

LORENA CATALINA MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

**RESPOSTA DE LINFONODOS DE BOVINOS MISTIÇOS INOCULADOS A
CAMPO COM A VACINA RECOMBINANTE *rSBm7462*[®] anti *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus***

Dissertação 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
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M375r
2013
Martínez Rodríguez, Lorena Catalina, 1989-
Resposta de linfonodos de bovinos mestiços inoculados a
campo com a vacina recombinante rSBm7462 anti
Rhipicephalus (Boophilus) microplus / Lorena Catalina Martínez
Rodríguez. – Viçosa, MG, 2013.
ix, 49 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Viloria.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 35-47.

1. Imunologia veterinária. 2. Proteínas recombinantes.
3. Bovino - Parasito. 4. Carrapato - Controle. 5. Vacinas.
6. *Rhipicephalus microplus*. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 636.0896079

LORENA CATALINA MARTINEZ RODRIGUEZ

**RESPOSTA DE LINFONODOS DE BOVINOS MESTIÇOS INOCULADOS A
CAMPO COM A VACINA RECOMBINANTE rSBm7462® anti *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus***

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

APROVADA: 13 de novembro de 2013.



Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo
(Coorientador)



Gabriel Domingos Carvalho



Laércio dos Anjos Benjamin



Marlene Isabel Vargas Viloria
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar, amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Veterinária e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, pelas grandes oportunidades oferecidas, a formação acadêmica e ajuda brindada pelo pessoal docente e técnico.

Aos meus orientadores, professora Marlene Isabel Vargas e Joaquín Hernán Patarroyo pela confiança, carinho, paciência, colaboração e a importante orientação durante todo meu tempo no Brasil. A sua grande amizade continua contribuindo no meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores Laércio dos anjos Benjamin e Gabriel Domingos Carvalho, pela amizade, ajuda e compreensão ao final do desenvolvimento do trabalho.

A toda minha família, a qual amo muito, pela preocupação, o incentivo moral e apoio econômico.

Ao Danilo, pelo amor, acolhimento e imensa ajuda. Você merece meu amor e respeito. Além disso, agradeço pelo vínculo com as Faculdades Unidas do Norte de Minas (FUNORTE), que abriu novas portas na minha vida no Brasil, e brindou os estagiários que colaboraram no meu projeto a campo.

Ao Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (BIOAGRO), e todos os colegas Edna, Rafael, Cintia, Leandro, Adriana, Byron, Matheus e Marcinho, pela amizade e ajuda em cada momento.

A Gabriel e Henrique, que demonstraram apoio e me fortaleceram nos momentos mais difíceis. Agradeço o tempo que tiveram para me acompanhar no laboratório.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Indústria pecuária.....	2
2.2. O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	3
2.2.1. Efeitos do parasitismo	4
2.3. Métodos de controle.....	5
2.3.1. Controle químico	5
2.3.2. Controle alternativo.....	9
2.3.3. Controle imunológico.....	11
2.3.3.1. Novos candidatos para o controle do <i>R. (B.) microplus</i>	12
2.3.3.2. Antígenos ocultos “ <i>concealed antigens</i> ”	12
2.3.3.3. Vacinas comerciais vigentes.....	14
2.4. Peptídeo SBm7462	16
2.4.1. Produção do peptídeo recombinante 7462 em <i>Pichia pastoris</i>	17
2.5. Resposta imune em linfonodos.....	18
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Local de estudo.....	21
4.2. Animais utilizados e manejo	21

4.3. O imunógeno.....	22
4.4. Esquema de imunização	22
4.5. Histologia dos linfonodos pré-escapulares bovinos.....	23
4.6. Imunoistoquímica para identificação do antígeno vacinal <i>in situ</i>	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. Avaliação histológica dos linfonodos pré-escapulares	24
5.2. Imunoistoquímica para detecção de antígeno rSBm7462.....	31
6. CONCLUSÕES.....	34
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resistência a acaricidas reportada em diferentes países.....	8
Figura 2. Representação anatômica de um linfonodo.....	18
Figura 3. Esquema cronológico de imunizações e coletas de linfonodos de bovinos.	23
Figura 4. Microfotografia de linfonodos de bovinos controle não imunizados.	25
Figura 5. Microfotografia de linfonodos de bovinos imunizados com o peptídeo <i>rSBm7462</i>	27
Figura 6. Microfotografia de linfonodos de bovinos imunizados com <i>rSBm7462</i> pela técnica Peroxidase – Anti – Peroxidase (PAP).	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Antígenos vacinais contra <i>R. (B.) microplus</i> em bovinos.....	12
Tabela 2. Esquema de imunização.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS

µL: Microlitros

µm: Micrômetros

APCs: Células Apresentadoras de Antígeno (*Antigen presentation cells*)

BIOAGRO: Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária

Bm86: Glicoproteína intestinal isolada de uma amostra de carrapato

Bm95: Proteína similar a Bm86

CD: Grupo de diferenciação (*Cluster Differentiation*)

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CGs: Centros Germinativos

CM: Cordões Medulares

DAB: Diaminobenzedina

DC-like: Células Dendríticas-like

DVT: Departamento de Veterinária

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura.

FDC: Células dendríticas folicular (*Follicular Dendritic Cells*)

FRC: Célula reticular folicular (*Follicular Reticular Cells*)

g: gramas

HE: Hematoxilina-eosina

HEV: Vênulas endoteliais altas (*High Endothelial Venules*)

IFN-γ: Interferon gamma

IgG: Imunoglobulina G

IHQ: Imunoistoquímica

kDa: Kilodaltons

LBCHV: Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores

MgSO₄: Sulfato de magnésio

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

mL: mililitros

Milli – Q: água super purificada.

Na₂HPO₄: Fosfato de sódio monohidratado

NaCl: Cloreto de sódio

NaH₂PO₄: Fosfato de sódio diidratado

PAP: Peroxidase-anti-peroxidase

PBs: células plasmáticas de curta duração

PBS: Tampão fosfato de sódio (*Phosphate Buffered Saline*)

PCs: Células Plasmáticas de longa duração

pH: Potencial hidrogeniônico

pK: Ponto isoelétrico de proteínas

pMHC: Peptídeo no complexo principal de histocompatibilidade

rSBm7462: Peptídeo recombinante derivado da SBm7462[®]

SBm7462[®]: Vacina sintética derivada da proteína Bm86

TCR: Receptor de célula T (*T-cell receptor*)

UFV: Universidade Federal de Viçosa

RESUMO

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, Lorena Catalina, MSc., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2013. **Resposta de linfonodos de bovinos mestiços inoculados a campo com a vacina recombinante rSBm7462 anti *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Co-orientador: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo.

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é responsável por perdas econômicas significativas nos países das regiões tropicais e subtropicais. Atualmente, o controle químico para este parasito é afetado pela geração de resistência aos diversos acaricidas comerciais, fato que tem sido reportado em vários países do mundo. Além disso, a preocupação com os resíduos químicos nos produtos de origem animal e no ambiente é um problema de saúde pública. Portanto, o controle imunológico torna-se uma alternativa promissora devido à sua fácil administração, ser economicamente viável e contribuir na segurança alimentar. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de linfonodos de bovinos imunizados a campo com o peptídeo rSBm7462 anti *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Foram utilizados 14 bovinos mestiços (*Bos taurus* x *Bos indicus*), com grau de sangue variado holandês-zebu, com idades entre 4-10 meses, mantidos em duas propriedades rurais do norte de Minas Gerais. Os animais receberam três imunizações do peptídeo rSBm7462, aplicados por via subcutânea, com intervalo de 30 dias. Após 15 dias de cada imunização, os linfonodos pré-escapulares foram coletados cirurgicamente e fixados por 18 horas em formol. Posteriormente foram incluídos em parafina. As amostras dos linfonodos foram coradas pela técnica hematoxilina-eosina (HE) para a observação de eventos celulares. Para a identificação do antígeno nos linfonodos dos animais imunizados, foi realizada a técnica de imunoistoquímica (IHQ) com o método peroxidase-anti-peroxidase (PAP). A resposta de linfonodos dos bovinos inoculados foi avaliada pelas análises de formação de centros germinais (CG), hiperplasia de cordões medulares (CM) e a presença do antígeno rSBm7462 em células PAP+, demonstrando que o peptídeo recombinante rSBm7462 induz uma resposta imune adaptativa T-dependente, caracterizada nos tecidos linfóides secundários pela formação de estruturas que conferem afinidade e memória imunológica.

ABSTRACT

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, Lorena Catalina M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November 2013. **LYMPH NODES RESPONSE OF CROSSBRED CATTLE INOCULATED AT FIELD WITH A RECOMBINANT VACCINE rSBm7462 AGAINST *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Advisor: Marlene Isabel Vargas Viloria. Co-advisor: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo.

The cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is responsible for significant economic losses in tropical and subtropical countries around the world. Nowadays, the chemical control for this parasite is affected by the resistance development to several commercial acaricides, which has been reported in many countries. Furthermore, the concerns generated by chemical remains in animal products and the environment makes from this control a problem of high level importance for the public health. Thus, the immunological control becomes a promising alternative because the easy administration, low costs and its contributions to the food security. The objective of this study was to evaluate the lymph nodes response of cattle immunized at field with the peptide rSBm7462 anti *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fourteen crossbred cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*) with degree of blood holstein-zebu and aged 4-10 months were used. The animals were maintained on two farms in the north of Minas Gerais and received three immunizations with the peptide rSBm7462 applied subcutaneously at 30-day intervals. Pre-scapular lymph nodes were collected surgically 15 days after each immunization and fixed in formalin for 18 hours, then they were embedded in paraffin subsequently. Lymph node samples were stained with Hematoxylin-Eosin (HE) for cellular events observation. On the other hand, in order to antigens identifying in immunized animals lymph nodes, the immunohistochemistry (IHC) with peroxidase-anti peroxidase (PAP) method was performed. Lymph node response of cattle inoculated was evaluated by analysis of germinal centers (GC) formation, medullary cords hyperplasia (MC) and antigen rSBm7462 presence in PAP+ cells. This study shows that the recombinant peptide rSBm7462 induces a T-dependent adaptive immune response on lymphoid tissues characterized by the affinity and immunological memory in the secondary lymphoid tissues structure formation.

1. INTRODUÇÃO

Pela capacidade de transmitir agentes infecciosos, os carrapatos merecem importância tanto para a saúde pública como para a produção animal. Dentre os artrópodes de maior importância na medicina veterinária, destaca-se o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1888, *apud* GUGLIELMONE *et al.*, 2010), responsável por perdas econômicas nos países de regiões tropicais e subtropicais.

A dependência exclusiva de compostos químicos para o controle do *R. (B.) microplus* tornou-se uma das maiores preocupações científicas e econômicas dos últimos anos, e como consequência, estão sendo realizadas pesquisas para o desenvolvimento de vacinas. Na busca de formas alternativas para o controle do parasito, foi desenvolvido um imunógeno sintético anti *R. (B.) microplus* (SBm7462[®]), que contém peptídeos baseados na proteína do intestino do carrapato, a Bm86. Quando usada em conjunto com saponina experimentalmente em bovinos de várias raças, este imunógeno alcançou uma eficácia de 81,05%, tendo como parâmetros, a redução no número e no peso de fêmeas adultas, redução do peso médio dos ovos e diminuição da fertilidade (PATARROYO *et al.*, 2002).

A demanda por vacinas parasitárias em saúde animal é crescente, e empresas remetem lucros acima de três bilhões de dólares somente nesse setor (DALTON e MULCAHY, 2001). Para diminuir as dificuldades da síntese química de peptídeos, principalmente devido ao alto custo e logística, a produção do peptídeo recombinante SBm7462[®], por fermentação em leveduras *Pichia pastoris*, se apresenta como uma estratégia promissora para garantir grandes volumes do imunógeno, por baixo custo (SOSSAI *et al.*, 2009 NEVES *et al.*, 2011 e TAFUR *et al.*, 2013).

