das seqüências proteicas preditas compreendidos entre os aminoácidos 83 a 346 de diferentes populações de *B. microplus* em comparação com as amostras padrões Bm86 e Bm95 Yeerongpilly e Cepa A respectivamente. Os nucleotídeos idênticos ao padrão Bm86 são indicados por pontos, os diferentes pelos nucleotídeos correspondentes. O retângulo indica a seqüência correspondente ao peptídeo 4824 da vacina sintética SBm7462[®], com os aminoácidos polimórficos em relação a Bm86 sublinhados. As duas seqüências destacadas são de populações testadas com esta vacina.

Tabela 5: Avaliação de polimorfismos no gene *bm86* e proteína Bm86 de *B. microplus*

	Diferenças na Sequência				Diferenças na Sequência				Número de
	Padrão Bm86				Padrão Bm95				acesso
	Mutação		Mutação		Mutação		Mutação		GenBank™
	nucleotídeos/Total		aminoácidos/Total		nucleotídeos/Total		aminoácidos/Total		
	(%)		(%)		(%)		(%)		
Alegre (01)	19/794	(2,39)	14/263	(5,32)	18/794	(2,27)	10/263	(3,80)	AY766043
Alegre (02)	29/794	(3,65)	16/263	(6,08)	25/794	(3,15)	12/263	(4,56)	AY766042
VNI	14/794	(1,76)	9/263	(3,42)	4/794	(0,50)	3/263	(1,14)	AY766041
Betim (01)	20/794	(2,52)	16/263	(6,08)	12/794	(1,51)	10/263	(3,80)	AY785796
Betim (02)	14/794	(1,76)	9/263	(3,42)	4/794	(0,50)	3/263	(1,14)	AY785797
MClaros (01)	15/794	(1,89)	10/263	(3,80)	5/794	(0,63)	4/263	(1,52)	AY785789
MClaros (02)	17/794	(2,14)	10/263	(3,80)	7/794	(0,88)	4/263	(1,52)	AY787167
Bugre (01)	17/794	(2,14)	10/263	(3,80)	7/794	(0,88)	4/263	(1,52)	AY785798
Bugre (02)	18/794	(2,27)	11/263	(4,18)	8/794	(1,01)	5/263	(1,90)	AY785799
UFV	18/794	(2,27)	10/263	(3,80)	8/794	(1,01)	4/263	(1,52)	AY785800
SMA	18/794	(2,27)	10/263	(3,80)	8/794	(1,01)	4/263	(1,52)	AY785801
Jaboticabal	19/794	(2,39)	13/263	(4,94)	9/794	(1,18)	7/263	(2,66)	AY785802
São Carlos	16/794	(2,01)	10/263	(3,80)	6/794	(0,75)	4/263	(1,52)	AY785803
Guararema	14/794	(1,76)	9/263	(3,42)	4/794	(0,50)	3/263	(1,14)	AY785804
S. S. do Alto	16/794	(2,01)	11/263	(4,18)	5/794	(0,63)	4/263	(1,52)	AY785788
Paraíba Sul	14/794	(1,76)	9/263	(3,42)	4/794	(0,50)	3/263	(1,14)	AY785786
Teresina	15/794	(1,89)	9/263	(3,42)	5/794	(0,63)	3/263	(1,14)	AY785805
São Luiz	18/794	(2,27)	12/263	(4,56)	8/794	(1,01)	6/263	(2,28)	AY785787
Tucuruí	15/794	(1,89)	9/263	(3,42)	5/794	(0,63)	3/263	(1,14)	AY785806
Rondônia	17/794	(2,14)	11/263	(4,18)	7/794	(0,88)	5/263	(1,90)	AY785807
Coxim	16/794	(2,01)	11/263	(4,18)	6/794	(0,75)	5/263	(1,90)	AY785790
Itaqui	15/794	(1,89)	10/263	(3,80)	5/794	(0,63)	4/263	(1,52)	AY785791
Livramento	14/794	(1,76)	9/263	(3,42)	4/794	(0,50)	3/263	(1,14)	AY785792

Continua...

	Diferenças na Sequência				Diferenças na Sequência				Número de
	Padrão Bm86				Padrão Bm95				acesso
	Mutação		Mutação		Mutação		Mutação		GenBank™
	nucleotídeos/Total		aminoácidos/Total		nucleotídeos/Total		aminoácidos/Total		
	(%)		(%)		(%)		(%)		
São Gabriel	18/794	(2,27)	11/263	(4,18)	8/794	(1,01)	5/263	(1,90)	AY785794
Butiá	14/794	(1,76)	9/263	(3,42)	4/794	(0,50)	3/263	(1,14)	AY785793
La Paz	16/794	(2,01)	11/263	(4,18)	6/794	(0,76)	5/263	(1,90)	AY766046
Cariabas (01)	15/794	(1,89)	10/263	(3,80)	5/794	(0,63)	4/263	(1,52)	AY766045
Mozo	14/794	(1,763)	9/263	(3,42)	4/794	(0.504)	3/263	(1,14)	AY785785
Porto Alegre	20/794	(2,52)	13/263	(4,94)	10/794	(1.259)	7/263	(2,66)	AY785795
San José (01)	17/794	(2,14)	12/263	(4,56)	7/794	(0.882)	6/263	(2,28)	AY785783
San José (02)	20/794	(2,52)	13/263	(4,94)	10/794	(1.259)	7/263	(2,66)	AY785784
Venezuela A	18/794	(2,27)	12/263	(4,56)	8/794	(1.008)	6/263	(2,28)	AY848824
Venezuela B	15/794	(1,89)	10/263	(3,80)	5/794	(0.630)	4/263	(1,52)	AY848825

Levando-se em consideração os resultados obtidos neste trabalho, com a análise de 263 aminoácidos da proteína Bm86 mostrando variações genéticas entre populações distintas de *B. microplus*, é provável que a utilização de vacinas recombinantes produzidas a partir de uma população isolada de carrapato continue mostrando altas variações na eficiência em controlar o *B. microplus*. Dados obtidos com experimentos utilizando a GAVAC® com a Bm95 recombinante comprovam esta premissa. Em estudos realizados no sul do Brasil, com as amostras São Gabriel e Butiá que apresentaram, segundo nosso estudo, variações de 1,9% e 1,14% respectivamente em relação a Bm95 foram encontrados ineficiências vacinais de 100%. Esses dados demonstram que variações menores que 2,8% na proteína podem resultar em falhas vacinais, contrastando com COBON *et al.*(1995).