Atualmente, não existe no país um programa oficial de controle do carrapato em vigor e, por esta razão, os critérios para a gestão de infestações são definidos exclusivamente pelos produtores. Neste cenário, é um motivo de preocupação permanente entre produtores, indústrias, agências governamentais e técnicas (ANDREOTTI, 2010).

Em concordância com isso, no presente estudo foram analisados eventos de respostas induzidas em linfonodos de bovinos depois de sucessivas imunizações a campo com o peptídeo recombinante rSBm7462.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Indústria pecuária

Atualmente devido ao crescimento populacional que já atinge os sete bilhões de pessoas em todo o mundo e ao padrão de consumo que se eleva em alguns setores da sociedade, a renda do consumidor tem impulsionado a pecuária a um desenvolvimento acelerado (UNFPA). Com capacidade de fornecer alimento muitas vezes de origem confiável e garantindo segurança alimentar à população mundial que está cada vez mais exigente. É necessário aumentar a capacidade produtiva do rebanho nacional para que seja capaz de satisfazer a demanda consumidora. Para isso, devem-se melhorar as condições de bem estar animal, sanidade e reprodução através tecnologias (MILAZZOTO *et al.*, 2008).

O Brasil detém o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, em torno de 212,8 milhões de cabeças distribuído em todas as regiões (IBGE, 2011). Atualmente, o Brasil produz 9,4 milhões de toneladas de carne bovina, sendo que 16,5% são negociados para dezenas de países em todo o mundo. Na última década, o país registrou crescimento de 400% no valor de suas exportações, atingindo o recorde histórico de US\$ 5,7 bilhões em faturamento, e consolidando a posição de maior exportador mundial de carne bovina. Só no período de janeiro a julho de 2013, o Brasil movimentou uma cifra de US\$ 3,579 bilhões (ABIEC, 2013). Quanto à produção de leite, o Brasil ocupou a sexta posição mundial atrás da União Europeia, Índia, Estados Unidos, China e Rússia (DAIRY, 2011).

Não obstante, apresenta-se alguns obstáculos na produção animal, os parasitas são importantes causas de injúrias aos rebanhos, sendo responsáveis por perdas da produtividade, além da transmissão de patógenos causadores de diversas enfermidades para os animais e também para o homem (SOSSAI, 2009). Entre estes parasitas, os carrapatos, a nível mundial, são os segundos vetores mais importantes de enfermidades em humanos depois dos mosquitos (DE LA FUENTE e KOCAN, 2006). Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), os carrapatos causam prejuízos que ultrapassam US\$ 8 bilhões anuais devido à infestação e transmissão de doenças. É estimado que cada teleógina seja responsável pela queda de

produção diária de 8,9 mL de leite e de 3,0 g de peso corporal (JONSSON *et al.*, 1998).

Além disso, a aplicação dos avanços biotecnológicos, para a criação de novos métodos de diagnóstico e a fabricação de vacinas, conseguem prevenir e controlar enfermidades geradas por vírus, bactérias, fungos e parasitas, agentes etiológicos de prejuízos milionários que comprometem seriamente a economia do setor pecuário (CAVALCANTI *et al.*, 2008; GRISI, 2013).

2.2. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Análises filogenéticas recentes usando métodos moleculares determinaram cinco espécies do subgênero *Boophilus* dentro do gênero *Rhipicephalus*: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*; *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, *Rhipicephalus (Boophilus) kohlsi* e *Rhipicephalus (Boophilus) geigyi* (MURRELL *et al.*, 2000; BEATI e KEIRANS, 2001).

O carrapato do boi, *R. (B.) microplus*, está distribuído em praticamente todos os países compreendidos entre os paralelos 32° norte e 35° sul, sendo o principal ectoparasita na pecuária desses países (NUÑEZ *et al.*, 1982; LIMA *et al.*, 2000). ESTRADA-PEÑA (1999) demonstrou a distribuição deste carrapato na América do Sul, por predição espacial, estando amplamente distribuído no norte da Argentina, Paraguai, Uruguai, leste da Bolívia, Colômbia e Venezuela, além do Brasil, com especial atenção às regiões Sudeste e Centro-oeste e toda a costa brasileira.

Considera-se que seja o ectoparasita mais prejudicial à economia pecuária. Afirma-se que mais de 75% da população bovina mundial é atingida pelo parasitismo deste carrapato (CORDOVÉS, 1997). No Brasil, dados do Ministério da Agricultura de 1983 ratificaram que o *R. (B.) microplus* estava presente em 96% dos municípios informantes (73,37% dos municípios brasileiros), sendo que em 80% deles é muito frequente (VERÍSSIMO, 1993). Estudo realizado por GRISI *et al.*, (2002) evidenciou que este carrapato gera prejuízos da ordem de US\$ dois bilhões anuais para o Brasil. A quantificação atual supera em 52% os valores de uma década atrás, segundo os mesmos autores num estudo recente. O cálculo foi feito tomando como base um rebanho bovino de 212,8 milhões de cabeças na proporção de um animal para um habitante humano, uma perda de 1,18 grama/carrapato/dia (430,7

gramas/ano), uma infestação média de 100 carrapatos/cabeça e 42,5 milhões de cabeças sob risco (perto de 20% do rebanho nacional). A perda anual no rebanho somou, portanto, pouco mais de 1,8 bilhão de toneladas. Com base em um preço pago ao produtor de US\$ 1,62/kg vivo, chegou-se ao prejuízo de US\$ 2,965 bilhões (GRISI, 2013).

2.2.1. Efeitos do parasitismo

Em bovinos, a infestação do carrapato *R. (B.) microplus* gera vários efeitos que são causados pela hematofagia intensa, realizada principalmente pelas fêmeas, podendo chegar a uma quantidade de 0,6 a 3 mL por teleógina (ARTHUR, 1960), levando a perdas na produção que são proporcionais à intensidade e frequência das infestações (CORDOVÉS, 1997). Além disso, pode gerar quadros de anemia e perda de nutrientes nos animais infestados. Durante a alimentação do carrapato nos locais de fixação algumas vezes ocasiona reações inflamatórias que evoluem a cicatrizes irreversíveis, reduzindo a qualidade e o valor do couro. E também pela irritação que causa o desconforto dos animais, impedindo o bem-estar e alterando o comportamento (LIMA *et al.*, 2000; LOVIS, 2012).

Segundo SPRINGELL (1983), em um estudo conduzido para a FAO (Food and Agriculture Organization), as perdas econômicas podem ser estratificadas, com 36% causadas pelo aumento do custo do trabalho aplicado ao controle e tratamento dos animais parasitados; 20% relacionados à perda de produtividade cárneas, ou seja, diminuição do ganho de peso, 16% relacionados à perda de produtividade leiteira; 11% relacionados aos custos diretos do tratamento à base de acaricidas; 7% com óbitos e 10% com outras perdas, como a diminuição do valor do couro, veiculação de doenças e tratamento destas, e finalmente o descarte de animais.

A parasitose do carrapato *R. (B.) microplus* predispõe a transmissão de agentes patogênicos, principalmente hematozoários. No Brasil, os mais importantes são *Babesia bovis* e *B. bigemina*, tendo participação também na epidemiologia de *Anaplasma marginale* (PATARROYO, 1994), o que ocasiona prejuízos ao produtor relacionados aos tratamentos de outras afecções exacerbadas pela supressão da imunidade do hospedeiro e que, nos casos mais severos, aumenta a mortalidade e compromete a natalidade dos rebanhos. Por outro lado, incrementa o custo de produção na aquisição de

acaricidas e de equipamentos de suporte para aplicação dos mesmos. Além da mão-de-obra, campanhas de educação e as despesas com instalações ou infraestruturas para o controle das infestações (ANDREOTTI, 2010; LOVIS, 2012).

2.3. Métodos de controle

2.3.1. Controle químico

KEARNEY (2013) relata que o controle preventivo ou terapêutico do carrapato usualmente é através do uso dos acaricidas, iniciando-se uma dependência a estes produtos químicos que, embora apresentem eficácia, contribuem para a seleção de carrapatos resistentes.

A resistência é o processo de seleção genética em que alguns carrapatos de uma população sobrevivem após exposição continuada a uma família ou grupo químico carrapaticida letal para a maioria dos indivíduos normais da espécie, chegando a um ponto em que toda a população seja resistente (FURLONG, 1998). Este fato é determinado pelo estabelecimento e a propagação do alelo resistente por pressão de seleção (FURLONG e MARTINS, 2000) devido ao aumento de alguns indivíduos que sofreram alterações (mutações), tornando-os resistentes e, uma vez que morrem os sensíveis, os sobreviventes acasalam entre si, produzindo descendentes com características de resistência, ou seja, a pressão de seleção aumenta a proporção da população de carrapatos que carregam os genes para estes fatores de resistência (ANDREOTTI, 2010).

A resistência pode ser originada por vários mecanismos, classificada geralmente em três categorias principais: insensibilidade de sítio de ação, incremento de detoxificação metabólica e redução da penetração cuticular pela alteração nos canais de sódio (OAKESHOTT *et al.*, 2003; GUERRERO *et al.*, 2012a).

A resistência metabólica e do sítio de ação são comuns no *R. (B.) microplus*. A primeira ocorre quando os artrópodes desenvolvem um aumento de expressão de genes envolvidos na atividade de enzimas metabólicas de xenobióticos/detoxificadoras, incrementando a habilidade celular para sequestrar moléculas tóxicas de um acaricida. A segunda caracteriza-se, principalmente, por uma mutação de nucleotídeo na região codificadora de um gene. Essa mutação pode conferir uma mudança de aminoácido e,

consequentemente, uma alteração tridimensional na proteína formadora do receptor. A mudança estrutural pode alterar a habilidade da molécula do componente acaricida de se ligar ao sítio de ação, resultando em resistência (PEREIRA *et al.*, 2008; GUERRERO *et al.* 2012a).

PATARROYO e VARGAS (1982) consideram como axiomático o fato de que, uma vez tenha aparecido resistência comprovada a um acaricida de determinado grupo químico, ela é irreversível e que o emprego de uma mesma base química após determinado tempo não terá qualquer proveito para o controle do carrapato. Às vezes, a resistência está instalada em uma população de carrapatos até mesmo antes de estes entrarem em contato com aquele produto, devido ao fato que já existem na população alguns indivíduos naturalmente resistentes, cerca de um a cada um milhão ou mais de indivíduos (ANDREOTTI, 2010).

A detecção precoce da resistência através do monitoramento pode ser uma ferramenta chave para evitar a seleção de carrapatos resistentes em situações de uso contínuo de acaricidas do mesmo princípio ativo, bem como para atrasar a propagação. Isto depende de fatores que incluem a frequência das mutações na população original antes do tratamento, o modo de herança do alelo resistente (dominante, codominante ou recessivo) e a proporção da população total de carrapatos que não é exposta ao acaricida (refúgios) (FAO, 2003).

A resistência do *R. (B.) microplus* aos acaricidas existe nas diversas regiões do mundo onde é realizado o controle químico. Esse evento faz parte da habilidade da população de carrapatos buscar alternativas de sobrevivência no ambiente. Assim, em condições de uma forte pressão seletiva, o desenvolvimento da resistência é inevitável (ANDREOTTI, 2010).

Desde a fabricação, no século XIX, de compostos químicos para o controle dos carrapatos, foram descritos casos de resistência poucos anos após entrar no mercado. Os primeiros foram os arsênicos e os derivados destes que posteriormente foram suspensos pela alta toxicidade. Com a falta de um acaricida alternativo, as infestações por *R. (B.) microplus* em várias partes do mundo tomaram enormes proporções. Além disso, o risco à saúde e as preocupações relacionadas a resíduos motivou o desenvolvimento de novos produtos, gerando os produtos organoclorados (OC), organofosforados (OP),

carbamatos, amidinas, piretroides sintéticos (SP), lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis, reguladores de crescimento e espinosinas (LOVIS, 2012).