São notados que vários códons apresentam mutações silenciosas, ou seja, ocorreram mudanças de nucleotídeos que não resultaram em mudanças dos aminoácidos expressos (figuras 3 e 4). Esses dados levam a crer que certas regiões da proteína são importantes para a sua função biológica, mantendo-se conservadas evolutivamente.

Tabela 6: Análise da diversidade entre as seqüências protéicas e do gene *bm86* das amostras que apresentaram mais de um alelo expresso na população.

Amostra	Diferenças entre Alelos de Mesma População			
	Nucleotídeos		Aminoácidos	
	Número	(%)	Número	(%)
Alegre	26/794	(3,27)	16/263	(6,08)
Betim	8/794	(1,0)	7/263	(2,66)
Montes Claros	4/794	(0,5)	2/263	(0,76)
Mar Cariabas	2/794	(0,25)	1/263	(0,76)
San José	9/794	(1,18)	6/263	(2,28)
Bugre	1/794	(0,12)	1/263	(0,38)

5.2. Polimorfismos no Peptídeo 4824

A vacina sintética SBm7462 (figura 5) é constituída de três determinantes antigênicos da proteína Bm86. O determinante 4823 apresenta-se totalmente idêntico à seqüência homologa da Bm95. Os outros dois peptídeos 4824e 4822 apresentam apenas uma modificação cada. A troca de uma metionina (M) da posição 142 na Bm86 por uma lisina (K) na Bm95 no peptídeo 4824 e a troca de uma histidina (H) da posição 400 da Bm86 (1231 do gene) por uma tirosina (Y) na Bm95 no peptídeo 4822 (figura 4).

Os primeiros testes vacinais realizados com a vacina sintética SBm7462 foram com as amostras de *B. microplus* UFV em bovinos da raça Herford (PATARROYO *et al.*,2002) e Porto Alegre em animais da raça holandesa (COUTO-PIMENTEL *et al.*,2002). Na tabela 7 são mostrados os resultados vacinais com a vacina sintética SBm7462 e a taxa de polimorfismos encontrada no locus *bm86* em relação a Bm86 e Bm95.

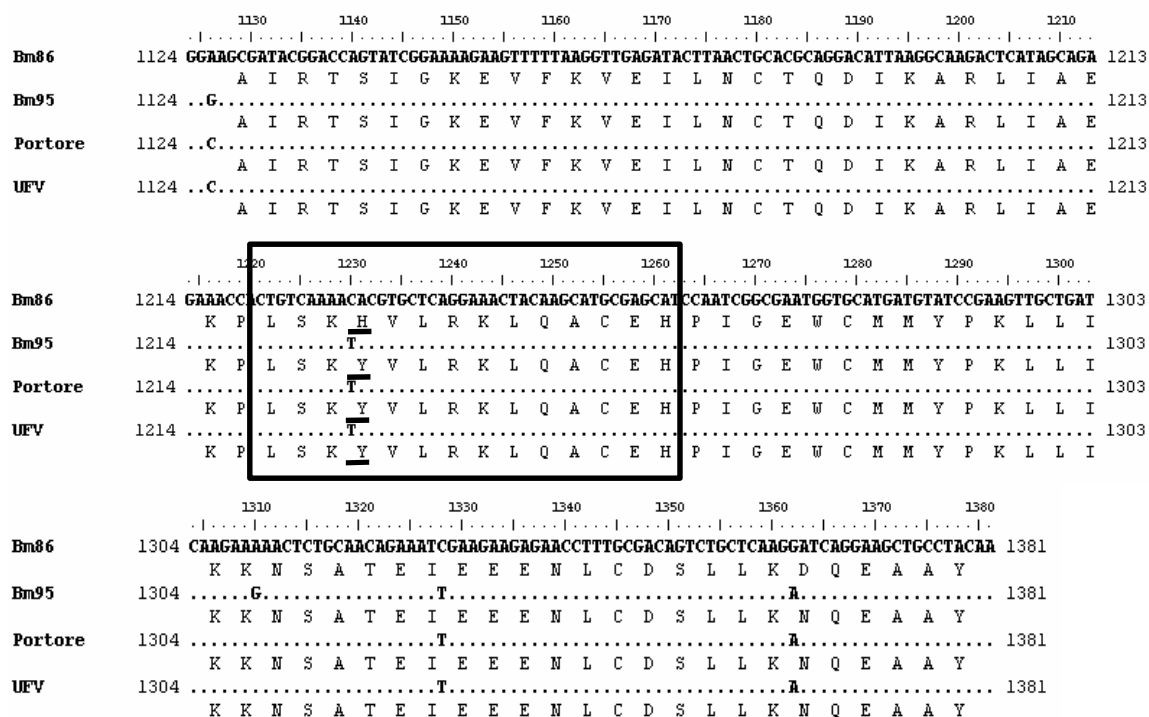


Figura 4: Análise da sequência do gene *bm86* compreendida entre os nucleotídeos 1124 a 1381 e da proteína Bm86 entre os aminoácidos 366 a 449. A região em destaque representa o determinante 4822 das populações Porto Alegre e UFV. Os aminoácidos sublinhados correspondem a única diferença entre as populações.

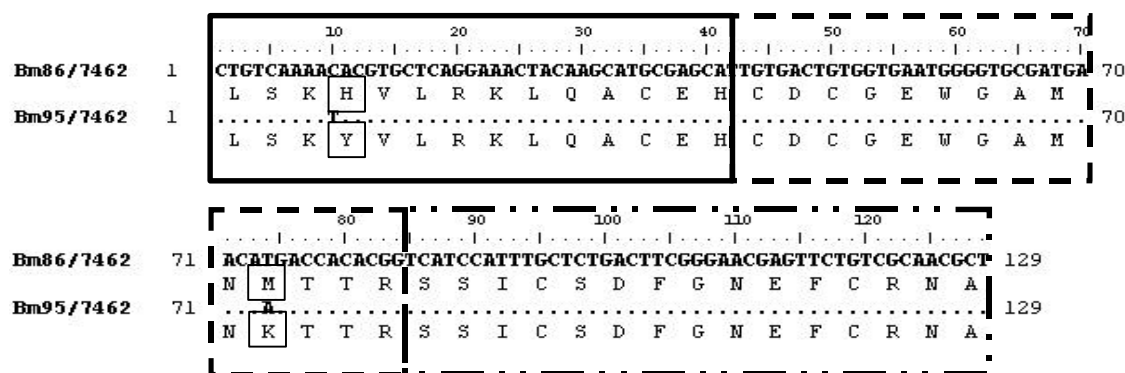


Figura 5: Desenho da vacina sintético SBm7462 comparada com as sequências homólogas da proteína Bm95. O peptídeo 4822 está representado pelo retângulo com linhas cheias, o 4824 com linhas tracejadas e o 4823 com linhas interrompidas. Os aminoácidos em destaque são os que variam entre os determinantes imunogênicos das duas proteínas.

Os resultados obtidos pelas análises dos fragmentos seqüenciados mostraram que as populações UFV e Porto Alegre apresentaram duas variações em relação à seqüência original da vacina sintética SBm7462, que são as diferenças encontradas entre Bm86 e Bm95 (figura 4). Assim sendo, variações de até dois aminoácidos nos determinantes antigênicos da proteína “in vivo” no carrapato, não foram capazes de provocarem falhas vacinais. Isso demonstra que variações que ocorrem fora dos determinantes antigênicos da proteína não influenciariam negativamente nos resultados vacinais. Outro fato de importância é que a vacina sintética SBm7462 foi capaz de controlar populações de carrapatos com polimorfismos de 3,8% até 4,94% na seqüência da proteína intestinal Bm86 enquanto com a vacina recombinante, em populações com variações de 3,4% na proteína “in vivo”, não foram efetivas para controlar o carrapato *Boophilus microplus*.

Tabela 7: Taxa de polimorfismos das amostras testadas com a vacina SBm7462 e eficiência vacinal contra cada amostra.

Comparação das amostras UFV e Porto Alegre X Bm86 e Bm95				
	UFV		Porto Alegre	
	% variação nt	% variação aa	% variação nt	% variação aa
Bm86	2,26	3,8	2,52	4,94
Bm95	1,0	1,52	1,26	2,66
Eficiência SBm7462	81,05%		53%	

Apenas a amostra Alegre clone 02 de *B. microplus* apresentou o determinante 4824 com seqüência idêntica a da vacina sintética SBm7462 (figura 3). Esse dado mostra a completa conservação de determinantes imunoprotetores mesmo em amostras que apresentam altas taxas de polimorfismos na seqüência protéica. O clone 01 desta população de *B. microplus* apresentou apenas a mudança da metionina pela lisina. Nas populações Las Cejas, San José clone 02, São Sebastião do Alto e Itaquí apresentaram duas variações dentro do determinante 4824. A amostra que maior número de modificações apresentou no determinante 4824 foi a San José clone 02 (tabela 8). As demais populações apresentaram apenas a mudança da metionina pela lisina.

Tabela 8: Códon e aminoácidos que variaram dentro do fragmento correspondente ao peptídeo 4824. Os aminoácidos e códon em *itálico* indicam o consenso com as demais amostras. Os nucleotídeos sublinhados indicam o local da mutação no códon.

Posição	Bm86		Bm95		S José 02		S José 01		Las Cejas		S S Alto		Alegre		Itaqui	
	Códon	AA	Códon	AA	Códon	AA	Códon	AA	Códon	AA	Códon	AA	Códon	AA	Códon	AA
433-435	<i>TGT</i>	<i>C</i>					<u>C</u> GT	R							<u>C</u> GT	R
450-452	<i>ATG</i>	<i>M</i>			<u>G</u> TG	V										
453-455	<i>AAC</i>	<i>N</i>			<u>T</u> AC	Y					<u>A</u> GC	S				
456-458	<i>ATG</i>	<i>M</i>	AAG	K									ATG	M		
465-467	<i>CGG</i>	<i>R</i>							<u>C</u> AG	Q						

Análises de conformação do peptídeo sintético com a lisina (K) no lugar da metionina (M) no determinante 4824 leva à mudança estrutural do imunógeno sintético, tornando-o altamente hidrofílico, característica que diminui sensivelmente a capacidade antigênica deste imunógeno. Isso indica que a presença da lisina no determinante 4824 em praticamente todas as populações estudadas não é um fator negativo para o uso do imunógeno sintético SBm7462 para o controle dessas populações de *B. microplus*, como pode ser visto nas populações UFV e Porto Alegre que apresentam a lisina no lugar da metionina (informação pessoal).

5.3. Filogenia entre as populações de *B. microplus* analisadas.

Neste trabalho avaliamos o maior número de populações de *B. microplus* de um continente com análises de praticamente 1/3 da proteína Bm86 total. Em relação à proteína Bm86, encontramos variações médias de 4,14% e de 1,89% para a Bm95 entre as populações de *B. microplus* estudadas. Esses dados confirmam a dedução de incompatibilidade genética entre populações de *B. microplus* da Austrália com populações de outras continentes como o africano e o americano citado por DE LA FUENTE *et al.*,(2000).

Outros trabalhos já foram realizados com a finalidade de mostrar divergências genéticas entre populações de *B. microplus*. BAXTER e BARKER (1999b) mostraram divergências evolucionárias entre populações da Austrália com amostras do México, África e Cuba. PASSOS *et al.*(1998) por meio de estudos de RFLP determinaram diferenças genéticas entre populações gaúchas. HERNANDEZ *et al.*(1998) com estudos de RAPD

encontraram variações entre populações distintas sensíveis e insensíveis à organofosforados. Esses autores atribuem as variações genéticas encontradas à isolamento geográfico.

Analisando o cladograma (figura 6) é notada que a amostra Bm86 (Yeerongpilly) não foi agrupada com as demais populações. Esses dados comprovam a incompatibilidade genética entre *B. microplus* de continentes diferentes. Em coincidência, os dois alelos da população Alegre também não foram agrupados com as demais. Por meio do cladograma foi permitido notar que parece ter havido a divergência de todas as amostras estudadas a partir de um único haplótipo, encontrado nas populações Venda Nova, Livramento, Paraíba do Sul, Butiá, Guararema, Betim e Mozo, das quais todas as demais populações se originaram.