O primeiro caso de resistência aos OCs foi observado no Brasil em 1952 (FREIRE, 1953) e, posteriormente, em áreas da Austrália e regiões sul e equatorial da África. Com a finalidade de substituir os OCs, foram desenvolvidos os OP, mas também foi reportada resistência para estes no ano 1960. Os carbamatos estão bem relacionados com os OPs e se caracterizam por terem propriedades carcinogênicas. Portanto seu uso é mínimo (LOVIS, 2012).

As amidinas ainda são um dos grupos mais utilizados, depois de mais de 30 anos de comercialização. A resistência às amidinas apareceu 4 a 10 anos após do seu uso inicial em diferentes partes do mundo, iniciando na Austrália, e em seguida México, América do Sul, África do Sul e Nova Caledônia (LOVIS, 2012).

Quanto aos SPs, esses têm sido amplamente usados desde que entraram no mercado a meados de 1970. Devido à associação com o grupo das amidinas, resultou o reaparecimento da resistência a esta classe de substâncias, sendo reportada na América do Sul e Central (Brasil e México), África do Sul, Austrália e Nova Caledônia (LOVIS, 2012).

As lactonas macrocíclicas (ML) surgiram em 1981, e produziram grande revolução no mercado mundial dos antiparasitários. Somente em 2001 foi reportada resistência cruzada por *R. (B.) microplus* no Brasil (FURLONG e MARTINS, 2000), e México (PEREZ-COGOLLO *et al.*, 2010).

O fipronil é o único composto dos fenilpirazóis usado para o controle do carrapato em bovinos em meados de 1990. A resistência ao fipronil foi relatada em 2007 no Uruguai e no Brasil (CASTRO-JANER *et al.*, 2010a, CASTRO-JANER *et al.*, 2010b).

Produtos como reguladores de crescimento (Fluazuron) e as espinosinas (spinosad) atuam bem no controle contra o *R. (B.) microplus*. Até o ano 2010 não foram observadas resistências para Fluazuron; porém, as espinosinas apresentam uma baixa resistência cruzada com outros químicos (LOVIS, 2012).

A resistência do *R. (B.) microplus* para organofosforados (OP), piretroides sintéticos (SP) e amitraz está distribuída mundialmente. Embora menos comum, a resistência para lactonas macrocíclicas (ML) e fipronil têm sido

também reportadas. A figura 1 representa um mapa qualitativo à resistência acumulada destas cinco classes de acaricidas, indicando que há pelo menos um relato de resistência no país com base em informações disponíveis em até junho de 2012.

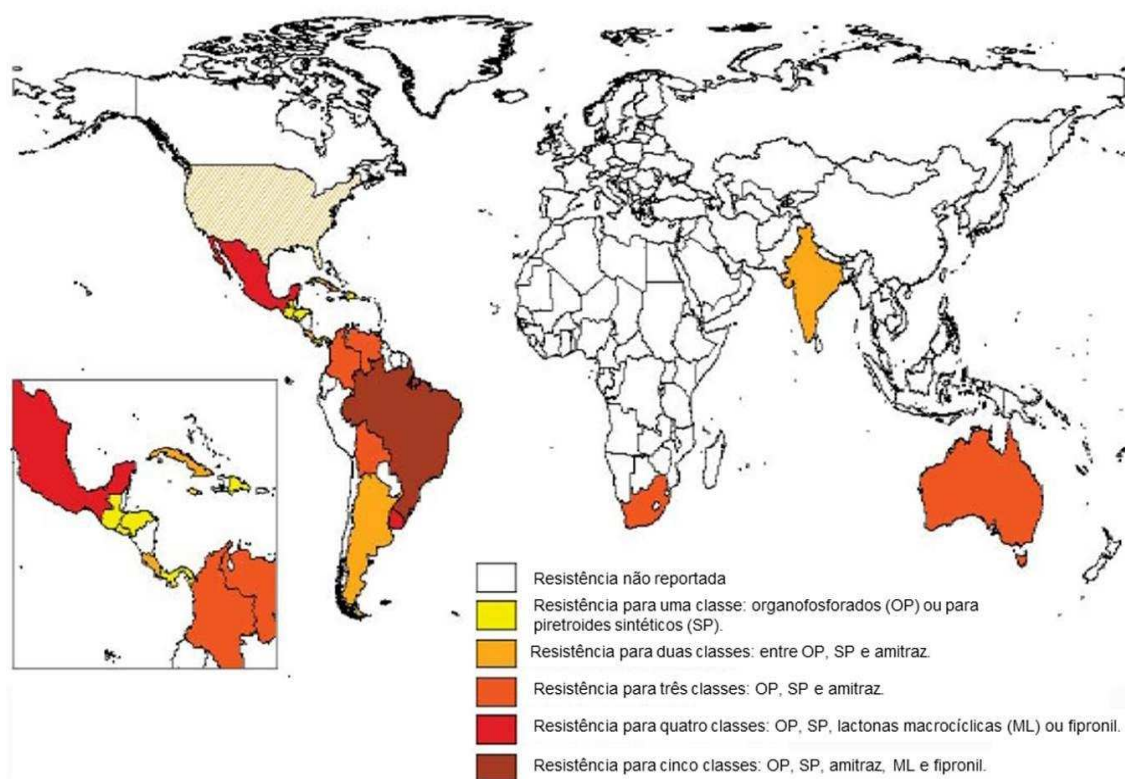


Figura 1 - Resistência a acaricidas reportada em diferentes países.
Fonte: Adaptado de LOVIS, 2012.

O mercado de carrapaticidas no Brasil movimenta cerca de US\$ 960 milhões por ano e constitui 34% do mercado de produtos veterinários (SINDAN, 2010). Considerando a velocidade com que aparece a resistência reportada para todos os acaricidas comerciais devido às mutações sofridas pelas diversas populações de carrapatos, desperta o interesse por parte das empresas a criação de novos produtos para o controle deste parasita (LOVIS, 2012). A introdução de um novo produto no mercado torna-se um fator importante que interfere nos custos de produção. Nos Estados Unidos, estima-se em US\$ 100 milhões para o descobrimento e desenvolvimento de novas drogas com uma vida média de duração de 10 anos (GRAF *et al.*, 2004), além de exigir um tempo considerável na fabricação precisa da elaboração de testes destes novos produtos e que sejam capazes de atingir uma eficácia pelo menos do 95% para serem registrados pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA).

Entretanto, a comercialização de novos produtos apresenta potenciais tóxicos que geram danos ao meio ambiente e para a saúde pública (OMS, 2000). Esta preocupação está relacionada com a presença de resíduos químicos tóxicos na carne e no leite dos animais tratados com acaricidas. As moléculas acumulam-se também no meio ambiente, contaminando o solo e água, o que representa um sério problema à saúde humana e animal. No Brasil, em 2011, as exportações de carne bovina acumularam prejuízo de US\$ 104 milhões decorrente da rejeição de cargas por parte dos Estados Unidos, com consequente suspensão devido à presença de resíduos de medicamentos antiparasitários à base de ivermectina acima dos limites tolerados pelas autoridades norte americanas (ABIEC, 2013). O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento–PNCRC/MAPA, é responsável por coordenar as ações de garantia de qualidade e de segurança química dos produtos de origem vegetal e animal, por meio de procedimentos de amostragem e análise laboratorial. Os resultados das análises com violações de ivermectina realizadas em todo o Brasil, entre os anos de 2002 e 2010, foram correlacionados com os riscos aos quais o setor produtivo bovino do país é exposto bem como a segurança alimentar (MARTINS *et al.*, 2010).

Devido ao comprometimento da saúde humana e animal, e às sérias consequências para o ambiente que o controle químico provoca, são estimuladas pesquisas para o desenvolvimento de métodos alternativos e o estabelecimento de manejo integrado para o controle dos carrapatos (HERNÁNDEZ, 2005).

2.3.2. Controle alternativo

Métodos alternativos para o controle do *R. (B.) microplus* são estudados em diversas linhas de pesquisas.

Como exemplo, a seleção de bovinos com maior resistência aos carrapatos, principalmente Brahman X British (*Bos indicus* X *Bos taurus*). O primeiro apresenta resistência média de 99% equivalente a 1% de sobrevivência larvária do parasita. Brahman X British representam 97%; somente British, 85%; outras raças leiteiras como Jersey apresentam 98%, superior à raça holandesa com 85%. Acredita-se que todos os bovinos, incluindo Brahman, são igualmente susceptíveis frente a uma exposição inicial;

posteriormente são adquiridos níveis individuais de resistência pela experiência com os carrapatos. Embora os níveis de resistência possam ser afetados por diversos fatores como estresse, lactação, desnutrição e sazonalidade, a incorporação de raças *Bos indicus* no rebanho diminui as infestações de carrapatos sobre os bovinos (WHARTON e NORRIS, 1980).

O cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das larvas, como o capim gordura (*Melinis minutiflora*), ou de plantas como a leguminosa *Stylosanthes spp.* que repelem (SUTHERST *et al.*, 1982). Outras possuem propriedades tóxicas para os carrapatos como *Gynandropsis gynandra* e *Azadirachta indica*, esta última conhecida como o Neem (HERNÁNDEZ, 2005), podendo contribuir à redução da população de carrapatos capazes de infestar aos bovinos.

O manejo de predadores naturais nos diferentes estádios evolutivos do parasita, tais como as aves *Egretta ibis*, garça-vaqueira (ALVES-BRANCO *et al.* 1983), alguns falconídeos como *Milvago chimachima* (ROCHA, 1984), e galiformes a exemplo a *Numida meleagris* (galinhas d'Angola), que se alimentam das teleóginas. Algumas espécies de formigas são predadoras de ovos e de fêmeas ingurgitadas, tais como *Pheidole spp.*, *Solenopsis saevissima* (ROCHA, 1983a), *Camponolus rengerii* e *Ectatomma quadridens* (PEREIRA, 2008). Aranhas da espécie *Lycosa erythognata* e *Phoneutra nigriventer* (ROCHA, 1983b) também foram descritas como predadores do *R. (B.) microplus*. A mosca *Megaselia scalaris* utiliza a teleógina para fechar o ciclo (ROCHA, 1984). Alguns fungos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (HAJEK e DELALIBERA, 2012) são patógenos que afetam o desenvolvimento dos ovos do carrapato. As bactérias *Cedecea lapagei* (BRUM, 1988), alguns vírus e protozoários também afetam os ovos, reduzindo o número de indivíduos nas gerações futuras (HERNÁNDEZ, 2005).

Cruzamentos interespecíficos para geração de machos inférteis, foram realizados usando as espécies *microplus* com *annulatus*, evidenciando tendência de cruzamentos intraespecíficos superior aos de cruzamentos interespecíficos. Entretanto, outros experimentos através do cruzamento das cepas do *R. (B.) microplus* australianas com cepas sul-africanas e argentinas resultou na obtenção de progênes híbridas estéreis (LABRUNA *et al.*, 2009). Nesse estudo, mediante o emprego de ferramentas moleculares e biológicas sugere-se que o carrapato *R. (B.) microplus* presente na Austrália difere das

cepas africanas e americanas; portanto, devem ser reclassificadas as espécies já reportadas.

A utilização de modelos de simulação computadorizados de dinâmicas populacionais de carrapatos ajuda no planejamento estratégico do controle, estudando o comportamento evolutivo da população de carrapatos para prever a situação futura, integrando fatores climáticos, condições bioecológicas e de manejo dos bovinos, além de incorporar dados de enfermidades transmitidas por carrapatos. Estes métodos constituem atualmente um dos instrumentos mais úteis e versáteis (HERNÁNDEZ, 2005).