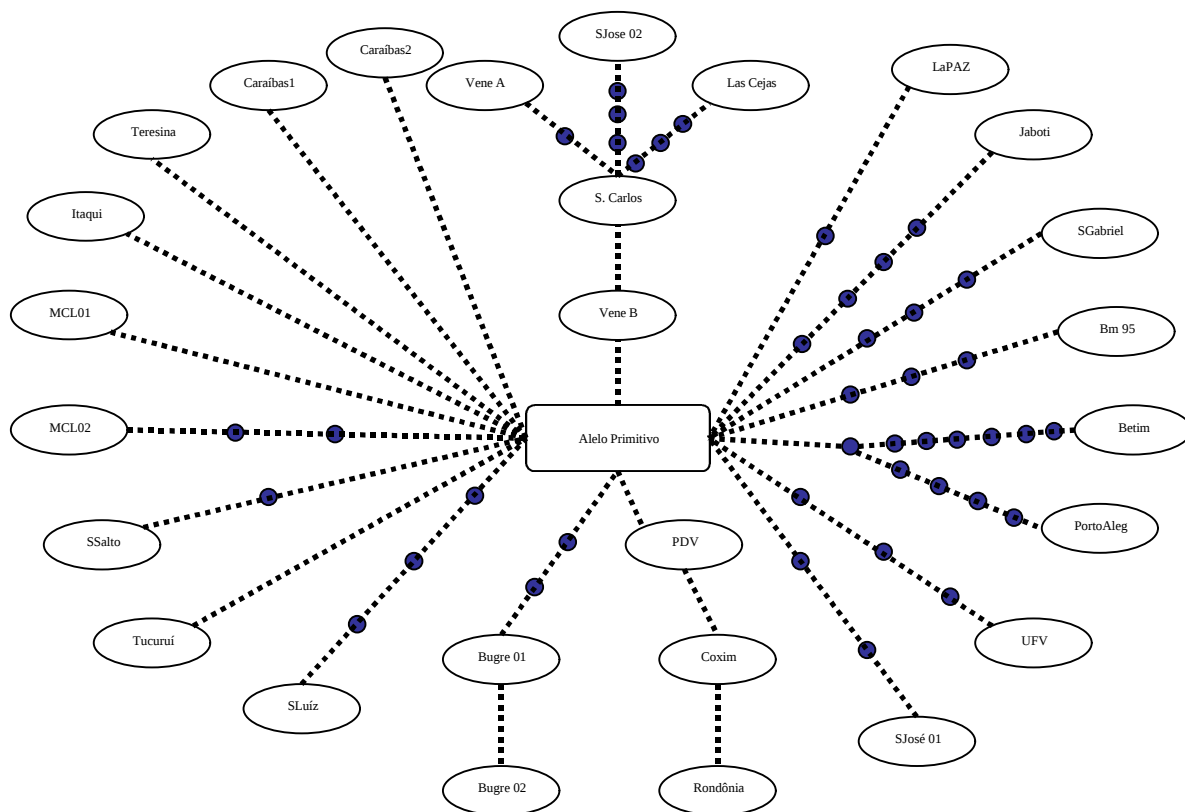


Figura 6: Cladograma construído a partir das seqüências de nucleotídeos do fragmento do gene bm86 pelo software TCS 1.18. O retângulo central representa o haplótipo mais primitivo dos estudados, do qual divergem todos os outros. Os pontos em azul indicam os haplótipos intermediários porque passaram as populações.