Através de um manejo integrado de métodos já citados junto com o emprego de vacinas, pode resultar um controle eficiente e inclusive a erradicação do carrapato *R. (B.) microplus* nas áreas afetadas, fornecendo ao invés do controle químico, métodos alternativos que resultam em um ambiente livre de contaminantes que possam prejudicar a saúde humana e animal (HERNÁNDEZ, 2005; POPARA *et al.*, 2013).

2.3.3. Controle imunológico

O controle imunológico é um método promissor em Medicina Veterinária com valiosa importância devido ao uso de vacinas para animais de produção, de companhia e de saúde pública, o que pode reduzir os índices de morbidade e mortalidade, representando o melhor método avaliado com custo efetivo para prevenir perdas econômicas (ANDRÉ, 2001).

As vacinas baseadas em antígenos dos carrapatos alvo apresentam várias características: especificidade de espécie, impossibilidade de selecionar populações resistentes, baixo custo, fácil administração e incrementa a segurança alimentar, evitando o emprego em grande quantidade de compostos químicos contaminantes ao ambiente e aos produtos de origem animal que colocam em risco a saúde dos humanos (GUERRERO *et al.*, 2012; POPARA *et al.*, 2013).

Há mais de 70 anos que as infestações de carrapatos são controladas com uso vacinas, induzindo imunidade devido a uma variedade de materiais antigênicos, incluindo macerados do carrapato na íntegra, extratos das glândulas salivares, material intestinal, cutículas, entre outros (WILLADSEN, 2004). A imunização contra carrapatos apresenta maior sucesso do que contra qualquer outro ectoparasita, provavelmente porque os primeiros se alimentam

mais lentamente, ficando mais tempo em contato com componentes do sistema imune do hospedeiro (DALTON e MULCAHY, 2001).

Em todo o mundo têm sido desenvolvidas pesquisas por vários grupos para o descobrimento e produção de vacinas contra carrapatos que afetam o gado bovino. Estudos baseiam-se no isolamento e caracterização de moléculas envolvidas em processos fisiológicos vitais do carrapato como alimentação, digestão e reprodução, uma vez que os animais sejam imunizados com tais moléculas capazes de agir como imunógenos que inibem as funções essenciais, afetando a sobrevivência e o metabolismo dos parasitas nos diferentes estádios evolutivos (GUERRERO *et al.*, 2012).

2.3.3.1. Novos candidatos para o controle do *R. (B.) microplus*

Recentemente, como exemplo específico de grande interesse para o desenvolvimento de vacinas contra o carrapato *R. (B.) microplus*, foram reportados novos antígenos com potencial de serem empregados no controle imunológico, incluem glutathione S-transferases; cisteína, aspártico e metalo endopeptidases; inibidores de tripsina; ferritina 2; e alelos regionais da Bm86, o antígeno protetor primário nas vacinas TickGARD e Gavac (Tabela 1). GUERRERO *et al.*, (2012) reportam outros antígenos (Tabela 1).

Tabela 1. Antígenos vacinais contra *R. (B.) microplus* em bovinos.

Antígeno	% de Eficácia	País	Grupo de trabalho
Yolk pro-Cathepsin	25	Brasil	LEAL <i>et al.</i> (2006)
SBm7462	81	Brasil	PATARROYO <i>et al.</i> , (2002)
Subolesina	51	México	ALMAZAN <i>et al.</i> , (2010)
	81	México	ALMAZAN <i>et al.</i> , (2012)
ARS Antígeno 1	76	Brasil	GUERRERO (dados não publicados)
	73	Brasil	
ARS Antígeno 2	63	Brasil	
ARS Antígeno 1 + 2	71	Brasil	
Ferritina 2	64	México	HAJDUSEK <i>et al.</i> , (2010)

Fonte: modificado de GUERRERO *et al.*, 2012.

2.3.3.2. Antígenos ocultos “*concealed antigens*”

As vacinas contra os carrapatos permitem a inclusão de múltiplos antígenos que poderiam ter como alvo um grande rango de espécies de

carrapatos e poderia com isso, prevenir a transmissão de patógenos (DE LA FUENTE, 2006).

Os antígenos contra os carrapatos são considerados geralmente como antígenos expostos ou antígenos ocultos (*concealed antigens*). Os antígenos expostos são aqueles que naturalmente entram em contato com o sistema imune do hospedeiro durante a infestação. Os hospedeiros imunizados com este tipo de antígenos desenvolvem uma resposta pela contínua exposição aos carrapatos. Os antígenos ocultos não estão expostos ao sistema imune do hospedeiro e requerem repetidas imunizações para manter títulos altos de anticorpos. Porém, os antígenos ocultos apresentam mais vantagens devido a que é pouco provável que os carrapatos desenvolvam mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro e, por conseguinte, a resposta imune induzida pelos antígenos ocultos será mais eficiente (DE LA FUENTE, 2006; KISS, 2012).

Entres os candidatos identificados estão as glicoproteínas intestinais (Bm86 e Bm95). A Bm86 é encontrada nas microvilosidades das células epiteliais do intestino do carrapato (GOUGH e KEMP, 1993), altamente concentrada próximo à membrana basal (LEE e OPDEBEECK, 1994) e presente em larvas, ninfas e adultos. Essa proteína tem participação vital durante a digestão do carrapato, um processo denominado heterofagia, no qual metabólitos digestivos e componentes do sangue passam por endocitose nas células. Animais vacinados com base no conceito de antígenos ocultos (WILLADSEN *et al.*, 2004), induzem resposta imune, causando danos aos carrapatos após a captura de sangue do hospedeiro contendo altos níveis de anticorpos específicos ao intestino, juntamente com outros efetores humorais como o complemento (DE LA FUENTE *et al.*, 1998; GARCIA-GARCIA *et al.*, 1998). Os anticorpos interagem com antígeno oculto na superfície do intestino, causando ruptura do epitélio, havendo hemorragia interna para a cavidade (RAND, *et al.*, 1989) e interferindo na digestão do sangue.

Como resultado dessas modificações estruturais, algumas imunoglobulinas passam intactas desde o intestino médio até a hemocele, onde pode ocorrer adsorção de imunoglobulinas na hemolinfa. Essas imunoglobulinas podem agir com os órgãos internos do carrapato alterando a subsequente produção de ovos e, inclusive pode ocasionar a morte (NUTALL *et al.*, 2006).

Segundo KEMP *et al.* (1986), os anticorpos se fixam na membrana das células digestivas, danificando-as. Os danos atingem quatro vias: redução do número de fêmeas ingurgitadas em bovinos vacinados; redução no peso das fêmeas ingurgitadas, postura dos ovos e, finalmente, na viabilidade dos ovos (RODRÍGUEZ, *et al.*, 1994; COBON *et al.*, 1995). O principal efeito não é eliminar instantaneamente os carrapatos nos bovinos, mas reduzir o desafio na próxima geração (COBON *et al.*, 1995).

Diferentes antígenos ocultos dos carrapatos foram descritos. No entanto, os antígenos derivados do intestino tiveram maior preponderância no desenvolvimento de vacinas, especialmente aquelas baseadas na proteína Bm86 que se tornou a proteína mais estudada e que apresentou melhores resultados como antígeno vacinal eficiente em bovinos experimentais a campo (CANALES *et al.*, 2009).

2.3.3.3. Vacinas comerciais vigentes

A glicoproteína Bm86, foi isolada e purificada da membrana de células intestinais de carrapatos *R. (B.) microplus* cepa australiana Yeerongpilly em 1989. Possui um peso estimado de 89 kDa e P.I de 5,5. RAND *et al.* (1989) clonaram e sequenciaram o gene dessa proteína, caracterizando as sequências nucleotídicas e aminoacídicas, determinado que esta proteína estava composta por 650 aminoácidos.

Em 1994, foi lançada pela Hoeschst Animal Health (Austrália), a primeira vacina comercial contra carrapatos denominada TickGard® desenvolvida pela Organização de Pesquisa da Comunidade Científica e Industrial (CSIRO) em colaboração com o Biotech Australia Pty. Ltd. Através da clonagem do gene *bm86* isolado da amostra Yeerongpilly em *E. coli*, foi produzida a proteína Bm86 recombinante (SMITH *et al.*, 1995). Esta vacina converteu-se rapidamente no tratamento com mais sucesso para o controle de carrapatos na Austrália, embora depois de várias reestruturações nas empresas que elaboravam esta vacina, a mesma desapareceu do mercado e foi reincorporada em uma pequena parte do norte do país. Trabalhos feitos com a essa vacina em rebanhos leiteiros, JONSSON *et al.* (2000) obtiveram resultados com redução de 56% no número de carrapatos da primeira geração em campo, 72% no desenvolvimento reprodutivo e um incremento no ganho de

peso do gado. Além disso, o uso de acaricidas diminuiu significativamente, não sendo necessário a sua aplicação.

Nesse mesmo ano, foi desenvolvida a vacina cubana GAVAC[®] pelo Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia e liberada pelo Heber Biotec S.A. (Havana, Cuba) através da recombinação do gene da glicoproteína Bm86 (estoque cubano da amostra Yeerongpilly) na levedura *Pichia pastoris*. Em experimentos a campo foi mostrado 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).

Em 1997, a vacina recombinante GAVAC[™] foi introduzida a México pelo REVETMEX S.A. de C.V. convertendo-se também em uma importante ferramenta no manejo integrado para o controle das infestações de carrapatos. Devido ao crescente problema de resistência aos acaricidas o governo realiza programas encaminhados aos produtores, oferecendo assistência financeira e patrocinando o uso desta vacina. Os resultados mais recentes representam 67% na redução das aplicações de produtos químicos em várias fazendas desse país (DE LA FUENTE, 2007).

Desde seu descobrimento, registro e comercialização e apesar de várias dificuldades para novas vacinas contra carrapatos, até a última década, as vacinas para o gado bovino baseadas no antígeno intestinal Bm86 do *R. (B.) microplus* têm fornecido um método de controle plausível que oferece uma alternativa efetiva, barata e amigável com o ambiente, demonstrada na redução nas infestações deste carrapato nos animais imunizados e na diminuição do uso de acaricidas, incrementando a produção e reduzindo a transmissão de alguns patógenos (DE LA FUENTE, 2007).

Entretanto, CUNHA *et al.* (2012) afirmam que a aplicação dessas vacinas baseadas na proteína Bm86 em animais infestados com diferentes cepas de carrapatos resultaram em vários graus de eficácia, impossibilitando o controle do parasita no ambiente. Análises conduzidas com cepa argentina de *R. (B.) microplus*, resultaram em mínima eficiência à vacina GAVAC. Posteriormente, o isolamento da amostra permitiu o surgimento de uma nova proteína muito similar à Bm86, denominada Bm95. A vacina GAVAC-PLUS tornou-se a alternativa para populações insensíveis à Bm86, utilizando a Bm95 expressa em *P. pastoris*. Não obstante, a utilização dessa formulação também gerou

resultados insatisfatórios no sul do Brasil, devido a polimorfismos genéticos na expressão de aminoácidos das proteínas Bm86 e Bm95 na população de carrapatos (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000; SOSSAI, 2004 TAFUR, 2011).

2.4. Peptídeo SBm7462

A partir da sequência da proteína Bm86 pesquisadores do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (BIOAGRO) e do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa–MG, através de ferramentas computacionais, desenharam a sequência de aminoácidos 4822 (aa. 398–411), 4824(aa. 132–145), e 4823(aa. 21–35), que nessa ordem originou o peptídeo antigênico SBm7462[®] (PATARROYO *et al.*, 2002)

Este peptídeo é formado por 43 aminoácidos, com massa molecular de 5,5 KDa, correspondente ao 6,6% da proteína Bm86. SOSSAI *et al.* (2005) observaram que após o alinhamento entre as proteínas Bm86 e Bm95 apenas duas mudanças ocorrem dentro das sequências que constituem a SBm7462[®]. Análises genéticas mostraram que os epítomos imunogênicos dessa molécula estão conservados nas diferentes populações do carrapato *R. (B.) microplus* das regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (SOSSAI *et al.*, 2005; PECONICK *et al.*, 2008), representando alternativa mais viável para manter a eficácia vacinal comparado com a experiência negativa obtida com vacinas baseadas em proteínas íntegras PECONICK *et al.*, 2008).

A capacidade imunogênica do peptídeo SBm7462[®] foi demonstrada na redução do número de teleóginas, da taxa de ovoposição, da relação peso das larvas/peso dos ovos, do peso dos ovos, das teleóginas e da fertilidade dos ovos. Em bovinos se geraram anticorpos protetores (IgG1) com eficácia vacinal de 53% a 81% (COUTO-PIMENTEL, 2002; PATARROYO *et al.*, 2002).

A partir deste estudo, o peptídeo SBm7462[®] foi eleito como o imunógeno a ser utilizado na primeira vacina sintética comercial contra o carrapato *R. (B.) microplus*. Esse peptídeo foi patenteado no México, EUA, Austrália, Espanha, Portugal e Brasil.

PATARROYO *et al.* (2009) avaliando a resposta imune induzida em bovinos pelo SBm7462[®], demonstraram que este peptídeo estimulou a produção de imunoglobulinas antígeno-específicas, com predominância estatisticamente diferente do isotipo IgG1 sobre o isotipo IgG2. Portanto, se

considerou que o peptídeo sintético SBm7462[®] induzia eficientemente uma resposta imune antígeno-específica que envolvia mecanismos imunes, tanto celular quanto humoral. A resposta imune induzida pelo SBm7462[®] se caracterizava nos tecidos linfoides pela formação típica de estruturas que conferiam especificidade e memória quinze dias após a primeira imunização, com indução de apoptose em células linfocíticas residentes em linfonodos.

2.4.1. Produção do peptídeo recombinante 7462 em *Pichia pastoris*

Visando resolver as dificuldades da síntese química de proteínas em massa, SOSSAI (2009) produziu quatro genes sintéticos com base na sequência de aminoácidos dos epítomos do peptídeo SBm7462[®]. Esses genes foram otimizados para a expressão proteica na levedura *Pichia pastoris* cepa Km71.

Devido que este organismo metiltrófico apresenta várias características marcantes que facilitam para a manipulação genética, como a alta frequência de transformação de DNA, clonagem por complementação funcional, além da habilidade desta levedura em produzir proteínas em altos níveis, tanto intracelulares quanto extracelulares; a capacidade de executar modificações pós- traducionais, tais como glicosilação, formação de pontes de dissulfeto e o processamento proteolítico; e, ainda, a disponibilidade deste sistema no mercado na forma de kit comercial (CEREGHINO e CREGG, 2000). A utilização desta levedura proporciona vantagens com relação aos sistemas de expressão procariotos, mantendo a fácil manipulação genética associada ao crescimento rápido em meios de cultivo relativamente simples, permitindo a sua expansão para a produção de proteínas em escalas industriais, além de possuir um forte promotor induzível por metanol (CEREGHINO e CREGG, 1999, 2000; GELLISSEN, 2000; TORRES; MORAES, 2000; CEREGHINO *et al.*, 2002).

Os produtos dos genes desenhados foram recuperados do meio extracelular para os ensaios laboratoriais e vacinais. Na avaliação da resposta imune produzida pelos peptídeos recombinantes em camundongos BALB/c foi comprovada a estimulação da resposta imune tanto humoral quanto celular, detectada através da análise cinética de anticorpos (IgG) e pela formação de centros germinais após a vacinação (TAFUR, 2008; SOSSAI, 2009).

2.5. Resposta imune em linfonodos

O antígeno vacinal em contato com o organismo é reconhecido por três modelos comuns de transporte, que podem ser através de: células dendríticas-*like* (DC's) ou monócitos. Alternativamente, o antígeno solúvel pode entrar diretamente nos capilares e vasos linfáticos e ser transportada até os tecidos linfoides secundários, onde os linfócitos B, as DC-*like* e os macrófagos residem. Finalmente, os antígenos que não entraram nos sistemas sanguíneo ou linfático interagem no sítio de injeção com as DC-*like*, monócitos e neutrófilos que são sequestrados devido à inflamação (PAL e RAMSEY, 2011).

As células transportam o antígeno até os linfonodos, que são o centro de ativação da resposta imune. O linfonodo compreende três regiões: córtex superficial, paracórtex e medula. O tecido linfoide está conformado por uma complexa rede de sinusóides linfáticos. A linfa proveniente do fluxo aferente entra nos sinusóides subcapsulares atravessando todo o linfonodo, para finalmente sair pelo vaso linfático eferente (Figura 2).

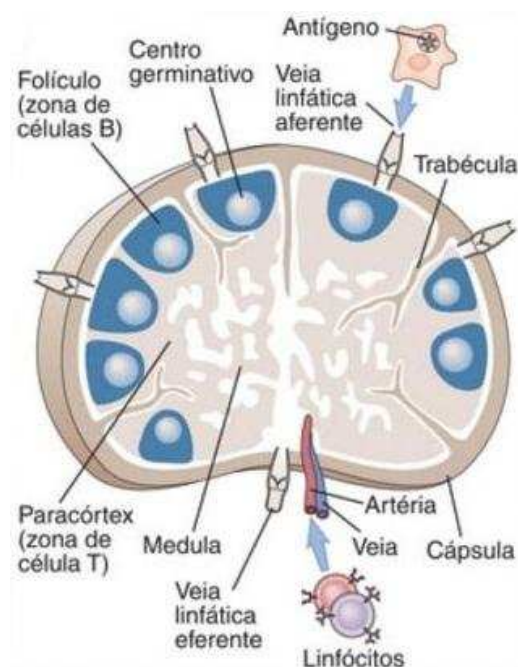


Figura 2. Representação anômica de um linfonodo
FONTE: Adaptado de ABBAS *et al.*, 2007

Os sinusóides linfáticos estão conformados pelas células reticulares fibroblásticas (FRCs), as quais modulam a vasculatura do linfonodo, além de secretar quimosinas essenciais para a migração de linfócitos B e T aos respectivos compartimentos. O berço dos linfócitos B de memória é constituído pela formação de centros germinativos (CG) nos folículos linfóides dos linfonodos. Os CG são um local especializado que suporta os eventos

necessários para uma eficiente maturação de afinidade de células B (ALLEN *et al.*, 2007). Os CG são induzidos por antígenos, no marco de uma resposta imune celular do tipo T-dependente e se originam a partir da rápida expansão clonal de poucas células formadoras (LIU & ARPIN, 1997). As respostas de anticorpos T-dependentes começam quando algumas células T e B específicas para determinado grupo antigênico interatuam entre a região de folículos celulares B e a zona de células T em ligações cognatas (OKADA, 2005).

Os CG estão divididos em dois compartimentos denominados região clara e região escura. Nos órgãos linfóides secundários, a zona clara se encontra estrategicamente posicionada em direção à fonte de antígenos estranhos, nos linfonodos perto do espaço subcapsular que recebe a drenagem linfática aferente da pele, mucosa ou víscera. Os linfócitos B tanto da região escura como da região clara foram definidos como centroblastos e centrócitos, respectivamente. Foi sugerido que estas células podem sofrer um processo de rápida proliferação e hipermutação somática, atravessando um processo de seleção celular. Também, propôs-se que os centroblastos saíam do ciclo celular expressando anticorpos na sua superfície e se transformavam em centrócitos que viajavam à zona clara. Assim os centrócitos adquiriam a capacidade de interagir com as células apresentadoras de antígeno nesta região. Além disso, foi sugerido que os centrócitos selecionados podem apresentar antígeno às células Th na região clara, aumentando assim a sobrevivência e promoção da diferenciação de células plasmáticas ou de células B de memória (ALLEN *et al.*, 2007).

Estudos controvertem a idéia clássica de migração celular unidirecional desde a região escura para a região clara e o mecanismo pelo qual ocorre a seleção nos CGs. Através de ferramentas computacionais, foram evidenciadas morfologias e velocidades iguais das células B tanto na região clara como na escura e, mediante sinais atrativos ou repulsivos as células respondem para se movimentar entre estas duas regiões. Do mesmo modo, imagens em tempo real mostraram que a divisão, proliferação e morte celular ocorrem tanto na região clara como na escura, e não apenas na região escura como postulava o modelo clássico. O novo modelo ajuda, então, no entendimento da resposta imune em relação às interações celulares (ALLEN *et al.*, 2004; ALLEN *et al.*, 2007; VICTORA e NUSSENZWEIG, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a resposta imune celular em linfonodos de bovinos vacinados a campo com o imunógeno *rSBm7462* anti *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

3.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar a dinâmica e identificar as alterações histológicas dos folículos linfóides e centros germinais de linfonodos dos animais imunizados com o *rSBm7462*.
- b) Identificar a presença de antígeno *rSBm7462* em linfonodos de animais imunizados mediante a técnica de IHQ.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de estudo

O estudo foi realizado em duas etapas nos seguintes locais:

- Duas propriedades rurais no norte de Minas Gerais: “Fazenda A” a 668,7 metros de altitude, na cidade de Montes Claros (latitude 16° 44' 13" Sul, longitude 43° 51' 53" Oeste), iniciando a primeira vacinação em julho de 2012. “Fazenda B”, a 645 metros de altitude, no município de Francisco Sá (latitude 16° 28' 8" Sul, longitude 43° 29' 7" Oeste), iniciando a primeira vacinação em dezembro do 2012.
- Universidade Federal de Viçosa (UFV), - Viçosa-MG: Nos Laboratórios de Histopatologia e Histologia do Departamento de Veterinária (DVT). No Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO).

4.2. Animais utilizados e manejo

Todos os procedimentos experimentais que envolveram a manipulação de animais foram realizados por Médico Veterinário seguindo rigorosamente as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da CEUA/Universidade Federal de Viçosa, estando o experimento registrado e aprovado pelo Comitê de Ética da instituição, com número de registro 44/2013 (Anexo 1).

Foram utilizados 14 bovinos mestiços (*Bos taurus* x *Bos indicus*), com grau de sangue variado holandês-zebu, com idades entre 4-10 meses, mantidos nas duas propriedades rurais “A” e “B” do norte de Minas Gerais. Os animais foram identificados por meio de brincos auriculares numerados. A alimentação oferecida aos animais foi baseada no sistema tradicional a pasto em cada fazenda, sem restrição no manejo. Durante o período de estudo, os animais receberam água *ad libitum*, suplementação alimentar com sal mineral, pastejo de *Brachiaria brizantha* cv *Marandu* e amamentação diária.

O número de animais previstos foi definido pela amostragem não probabilística, especificamente por acessibilidade ou por conveniência na qual o pesquisador seleciona os elementos a que tem acesso, admitindo que estes possam representar um universo (estudos exploratórios ou qualitativos) (LEVY, 1980; LWANGA, 1991). A amostragem por conveniência é adequada e

frequentemente utilizada principalmente para geração de ideias em pesquisas exploratórias (OLIVEIRA, 2001).

4.3. O imunógeno

O peptídeo recombinante *rSBm7462* anti *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, (depósito de patente BR1020130266256) foi desenvolvido pela equipe de trabalho do Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) da UFV. Por meio de fermentação utilizando-se a levedura *Pichia pastoris* cepa Km71, os produtos expressados foram recuperados do meio extracelular por ultrafiltração, e posteriormente, adicionado à saponina.

4.4. Esquema de imunização

Os animais receberam três doses de 1,5mg em 2,0 mL do peptídeo *rSBm7462*, aplicados com intervalo de 30 dias (Tabela 2). Por via subcutânea na região cervical direita após prévia assepsia no local da inoculação.