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]	[26]	[27]	[28]	[29]	[30]	[31]	[32]	[33]	[34]	[35]	[36]	[37]	
[1]																																						
[2]	0.0202																																					
[3]	0.0176	0.0050																																				
[4]	0.0264	0.0151	0.0101																																			
[5]	0.0176	0.0050	0.0000	0.0101																																		
[6]	0.0214	0.0088	0.0038	0.0139	0.0038																																	
[7]	0.0227	0.0101	0.0050	0.0151	0.0050	0.0013																																
[8]	0.0227	0.0101	0.0050	0.0151	0.0050	0.0088	0.0101	0.0000																														
[9]	0.0227	0.0101	0.0050	0.0151	0.0050	0.0088	0.0101	0.0000	0.0000																													
[10]	0.0239	0.0113	0.0063	0.0164	0.0063	0.0101	0.0113	0.0113	0.0113	0.0113																												
[11]	0.0202	0.0076	0.0025	0.0126	0.0025	0.0063	0.0076	0.0076	0.0076	0.0088	0.0088																											
[12]	0.0176	0.0050	0.0000	0.0101	0.0000	0.0038	0.0050	0.0050	0.0050	0.0063	0.0025	0.0025																										
[13]	0.0189	0.0063	0.0013	0.0113	0.0013	0.0050	0.0063	0.0063	0.0063	0.0076	0.0038	0.0013	0.0013																									
[14]	0.0189	0.0063	0.0013	0.0113	0.0013	0.0050	0.0063	0.0063	0.0063	0.0076	0.0038	0.0013	0.0025	0.0025																								
[15]	0.0214	0.0088	0.0038	0.0139	0.0038	0.0076	0.0088	0.0088	0.0088	0.0101	0.0063	0.0038	0.0050	0.0050	0.0050																							
[16]	0.0202	0.0076	0.0025	0.0126	0.0025	0.0063	0.0076	0.0076	0.0076	0.0088	0.0050	0.0025	0.0038	0.0038	0.0013	0.0013																						
[17]	0.0189	0.0063	0.0013	0.0113	0.0013	0.0050	0.0063	0.0063	0.0063	0.0076	0.0038	0.0013	0.0025	0.0025	0.0050	0.0038	0.0013	0.0025	0.0025	0.0050	0.0038	0.0025	0.0013	0.0000														
[18]	0.0176	0.0050	0.0000	0.0101	0.0000	0.0038	0.0050	0.0050	0.0050	0.0063	0.0025	0.0000	0.0013	0.0013	0.0038	0.0025	0.0013	0.0038	0.0025	0.0013	0.0000																	
[19]	0.0176	0.0050	0.0000	0.0101	0.0000	0.0038	0.0050	0.0050	0.0050	0.0063	0.0025	0.0000	0.0013	0.0013	0.0038	0.0025	0.0013	0.0038	0.0025	0.0013	0.0000	0.0000																
[20]	0.0252	0.0126	0.0076	0.0176	0.0076	0.0113	0.0126	0.0126	0.0126	0.0139	0.0050	0.0076	0.0088	0.0088	0.0113	0.0101	0.0088	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	
[21]	0.0202	0.0076	0.0025	0.0126	0.0025	0.0063	0.0076	0.0076	0.0076	0.0088	0.0050	0.0025	0.0038	0.0038	0.0063	0.0050	0.0038	0.0025	0.0025	0.0025	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	0.0076	
[22]	0.0189	0.0063	0.0013	0.0113	0.0013	0.0050	0.0063	0.0063	0.0063	0.0076	0.0038	0.0013	0.0025	0.0025	0.0025	0.0013	0.0025	0.0013	0.0013	0.0088	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	
[23]	0.0214	0.0088	0.0038	0.0139	0.0038	0.0076	0.0088	0.0088	0.0088	0.0101	0.0063	0.0038	0.0050	0.0050	0.0076	0.0063	0.0050	0.0038	0.0038	0.0113	0.0063	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	
[24]	0.0252	0.0126	0.0076	0.0176	0.0076	0.0113	0.0126	0.0126	0.0126	0.0139	0.0050	0.0076	0.0088	0.0088	0.0113	0.0101	0.0063	0.0076	0.0076	0.0101	0.0101	0.0088	0.0113	0.0113	0.0113	0.0113	0.0113	0.0113	0.0113	0.0113	0.0113	0.0113	0.0113	0.0113	0.0113	0.0113	0.0113	
[25]	0.0227	0.0101	0.0050	0.0151	0.0050	0.0088	0.0101	0.0101	0.0101	0.0113	0.0076	0.0050	0.0063	0.0063	0.0088	0.0076	0.0063	0.0050	0.0050	0.0126	0.0076	0.0063	0.0088	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	
[26]	0.0227	0.0101	0.0050	0.0126	0.0050	0.0088	0.0101	0.0101	0.0101	0.0113	0.0025	0.0050	0.0063	0.0063	0.0088	0.0076	0.0063	0.0050	0.0050	0.0076	0.0063	0.0088	0.0076	0.0101	0.0076	0.0063	0.0088	0.0076	0.0101	0.0076	0.0050	0.0126	0.0050	0.0126	0.0050	0.0126		
[27]	0.0176	0.0050	0.0000	0.0101	0.0000	0.0038	0.0050	0.0050	0.0050	0.0063	0.0025	0.0000	0.0013	0.0013	0.0038	0.0025	0.0013	0.0000	0.0000	0.0076	0.0025	0.0013	0.0038	0.0076	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	0.0050	
[28]	0.0252	0.0126	0.0076	0.0151	0.0076	0.0113	0.0126	0.0126	0.0126	0.0139	0.0101	0.0076	0.0088	0.0088	0.0113	0.0101	0.0088	0.0076	0.0076	0.0151	0.0101	0.0088	0.0113	0.0151	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	0.0126	
[29]	0.0176	0.0050	0.0000	0.0101	0.0000	0.0038	0.0050	0.0050	0.0050	0.0063	0.0025	0.0000	0.0013	0.0013	0.0038	0.0025	0.0013	0.0000	0.0000	0.0076	0.0025	0.0013	0.0038	0.0076	0.0050	0.0050	0.0000	0.0076	0.0050	0.0050	0.0000	0.0076	0.0050	0.0050	0.0000	0.0076		
[30]	0.0227	0.0101	0.0050	0.0151	0.0050	0.0088	0.0101	0.0101	0.0101	0.0113	0.0076	0.0050	0.0063	0.0063	0.0088	0.0076	0.0063	0.0050	0.0050	0.0126	0.0076	0.0063	0.0088	0.0126	0.0101	0.0076	0.0050	0.0126	0.0050	0.0126	0.0050	0.0126	0.0050	0.0126	0.0050	0.0126	0.0050	
[31]	0.0189	0.0063	0.0013	0.0113	0.0013	0.0050	0.0063	0.0063	0.0063	0.0076	0.0013	0.0013	0.0025	0.0025	0.0050	0.0038	0.0025	0.0013	0.0013	0.0063	0.0038	0.0025	0.0050	0.0063	0.0063	0.0038	0.0013	0.0088	0.0013	0.0063	0.0013	0.0088	0.0013	0.0063	0.0013	0.0088		
[32]	0.0202	0.0063	0.0025	0.0126	0.0025	0.0063	0.0076	0.0076	0.0076	0.0088	0.0050	0.0025	0.0038	0.0038	0.0063	0.0050	0.0038	0.0025	0.0025	0.0101	0.0050	0.0038	0.0063	0.0101	0.0076	0.0076	0.0025	0.0101	0.0025	0.0076	0.0038	0.0025	0.0076	0.0038	0.0025	0.0076		
[33]	0.0189	0.0063	0.0013	0.0113	0.0013	0.0050	0.0063	0.0063	0.0063	0.0076	0.0038	0.0013	0.0025	0.0025	0.0050	0.0038	0.0025	0.0013	0.0013	0.0088	0.0038	0.0025	0.0050	0.0088	0.0063	0.0063	0.0013	0.0088	0.0013	0.0063	0.0025	0.0038	0.0025	0.0038	0.0025	0.0038		
[34]	0.0189	0.0063	0.0013	0.0113	0.0013	0.0050	0.0063	0.0063	0.0063	0.0076	0.0038	0.0013	0.0025	0.0025	0.0050	0.0038	0.0025	0.0013	0.0013	0.0088	0.0038	0.0025	0.0050	0.0088	0.0063	0.0063	0.0013	0.0088	0.0013	0.0063	0.0025	0.0038	0.0025	0.0038	0.0025	0.0038		
[35]	0.0365	0.0315	0.0290	0.0378	0.0290	0.0327	0.0340	0.0315	0.0315	0.0353	0.0315	0.0290	0.0302	0.0302	0.0327	0.0315	0.0302	0.0290	0.0290	0.0365	0.0315	0.0302	0.0327	0.0365	0.0340	0.0340	0.0290	0.0365	0.0290	0.0340	0.0302	0.0315	0.0302	0.0302	0.0302	0.0302		
[36]	0.0264	0.0227	0.0202	0.0264	0.0202	0.0239	0.0252	0.0252	0.0252	0.0264	0.0227	0.0202	0.0214	0.0214	0.0239	0.0227	0.0214	0.0202	0.0202	0.0277	0.0227	0.0214	0.0239	0.0277	0.0252	0.0252	0.0202	0.0277	0.0202	0.0252	0.0214	0.0227	0.0214	0.0214	0.0327	0.0327		
[37]	0.0189	0.0063	0.0013	0.0113	0.0013	0.0050	0.0063	0.0063	0.0063	0.0076	0.0038	0.0013	0.0025	0.0025	0.0050	0.0038	0.0025	0.0013	0.0013	0.0088	0.0038	0.0025	0.0050	0.0088	0.0063	0.0063	0.0013	0.0088	0.0013	0.0063	0.0025	0.0038	0.0025	0.0025	0.0302	0.0214	0.0214	
[38]	0.0214	0.0088	0.0038	0.0139	0.0038	0.0076	0.0088	0.0088	0.0088	0.0101																												

Analizando a matriz genética (figura 7) é verificada a maior distância do alelo 2 da população Alegre em relação a Bm86, sendo também a mais distante da Bm95. A matriz mostra também maior proximidade de todas as amostras com a variante Bm95 que com a Bm86. As populações agrupadas como haplotipo primitivo pelo software TCS (figura 6) não apresentaram divergências genéticas entre si (figura 7). Contrariando muitos autores que atribuem o isolamento geográfico como causa de variações genéticas entre populações, encontramos em nossos estudos populações com identidade genética para o gene *bm86* em regiões distintas. Isso demonstra para *B. microplus*, que há fluxo gênico entre as regiões colocando os cruzamentos entre populações como principal mecanismo responsável pelas variações genéticas encontradas.

A análise da diversidade genética entre diferentes isolados de *B. microplus* é importante para o entendimento do processo evolucionário que ocorreu após a separação biogeográfica, sendo também fundamental na implementação de estratégias de controle, bem como na eleição de antígenos candidatos à vacinas.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste experimento, podemos concluir que:

- Entre as amostras de *B. microplus* latino-americanas existem variações dentro do locus *bm86*;
- As amostras latino-americanas se assemelham mais com a variante Bm95 (argentina) do que com a Bm86 (australiana);
- As populações de *B. microplus* Alegre e Betim parecem expressar tipos distintos de Bm86.
- A seqüência de aminoácidos do peptídeo 4824, integrante da vacina sintética SBm7462, mostrou-se conservada na maioria das populações de carrapatos analisadas.
- A vacina sintética SBm7462 foi capaz de controlar populações de *B. microplus* que apresentavam variações de até 4.94% na seqüência da proteína Bm86.
- Todas as populações analisadas parecem ter surgido a partir de um haplótipo primitivo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ACKERMAN, S., FLOYD, M., SONESHINE, D. E. 1980. Artificial immunity to *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae): vaccination using tick antigens. **J. Med. Entomol.**, 17 (5): 391-397.

ALLEN, J. R., HUMPHREY, S. J. 1979. Immunization of guinea-pigs and cattle against ticks. **Nature**, 280(5722): 491 – 493.

ALLEN, J. R.; DOUBE, B. M., KEMP, D. H.; 1977. Histology of bovine skin reactions to *Ixodes holocyclus* Neumann. **Can. J. Comp. Med.**, 41: 26-35.

ALLEN, J. R.; KHALL, H. M., WIKEL, S. K., 1979. Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick-resistant guinea pigs. **The J. of Immunol.**, 122: 563-565.

ALMAZÁN, C., KOCAN, K. M., BERGMAN, D. K., GARCÍA-GARCÍA, J. C., BLOUIN, E. F., DE LA FUENTE, J. 2003. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expresión library immunization. **Vacc.** 21: 1492-1501.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. L. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. **J. Mol. Biol.** 215: 403-410.

BALASHOV, Y. S., 1984. Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. **Ann. Rev. Entomol** 29: 137 – 156.

BALASHOV, Y. S., 1989. Coevolution of ixodid ticks and terrestrial vertebrates. **Parazitol.** 23: 427 – 467.

BARKER, S. C., MURRELL, A., 2002. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. **Exp. Appl. Acarol**, 28: 55-68.

BAXTER, G. D., BARKER, S. C. 1998. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *B. microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. **Insect Bioch. Mol. Biol.** 28: 581 – 589.

BAXTER, G. D., BARKER, S. C. 1999a. Isolation of a cDNA for an octopamine-like, G-protein coupled receptor from the cattle tick, *B. microplus*. **Insect Bioch. Mol. Biol.** 29: 461 – 467,

BAXTER, G. D., BARKER, S. C. 1999b. Comparison of acetylcholinesterase genes from cattle ticks. **Int. J. Parasitol**, 29: 1765 – 1774.

BITTENCOURT, V. R. E. P., MASSARD, C. L., LIMA, A. F. 1992. The use of fungal *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, on the control of tick *B. microplus*(Canestrini, 1887). **Arq. Univ. Fed. Rur. R. de J.**, 15: 197-202.

BRANCO, F. P. A., PINHEIRO, A. C., MACEDO, J. B. R. 1987. Efeito da infestação pelo carrapato *B. microplus* no desenvolvimento ponderal das raças Hereford e Ibagé. **Coletânea de Pesquisas EMBRAPA/CNPO**, p. 229-234.

BRASÍLIA.1985. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos, Brasília, Ministério da Agricultura.

CANALES, M., ENRIQUEZ, A., RAMOS, E., CABRERA, D., DANDIE, H., SOTO, A., FALCÓN, V., RODRIGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. 1997. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine GavacTM against cattle tick. **Vacc.** 15: 414-422.

CHOU, P. Y., FASMAN, G. D. 1978. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.** 47: 45 – 148.

- CLEMENT, M., POSADA, D., CRONDALL, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Mol. Ecol.** 9 (10): 1657-1660.
- COBON, G., HUNGERFORD, WOODROW M., SMITH, D., WILLADSEN, P. 1995. Vaccination against *B. microplus* : the Australian field experience. Recombinant Vaccines for the control of cattle tick. **Habana: Elpos Scientiae**, 280p.
- COBON, G., MOORE, J. T., JOHNSTON, L. A. Y., WILLADSEN. P., KEMP, D. H., SRISKANTHA, A., RIDING, G. A., RAND, K. N. 1996. DNA encoding a cell membrane glycoprotein of a tick gut. **U. S. Patent 5587311**.
- COUTO-PIMENTEL, J. 2002. A Vacina Sintética SBm 7462 no Controle do Carrapato *B. microplus* (Canestrini, 1887) em Animais Estabulados e a Campo. **Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV**, 77p.
- DE LA FUENTE, J., GARCÍA – GARCÍA, J. C., GONZÁLEZ, D. M., IZQUIERDO, G., OCHAGAVIA, M. E. 2000. Molecular análisis of *Boophilus* spp. (Acari: Ixodidae) tick strains. **Vet. Parasitol.** 92: 209 – 222.
- DE LA FUENTE, J., KOCAN, K. M. 2003. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. **Expert Rev. Vaccines** 2(4): 583-593.
- DE LA VEGA R. Y GRACIELLA DÍAZ. 1982. Depradación de la garrapata del ganado vacuno, *Boophilus micropilus*, por la hormiga *Pheidole megacephala*. Reporte preliminar. **Cien. Tec. Agric. Protec. Plantas** 5(2):97-100.
- ESCALANTE AA, GREBERT HM, CHAIYAROJ SC, MAGRIS M, BISWAS S, NAHLEN BL, LAL AA. 2001. Polymorphism in the gene encoding the Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) of Plasmodium falciparum.VI. Asembo Bay Cohort Project. **Mol Biochem Parasitol.** 113: 279–87.
- ESTRADA-PENÑA, A. 1999. Geostatistic and remote sensing using NOAA-AVHRR satellite imagery as predictive tools in tick distribuition and habitat suitability estimations for *B. microplus* (Acari: Ixodidae) in South America. **Vet. Parasitol.** 81: 73-82.