Tabela 2. Esquema de imunização.

Animais	Fazenda (A)	Fazenda (B)
Controle	1 animal	1 animal
1ª vacinação (dia 0)	2 animais	2 animais
2ª vacinação (dia 30)	2 animais	2 animais
3ª vacinação (dia 60)	2 animais	2 animais

Após 15 dias de cada imunização, o linfonodo pré-escapular foi coletado cirurgicamente. Utilizou-se medicação pré-anestésica a base de Cloridrato de Xilazina 2% (0,1mg/kg) e para o bloqueio local infiltrativo, Cloridrato de Lidocaina 2%, em forma de botões anestésicos na região pré escapular no volume de 10 mL por animal. Uma vez que o mesmo demonstrou estar sedado,

realizou-se tricotomia e a desinfecção do local com iodo tópico. Depois da incisão cirúrgica, foi realizado a aplicação de analgésico (Diclofenaco Sódico 1mg/kg) e antibioticoterapia em dose única (Oxitetraciclina 20% 20mg/kg).

A remoção dos linfonodos foi realizada no dia zero (antes da primeira inoculação) e aos 15, 45, e 75 dias após da primeira inoculação (Figura 3).

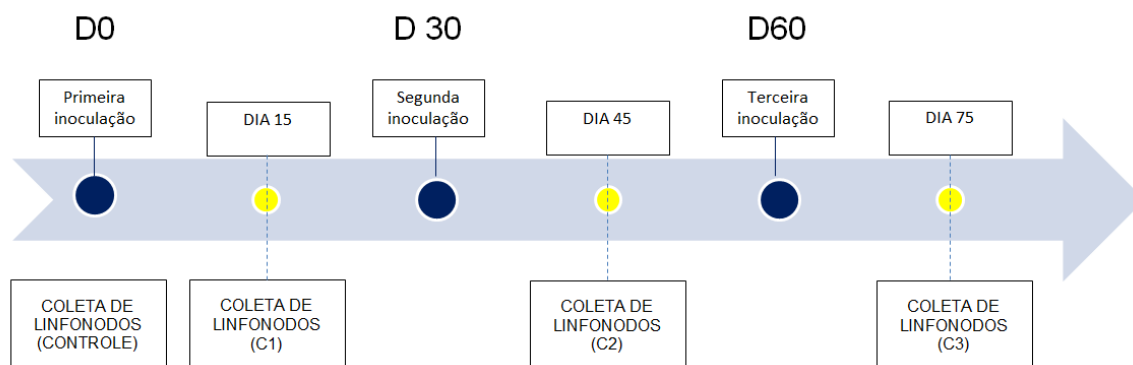


Figura 3. Esquema cronológico de imunizações e coletas de linfonodos dos bovinos.

4.5. Histologia dos linfonodos pré-escapulares bovinos

Os linfonodos foram seccionados em fragmentos de 1 cm², fixados durante 24 horas em formol tamponado (pH 7,2) e conservados em álcool 70%. Os fragmentos foram desidratados em soluções alcóolicas crescentes (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol, e incluídos em Paraplast Plus® (Sigma), (PROPHET *et al.*, 1992).

Os cortes histológicos foram realizados com 5 µm de espessura em micrótomos de rotação modelo RM2255 LEICA e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio de luz ECLIPSE E600³ para observar a resposta de linfonodos dos bovinos inoculados mediante a formação de centros germinais (CG) e hiperplasia de cordões medulares (CM).

4.6. Imunoistoquímica para identificação do antígeno vacinal *in situ*

Para detecção do antígeno rSBm7462 *in situ* foi utilizada a técnica de Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) descrito no ANEXO 2. As lâminas foram analisadas por meio de microscópio de luz no aumento de 1000X.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação histológica dos linfonodos pré-escapulares

Na histologia diferencial pela coloração HE, a observação das amostras dos linfonodos pré-escapulares de animais controle não imunizados (Figura 4), mostrou alguns folículos secundários com presença de poucas células linfocíticas. São notáveis a zona clara e zona escura dos centros germinativos dos folículos secundários (Figura 4A e 4C). Embora não tenha sido detectada hiperplasia de áreas paracorticais e nem de cordões medulares (Figura 4B e 4D). É possível observar centros germinativos de forma inespecífica.

Os animais pertencentes às duas fazendas, mantidos em diferentes condições de manejo, criados a campo e expostos a diversos antígenos, apresentaram estas características de formação de CGs e correspondem a uma resposta imune não específica, já que a reatividade dos CGs não é regular e não se acompanha de outros eventos celulares que indicam uma resposta imune adaptativa induzida por antígenos T-dependentes, tais como hiperplasia de áreas paracorticais e de cordões medulares.

Estes resultados para os animais controles, foram mais intensos que os descritos por GONZALEZ (2003), PATARROYO (2009) e TAFUR *et al.*, (2013), sendo que nesses estudos os animais foram mantidos em condições de isolamento, desde seu nascimento e durante todo o experimento evitando-se o completo contato com artrópodes ou outros vetores de hemoparasitas.

Esta afirmação é baseada nas observações de MORRISON *et al.* (1986), que constataram que nos linfonodos periféricos de bovinos saudáveis, entre 6-12 meses de idade, em torno de 30-70% dos folículos linfóides podem conter centros germinativos, e que, segundo os mesmos autores, indicaria que os linfonodos de animais normalmente saudáveis são extremamente ativos, e nesses poderia estar-se refletindo uma relativa proteção a antígenos exógenos. Estudos recentes de linfonodos de bovinos clinicamente saudáveis identificaram populações de células dendríticas, macrófagos, algumas populações de células B, e células endoteliais nas áreas dos folículos linfóides (principalmente na zona clara) e na região medular, suportando os achados anteriormente descritos no contexto que diversos tipos celulares estão presentes em diferentes órgãos para fornecer o desenvolvimento de respostas

imunes, uma vez que antígenos exógenos entrem no organismo (ROMERO-PALOMO *et al.*, 2013).

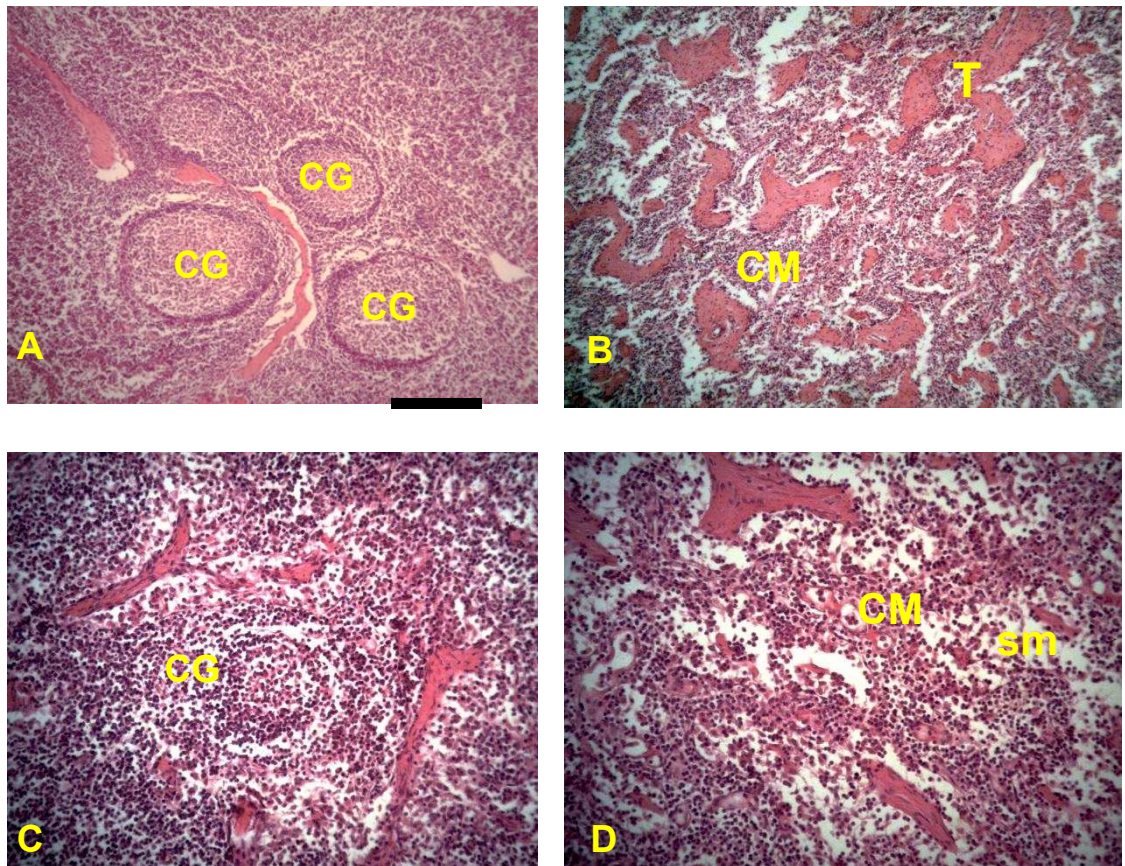


Figura 4. Microfotografia de linfonodos de bovinos controle não imunizados. (A) Folículos linfóides com Centros Germinativos (CG). HE, 100X. (B) Cordões Medulares (CM), e trabécula (T) HE, 100X.; (C) Formação de CG. HE, 200X. (D) CM desorganizados e seios medulares 200X. Eventos observados nos animais das duas fazendas.

Quinze dias após a primeira inoculação, os linfonodos pré-escapulares revelaram hiperplasia das regiões paracorticais e formação de centros germinativos (CGs) (Figura 5A). Os CG apresentaram notável diferenciação da zona clara e zona escura, delimitadas por uma população linfocítica muito homogênea cujas células eram pequenas, com núcleo hipercromático, constituindo a zona do manto (Figura 5E), onde podiam ser observados linfoblastos, principalmente próximos à periferia desta área. Os CGs se caracterizavam por apresentar uma área mais clara constituída por células grandes, com citoplasma escasso, núcleo volumoso, cromatina frouxa ou ligeiramente condensada e com nucléolos evidentes. Também se podiam observar macrófagos e células dendríticas *like* foliculares (Figura 5B). Na

camada após esta área, evidenciava-se uma região cuja população celular era mais numerosa, homogênea, com citoplasma escasso e a cromatina mais condensada, o que corresponde á zona escura.

Estas observações concordam com as descrições de VICTORA e NUSSENZWEIG (2012), que reportam que não existem diferenças quanto à morfologia e tamanho das células tanto da zona clara quanto na zona escura, ou seja, não existe uma barreira física que limite as duas zonas.

Também se observou ligeira hiperplasia dos cordões medulares, principalmente na área mais próxima das áreas paracorticais profundas, semelhante ao descrito por GONZALEZ (2003), PATARROYO *et al* (2009) e TAFUR *et al* (2013) que demonstraram que tanto o peptídeo sintético SBm7462 quanto o recombinante *r*SBm7462, respectivamente, estimularam uma resposta imune que conferiu especificidade e memória imunológica aos quinze dias após a primeira imunização.

Esse achado pode ser explicado pelas observações de BAUMJOHANN *et al.*, (2013) quando afirmam que a resposta imune celular distingue-se pela hiperplasia das áreas paracorticais e surgimento de CGs, sendo característica de um imunógeno T-dependente, ou seja, uma resposta imune adaptativa que exige a interação entre células T e B. Respostas T-dependentes começam quando as células T e B afins para um grupo antigênico interagem nas regiões paracorticais, em ligações cognatas, o que pode explicar a hiperplasia das regiões paracorticais (OKADA, 2005). Por outro lado, essa hiperplasia de cordões medulares que foi observada, se assemelha ao descrito por FU *et al.* (2000), que descreve que os primeiros eventos detectáveis de uma resposta imune em animais imunizados a hiperplasia das zonas T em linfonodos.

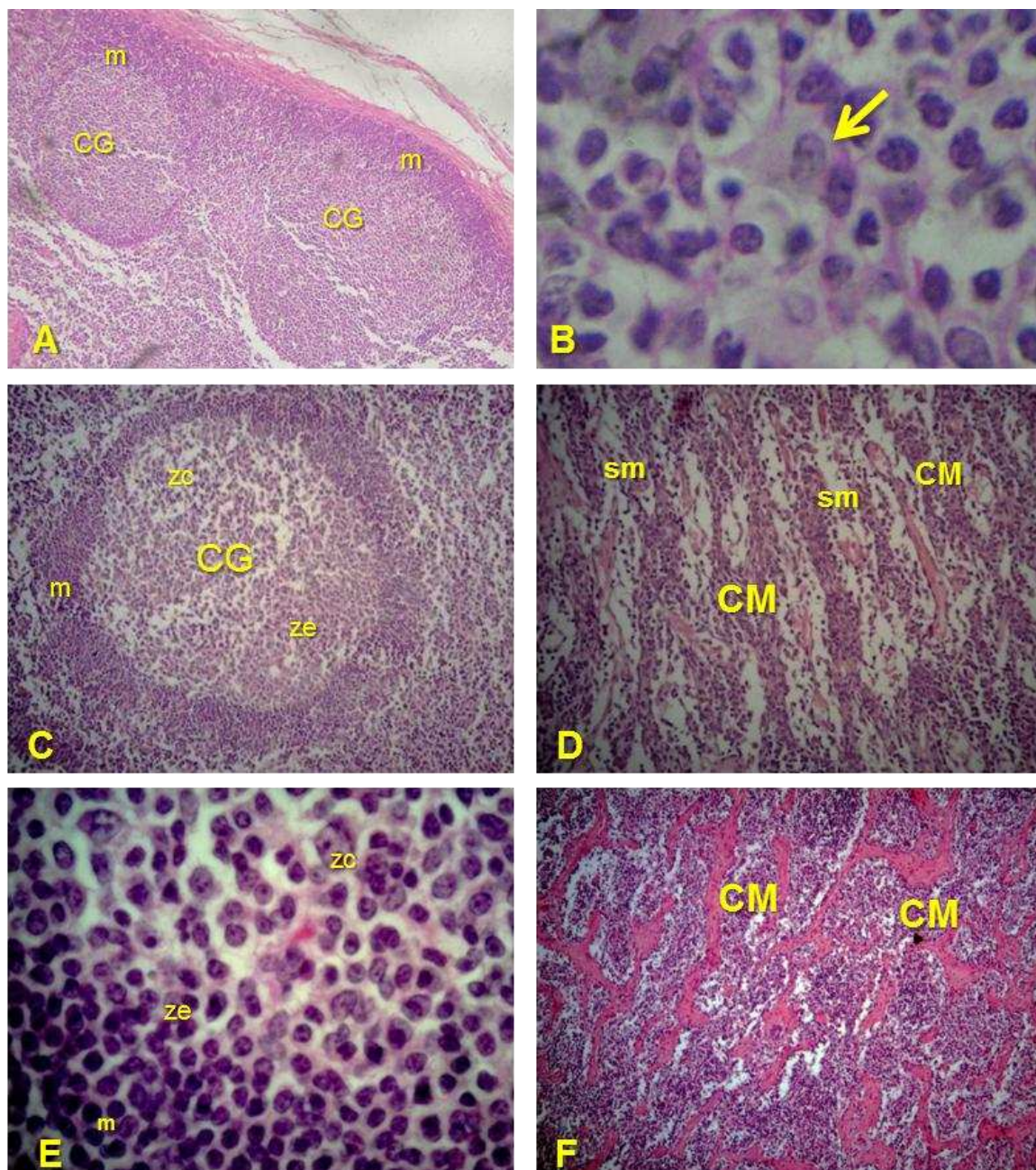


Figura 5. Microfotografia de linfonodos de bovinos imunizados com o peptídeo rSBm7462. (A) Folículos linfóides com Centros germinativos (CG) 15 dias após a primeira inoculação. HE, 400X. (B) Célula dendrítica-like dentro do CG 15 dias após primeira inoculação. HE, 1000X. (C) CG com zona clara (zc), zona escura (ze) e manto (m) 45 dias após a primeira inoculação. HE, 200X. (D) Cordões medulares (CM) hiperplásicos rodeados dos seios medulares (sm) aos 45 dias após a primeira inoculação. HE, 200X. (E) Detalhe do CG, mostrando zc, ze e m. 75 dias após a primeira inoculação. HE, 1000X. (F) CM hiperplásicos 75 dias após a primeira inoculação. HE, 200X.

Eventos celulares nos linfonodos dos animais quinze dias após a primeira imunização assemelham-se aos relatos de PATARROYO *et al.* (2009) ao utilizarem o peptídeo sintético SBm7462®, sete dias após a primeira

imunização. Segundo BOUSSO (2009), esta evolução de eventos nos linfonodos ocorre devido à interação entre as células T *naive* e as células apresentadoras de antígeno (APCs) mediadas pelo Receptor de célula T (TCR) e o pMHC para o *priming* das células T. As observações deste estudo com o imunógeno rSBm7462 são semelhantes aos relatos de TAFUR *et al.* (2013), que comentaram que as alterações histológicas nos linfonodos após a imunização com o peptídeo recombinante desencadeia uma sinapse imunológica que pode ser similar ao que foi observado com o peptídeo sintético SBm7462® descrito por PATARROYO *et al* (2009).

ALLEN *et al.* (2007) demonstraram que uma vez que acontece a interação entre as células APCs e as células T, posteriormente ocorrem contatos estáveis entre as células T e B nas bordas dos folículos após estimulação. VICTORA e NUSSENZWEIG (2012) reportam que a migração bidirecional de células B entre as zonas clara e escura do CG é necessária nos processos de proliferação, mutação, seleção, diferenciação, maturação e afinidade, que acontecem em um ciclo repetitivo. Na zona clara, as células B se unem com os antígenos e são selecionadas, segundo a afinidade por estes. Os sinais recebidos através dos receptores de células B (BCR) são eventos essenciais para a sobrevivência destas células. Uma vez selecionadas elas migram à zona escura e ocorre a proliferação. Segundo estes mesmos autores, as células B dos CG constantemente se transformam dependendo de sinais seletivos para sair destas zonas e sofrer modificações estruturais e funcionais. Este novo modelo baseia-se nas diferentes características de expressão genética, comportamento dinâmico e tamanho celular observados.

Segundo FOOKSMAN *et al.* (2010), a hiperplasia dos cordões medulares são dependentes do estágio da resposta imune e também pode relacionar-se com reações plasmocitárias extrafoliculares nos cordões medulares, onde podem-se encontrar células plasmáticas de curta e longa duração. Assim, as células plasmáticas finais de longa duração são produtos de respostas T-dependentes (LUTHER, 2010). Tais eventos foram observados aos 15 dias após a primeira inoculação com o peptídeo recombinante rSBm7462 anti *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sugerindo o desenvolvimento de uma amplificação clonal que pode estar relacionada com a geração de células plasmáticas. Estes eventos imunes são semelhantes ao

que foi constatado por PATARROYO *et al.* (2009) quando usaram o peptídeo sintético SBm7462[®].

As amostras dos linfonodos obtidas nos dias 45 e 75 dias após a primeira inoculação revelaram maior número de folículos linfoides com centros germinativos, além de hiperplasia dos cordões medulares com presença de plasmócitos (figura 5D e 5F), concordando com o descrito por GONZALEZ (2003), que associou tal evento com a soropositividade antígeno-específica evidenciada no ELISA.

Ao analisar os linfonodos de animais imunizados 45 dias após a primeira imunização apresenta-se forte resposta de CGs e marcada hiperplasia nas regiões paracorticais e medulares (Figura 5C e 5D e 5F).

A hiperplasia observada em áreas T-dependentes após a segunda imunização, pode ser explicada devido à resposta de células T após o segundo desafio, que geralmente é mais rápida e efetiva do que o desafio antigênico inicial, como consequência do aumento no número de células antígeno-específicas e de memória que respondem de forma mais eficiente que as células *naïve* durante as repostas primárias (SAKAMOTO e CABRERA, 2003).

No sistema de células B, a proteção imediata é mediada pelas células plasmáticas de longa duração que estão presentes na medula óssea e secretam anticorpos, mantendo quantidade constante no soro e nos fluidos corporais. Por outro lado, no sistema de células T, a proteção imediata é conferida por células T de memória efectoras (Tem) residentes nos tecidos, células sobreviventes após interagirem com o antígeno em diversos tecidos. As células T de memória central (Tcm) patrulham os tecidos linfoides secundários onde podem rapidamente proliferar em resposta a antígenos apresentados pelas DC-*like*. O conhecimento destes dois mecanismos é fundamental em estratégias de vacinação na forma em que se relaciona com a natureza e via do antígeno inoculado (SALLUSTO *et al.*, 2010).

O surgimento de estruturas que conferem imunidade após imunização com o peptídeo recombinante rSBm7462, sugere interações transitórias, nas quais nesses contatos as células T não param completamente; porém, rolam na superfície das DC-*like* e se afastam rapidamente. Caso o processo seja repetido, as células T podem se ligar em curtas interações seriadas com várias DC-*like* (BREART e BOUSSO, 2006).

A hiperplasia de cordões medulares com o surgimento de numerosas células caracterizadas como células plasmáticas e linfocíticas, em maior número aos 45 dias após a primeira inoculação (Fig., 5D e 5F), corresponderiam tanto a linfócitos B diferenciados em plasmócitos produtores de imunoglobulinas em resposta ao imunógeno *rSBm7462*, e também a linfócitos T maduros que migraram à região dos cordões medulares e seguidamente para o sistema circulatório linfático, afirmações realizadas por diferentes autores durante a resposta imune humoral (MUELLER *et al.*, 2013; CANNONS *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2013). Isto provavelmente não significa que as populações celulares nos dois períodos apresentem a mesma afinidade.

Os achados descritos neste trabalho, assemelham-se ao relatado por GONZALEZ (2003) com a imunização com o peptídeo sintético SBm7462, quando sugerem que os imunógenos utilizados foram capazes de provocar uma resposta imune com produção de células de memória. Segundo MORRISON *et al.* (1986), as duas principais funções dos CGs são a produção de células de memória e, seguidamente, a produção de anticorpos. Além do mais, considera-se que as características histológicas dos CGs constatadas neste estudo, também descritas em órgãos linfóides periféricos de bovinos (SAKAMOTO e CABRERA, 2003), são características do desenvolvimento de CGs em resposta a antígenos T-dependentes (FREITAS, 2001; RESENDE, 2003).

Ao analisar os linfonodos dos animais 75 dias após a primeira imunização observou-se que a quantidade de folículos linfóides com CGs era menos evidente que aqueles observados nas duas imunizações anteriores, embora a reatividade fosse similar, assim como a marcada hiperplasia dos cordões medulares (Figura 5E e 5F). Porém, se compararmos a evolução das respostas celulares nos diferentes períodos (Figura 5) é possível observar que essas respostas relacionadas à formação dos CGs e a hiperplasia dos cordões medulares correspondem a alterações celulares que indicam afinidade e memória imunológica como resposta imune induzida pelo peptídeo recombinante *rSBm7462*.

5.2. Imunoistoquímica para detecção de antígeno *rSBm7462*.

Nos animais controle não foram observadas células PAP+ (Figura 6A). Já nos animais imunizados com o peptídeo *rSBm7462* 15 dias após a primeira inoculação foram encontradas células PAP+ nos cordões medulares e nos CGs (Figura 6B). As células marcadas foram claramente distinguíveis das células não marcadas. Aos 45 e 75 dias após a primeira imunização foi observada presença de células PAP+ na região paracortical. Entretanto, essas células PAP+ foram mais intensamente marcadas nos cordões medulares, aos 45 e 75 dias após a primeira imunização (Figura 6C e 6G).