FELDMAN-MUHSAM, B., 1964. Laboratory colonies of *Rhipicephalus*. **Bull. World Health Organization**, 31: 587-589.

FILLIPOVA, N. A. 1977. Ixodid ticks (Ixodinae). Nauka, Leningrad.

FRAGOSO, H., ORTIZ, M., RODRIGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. 1995. Evaluation of the efficacy of the recombinant vaccine (GavacTM) in cattle artificially infested with *B. microplus* (Can). **Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick**. Habana: Elpos Scientiae, 280p.

FRISCH, J. E. 1999. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **Int. J. Parasitol**, 29: 57-71.

FURLONG, J. 1998. Carrapatos dos bovinos: conheça bem para controlar melhor. Juiz de Fora, MG: **Embrapa Gado de Leite**, 21p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 46).

GARCÍA-GARCÍA, J. C., DE LA FUENTE, J. J., RODRIGUEZ, M. V., MONTERO, C. A. E. 1998. Preparación vacunal basada en la obtención y caracterización del antígeno BM95 de *B. microplus*. **Oficina cubana de la propiedad industrial**. Pedido de Patente.

GARCÍA-GARCÍA, J. C., MONTERO, C., REDONDO, M., VARGAS, M., CANALES, M., BOUÉ, O., RODRÍGUEZ, M., JOGLAR, M., MACHADO, H., GONZÁLES, I. L., VALDÉZ, M., MÉNDEZ, L., DE LA FUENTE, J. 2000. Control of Ticks resistant to the immunization with BM86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *B. microplus*. **Vacc.** 18: 2275-2287,

GARCÍA-GARCÍA, J.C., GONZÁLEZ, I.L., GONZÁLEZ, D.M., VALDÉS, M., MÉNDEZ, L., LAMBERTI, J., D'AGOSTINO, B., CITRONI, D., FRAGOSO, H., ORTIZ, M., RODRÍGUEZ, M., DE LA FUENTE, J., 1999. Sequence variations in the *B. microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Exp. Appl. Acarol.** 23: 883-895.

GOMES, A. 2000. Carrapato-de-boi: Prejuízos e Controle. **Gado de Corte Divulga**, Mato Grosso do Sul, nº 42. ISSN 1516-5558.

GONZÁLEZ LOMBANA, C. 2003. Resposta imune de bovinos vacinados com peptídeo sintético SBm7462 com vistas ao controle do *B. microplus* (CANESTRINI,1887). **Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV, 77p.**

GOUGH, J. M., KEMP, D. H. 1993. Localization of a low abundance membrane protein (bm86) on the gut cells of the cattle tick *B. microplus* by immunogold labeling. **J. Parasitol.** 79: 900-907.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, 21(125): 8-10.

GUERRERO, F. D., DAVEY, R. B., MILLER, R. J. 2001. Use of an Allele-Specific Polimerase Chain Reaction Assay to Genotype Pyrethroid Resistant Strain of *B. microplus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.** 38 (1): 44 – 50.

GUIMARAES, A. M., LIMA, J. D., RIBEIRO, M. F., CAMARGOS, E. R. BOZZI, I. A. 1998.Ultraestructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult females *B. microplus* ticks. **Parasitol. Res.**, 84: 69-74

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41:95-98.

HERNADEZ, R., GUERRERO, F. D., GEORGE, J. E., WAGNER, G. G. 2002. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethoid resistant strain of the tick *B. microplus*. **Insect Bioch. Biol.** 32: 1009 – 1006.

HERNANDEZ, R., CHEN, A. C., DAVEY, R. B., IVIE, G. W., WAGNER, G. G., GEORGE, J. E. 1998. Comparison of Genomic DNA in Various Strains of *B. microplus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.** 35 (5): 895 – 9000.

HERNANDEZ, R., HE, H., CHEN, A. C., WAGHELA, S. D., IVIC, G. W., GEORGE, J. E., WAGNER, G. G. 2000. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick, *B. microplus*. **Insect Bioch. Biol.** 30: 969 – 977.

HOOGSTRAAL, H. 1985. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Adv. Parasitol.** 24: 135 – 238.

HOOGSTRAAL, H., AESCHLIMANN, A., 1982. Tick host specificity. **Bull. Soc. Entomol. Suisse** 55: 5 – 32.

HOOP, T. P., WOODS, K. R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from aminoacid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 78(6): 3824 – 3828.

INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, 96(1): 23-28.

JOHNSON, L. A., KEMP, D. H., PEARSON, R. D. 1986. Immunization of cattle against *B. microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on ticks populations. **Int. J. Parasitol.**, 16 (1):27-34.

JONSSON, N. N., MAYER, D. G., MATSCHOS, A. L., GREEN, P. E., ANSELL, J. 1998. Production effects of cattle tick (*B. microplus*) infestation of high yielding dairy cows. **Vet. Parasitol.**, 78: 65-77.

KITE, J., DOOLITTLE, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J. Mol. Biol.**, 157(1): 105 – 132.

KLOMPEN, J. S. H., BLACK, W. C. IV, KEIRANS, J. E., OLIVER, J. H., 1996. Evolution of ticks. **Ann. Rev. Entomol.** 41: 141 – 161.

LABARTHE, N. V. 1994. Biological control of tick populations: review and reflections. **Cad. Saúde Pública**, 10(1): 47-52.

LAWRIE, C. H., RANDOLPH, S. E., NUTTALL, P. A. 1999. Ixodes ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. **Exp. Parasitol.** 93: 207-214.

LINDQUIST, E. E. 1984. Current theories on the evolution of major groups of Acari and on their relationships with other groups of Arachnida with consequent implications for their

- classification. In: GRIFFITHS, d. a., BOWMAN, C. E. (Eds). **Acarology VI, vol. 1**. JOHN WILEY & SONS, New York, pp. 28 – 62.
- LIPA, J. J. 1971. Microbial control of mites and ticks. In: BURGESS, H. D., HUSSEY, N. W. **Microb. control of insects and mites**. 2. ed. London: Academic, p. 357-374.
- MANS, B. J., NEITZ, W. H. 2004. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. **Insec. Bioch. and Mol. Biol**, 34: 1-17.
- MASSARD, C. L., FONSECA, A. H., BITTENCOURT, V. R. E. P., SILVA, K. M. M. 1995. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm86 “GAVACTM” contra o carrapato *B. microplus* no Brasil. **Ver. Brás. Méd. Vet.**, 17(4):167-173.
- MELNICK, J. L. Virus vaccines: 1986 update. **Prog. Med. Virol.** v.33, p. 134-170, 1986.
- MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J., FOURNIER, D., 1994. Resistance associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 91, 5922–5926.
- NITHIUTHAI, S., ALLEN, J. R., 1984a. Significant changes in epidermal Langerhans cells of guinea pigs infested with ticks (*Dermacentor andersoni*). **Immunol.** 51: 133-141.
- NITHIUTHAI, S., ALLEN, J. R., 1984b. Effects of ultraviolet irradiation on the acquisition and expression of tick resistance in guinea pigs. **Immunol.** 51: 153-159.
- NUÑEZ, J. L., MUÑOZ, C. M. E., MOLTEDO, H. L. 1982. *B. microplus*: La Garrapata Común del Ganado Vacuno. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 184p.
- NUTTAL, G. H. F. 1911. Symptoms following tick-bites in man. **Parasitol.** 4: 89 – 93.
- OLIVEIRA, R. C. 1998. Avaliação experimental do peptídeo sintético 4912 como imunógeno para o controle de carrapato *B. microplus* (Canestrini, 1887). **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 72p.
- OLIVER, J. H., 1989. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 20: 397 – 430.

OPDEBEECK, J. P., WONG, J. Y. M., JACKSON, L. A., DOBSON, C. 1988. Vaccines to protect Hereford cattle against the tick, *B. microplus*. **Immunol.**, 63 (3): 363-367.

OSBURN, R. L., KNIPLING, E. F. 1982. The potencial use of sterile hybrid *Boophilus* tick (acari: Ixodidae) as a supplemental eradication technique. **J. Med. Entomol.**, 19(6): 637-644.

PASSOS, D. T., FERREIRA, C. A. S., DA SILVA, S. S., RICHTER, M. F., OZAKI, L. S. 1999. Detection of genomic variability in different populations of the cattle tick *B. microplus* in southern Brazil. **Vet. Parasitol.** 87: 83 – 92.

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

PATARROYO, J. H., PORTELA, R. W., DE CASTRO, R. O., COUTO PIMENTEL, J., GUZMAN, F., PATARROYO, M. E., VARGAS, M. I., PRATES, A. A., DIAS MENDES, M. A. 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *B. microplus* gut protein (Bm86). **Vet. Immunol. Immunopathol.** 88: 163 – 172.

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

PEREIRA, M. C. 1982. *Boophilus microplus*: Revisão Taxionômica e Morfo-Biológica. Rio de Janeiro: **Quimo Divisão Veterinária**.

RAND, K. N., MOORE, T., SRISKANTHA, A., SPRING, K., TELLAM, R., WILLADSEN, P., COBON, S. 1989. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *B. microplus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 86(24): 9657-9661.

REID, T. J. 1989. Acaricide resistance in Queensland. **Qld. Dept. Prim. Indust. Info.** Series Q189011, 1988: 1-17,

RODRIGUEZ, M., RUBIERA, R., PENICHER, M., MONTESINOS, R., CRAMATA, J., FALCON, V., SÁNCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOVES, C., VALDES, M., LLEONART, R., HERRERA, L., DE LA FUENTE, J. 1994. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Mammalian Cell Genetics Division. J. Biotechnol.**, 33(2): 135 – 141.

SALES-JUNIOR, P. A. 2003. Utilização de microesferas biodegradáveis PLGA como sistema de liberação para a vacina sintética SBm7462 no controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): modelo experimental em camundongos. **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 74p.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. 1977. DNA Sequence with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 74: 5463-5467.

SANTOS, I. K. F., VALENZUELA, J. G., RIBEIRO, J. M. C., KASHINO, S. S., CARVALHO, W. A., FERREIRA, B. R., DA SILVA, J. S., SZABÓ, M. P., BECHARA, G. H., GERSHWIN, L. J. 2004. Immunogenomics for development of anti-tick vaccines. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 13(1): 135 – 139.

SEIFERT, G. W. 1971. Ecto and endoparasitic effects on the growth rates of zebu crossbred and british cattle in the field. **Aust. J. Agric. Res.**, Melbourne., Vic., 22: 839-850.

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

SIGNORINI, A. R. 1991. Avances en la campaña de erradicación de la garrapata *B. microplus* en la Argentina. **Rev. Cub. Cien. Vet.** 22 (3): 183-188.

SMITH, D. R., HUNGERFOD, J., WILLADSEN, J. 1995. The development of TickGard – a commercial vaccine against the cattle tick *B. microplus*. **Indooroopilly: Biotec Australia-CSIRO**, 17 p.

- TELLAM, R. L., SMITH, D., KEMP, D. H. 1992. Vaccination against ticks. *In*: YONG, W. K. Animal parasite control using biotechnology, **Boca Raton: CRC Press**. p. 303-331.
- THOMPSON, K. C., ROA, E. J., ROMERO, N. T. 1978. Anti-tick grasses as the basis for developing practical tropical tick control packages. **Trop. Anim. Health. Prod**, 10: 179-182.
- TRAGER, W., 1939. Acquired immunity to ticks. **The J. Parasitol**, 25: 57 – 81.
- TURNBULL, L. F., SMITH, D., SHARP, P. J. 1990. Expression and secretion in *Aspergillus nidans* and *A. niger* of a cell surface glycoprotein from the cattle tick *B. microplus*, by using the fungal *amdS* promoter system. **Appl. Envirom. Microbiol.** 56: 2847-2852.
- WIKEL, S. K. 1996. Host immunity to tick. **Annu. Rev. Entomol.** 41: 1-22.
- WIKEL, S. K. 1999. Tick Modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **Int. J. Parasitol.** 29: 851-859.
- WILLADSEN, P. 2001. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. **Vet. Parasitol**, 101: 353-367.
- 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. 1989. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *B. microplus*. **J. Immunol.**, 143(4): 1346-1351.
- WILLADSEN, P., SMITH, D., COBON, G., MCKENNA, R. 1996. Comparative vaccination of cattle against *B. microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. **Parasit. Immunol.**, 18: 241-246.
- WOODHAM, C. B., GONZALES, O. A., LOPEZ, L. A.; GUEREÑA, M. R. 1983. Progresos en la erradicación de las garrapatas *Boophilus* en México 1960 – 1980. **Rev. Mundial Zootec.**, n° 48 FAO, Roma, Itália, 18-24 pp.