Aos 15 dias após a primeira imunização, pode-se observar células linfocíticas interagindo com células dendríticas-*like* PAP+ como visto na figura 6B, sugerindo a interação e apresentação do peptídeo *rSBm7462*, concordando com os relatos de TAFUR (2013) e aqueles observados por GONZALEZ (2003), PATARROYO (2009) quando utilizaram o peptídeo sintético SBm7462.

PAL e RAMSEY (2011) explicam que, geralmente, quando um antígeno é injetado através da via subcutânea, se não entra nos sistemas sanguíneo ou linfático, ele interage no sítio de inoculação com as DC-*like*, monócitos e neutrófilos que são sequestrados devido à inflamação. As células apresentadoras de antígeno (APC's) migram para os linfonodos onde serão reconhecidos e processados por células especializadas. RANDOLPH *et al.* (2005) indicam que as DC-*like* são altamente móveis e reconhecem antígenos estranhos para transportá-los rapidamente até os linfonodos através dos vasos linfáticos aferentes. Entretanto, dependendo do tamanho e características estruturais do antígeno existem outras vias de transporte por outros tipos celulares como: células dendríticas plasmacitóides (pDC's), monócitos nos vasos sanguíneos, e linfócitos B ou macrófagos residentes nos órgãos linfoides periféricos. Alternativamente, o antígeno solúvel pode entrar diretamente nos capilares e vasos linfáticos e ser transportado até os tecidos linfoides secundários onde os linfócitos B e as DC-*like* e macrófagos capturam o antígeno.

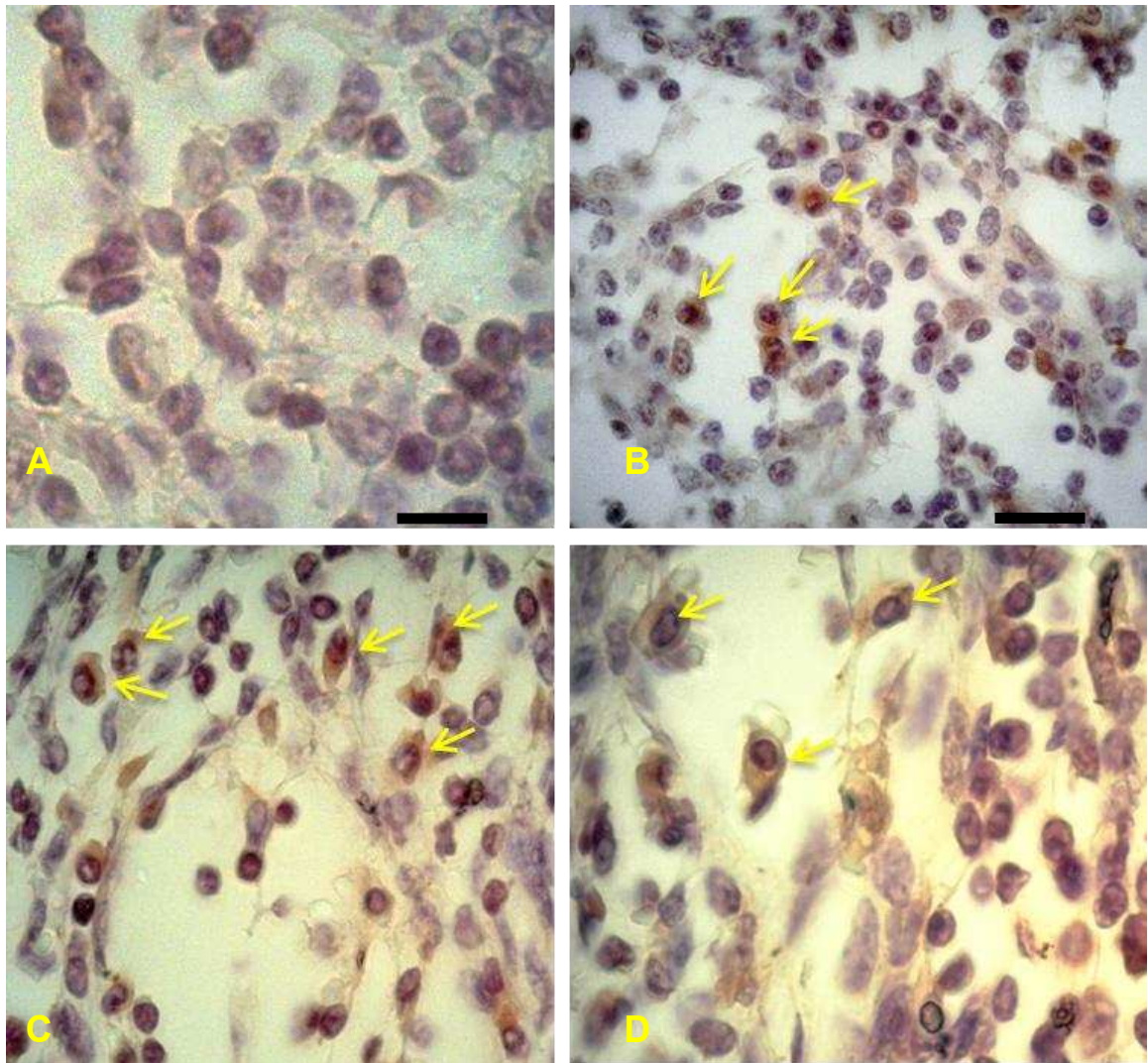


Figura 6. Microfotografia de linfonodos de bovinos imunizados com rSBm7462 Técnica Imunoistoquímica Peroxidase – Anti – Peroxidase (PAP). (A) Controle, 1000X. (B) Células PAP+ nos cordões medulares 15 dias após imunização 1000X. (C) Células PAP+ em Cordões Medulares (CM) 45 dias após imunização 1000X. (D) Células PAP+ em Centro Germinativo (CG) 75 dias após primeira imunização, 1000X.

PATARROYO *et al.*, (2009) observaram células positivas PAP+ após 7 dias da imunização com o peptídeo sintético SBm7462, considerando que o antígeno foi capturado e retido por DC-*like* residentes, transportando-se através da rede do *conduit* para iniciar a ativação das células T. Neste trabalho, as coletas de linfonodos se iniciaram 15 dias após a primeira inoculação, e foram observadas células PAP+, mostrando que o peptídeo é facilmente processado por células DC-*like*. Devido ao peso molecular do peptídeo recombinante ser 6,5 kDa, e levando em consideração que antígenos de baixo peso molecular podem passar pelo sistema de *conduit*, possibilitou, esses aspectos possibilitaram o aparecimento do antígeno aos sete dias como foi relatado por

PATARROYO *et al.*, (2009). Entretanto, se as coletas dos linfonodos tivessem ocorrido antes dos quinze dias após imunização, provavelmente, esses mesmos eventos poderiam ter sido observados. Portanto, sugere-se que o peptídeo recombinante *rSBm7462* foi capturado eficientemente pelas células DC-like, as quais corresponderiam as células PAP+ deste trabalho, concordando com os achados de GONZALEZ (2003), PATARROYO (2009) e TAFUR (2013).

Esses eventos são controlados pelas células reticulares fibroblásticas (FRC) para limitar a entrada e a dinâmica das células T *naïve* no paracórtex, mediante liberação de quimiocinas e citocinas. Uma pequena porção da rede não é coberta por células reticulares. Nesta área, as APC's e os macrófagos estão em contato direto com os antígenos solúveis presentes no *conduit* (PAL e RAMSEY, 2011).

A presença de células PAP+ observadas nos CGs aos 15 dias após a primeira imunização, pode ser explicada pelos relatos de MONSERRAT *et al.* (2013), que afirmam que as células dendríticas foliculares (FDC) não são células dendríticas, pelo fato de não terem a capacidade de processar nem apresentar antígenos em moléculas de classe II; porém, podem reter complexos imunes mediante receptores Fc na superfície celular, por um período prolongado, durante a reação do centro germinativo. Além disso, acredita-se que as células B com receptores específicos para o antígeno são selecionadas sobre as FDC, o que contribui na maturação e afinidade (VICTORA e NUSSENZWEIG, 2012).

Aos 45 dias após a primeira imunização com o peptídeo *rSBm7462*, foi possível visualizar incremento das células PAP+ principalmente na região dos cordões medulares, o que pode explicar a hiperplasia desta região, a qual está relacionada com a memória imunológica e a rápida expansão clonal induzida.

6. CONCLUSÕES

A resposta induzida pelo peptídeo recombinante *rSBm7462* foi caracterizada nos tecidos linfóides secundários pela formação de estruturas que conferem afinidade e memória imunológica. O peptídeo recombinante *rSBm7462* induziu uma resposta imune adaptativa T-dependente. O peptídeo foi detectado nos linfonodos dos bovinos analisados através da imunoistoquímica durante o decorrer do experimento.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Associação Brasileira de Indústrias Exportadoras de Carnes. **Exportações brasileiras de carne bovina**. Período: jan/2013 - jun/2013. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br>>. Acesso em: 28 ago. 2013.

ALLEN C. D., OKADA, T., & CYSTER, G. J. Germinal Center organization and cellular dynamics. **Immunity**. 27: 190-202. (2007).

ALLEN, C. D., OKADA, T., TANG, H.L., & CYSTER, J.G.. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. **Science**. 315: 528–531. (2007).

ALVES-BRANCO, F. P. J.; ECHEVARRIA, F. A. M.; SIQUEIRA, A. S. Garça vaqueira, (*Egretta ibis*) e o controle biológico do carrapato (*Boophilus microplus*). Bagé: EMBRAPA-UEPAE, 1983. 4 p. (Comunicado Técnico, 1).

ANDRÉ, F. E. The future of vaccines, immunization concepts and practice Vaccine, v. 19, p. 2206 – 2209, 2001.

ANDREOTTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil**. Embrapa Gado de Corte: ISSN 1983-974X. . Campo Grande, MS. 36 p. 2010.

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

BAJÉNOFF, M.; EGEN, J.; KOO, L. Y.; LAUGIER, J. P.; BRAU, F.; GLAICHENHAUS, N.; GERMAIN, R. N. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. **Immunity**. 25(6): 989–1001. 2006.

BARNARD, A.-C., NIJHOF, A.M., GASPAR, A.R.M., NEITZ, A.W.H., JONGEJAN, F., MARITZ- OLIVIER, C. Expression profiling, gene silencing and transcriptional networking of metzincin metalloproteases in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Vet. Parasitol.** 186, 403–414. 2011.

BAUMJOHANN, D.; PREITE, S.; REBOLDI, A.; RONCHI, F.; ANSEL, M. K.; LANZAVECCHIA, A. E SALLUSTO, F. Persistent antigen and germinal center b cells sustain t follicular helper cell responses and phenotype. **Immunity** 38, 596–605. 2013.

BEATI, L., KEIRANS, J. E. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **J. Parasitol.** 87:32-48. 2001.

BELLEGARD, M., MOOLHUIJZEN, P.M., GUERRERO, F.D., SCHIBECI, D., RODRIGUEZ-VALLE, M., PETERSON, D.G., DOWD, S.E., BARRERO, R., HUNTER, A., MILLER, R.J., LEW-TABOR, A.E., CattleTickBase: an integrated

Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Int. J. Parasitol.** 42, 161-169. 2012.

BOLLOK, M.; RESINA, D.; VALERO, F.; FERRER, P. Recent patents on the *pichia pastoris* expression system: expanding the toolbox for recombinant protein production. **Recent Patents on Biotechnology**, 3, 192-201. 2009.

BORTNICK A.; CHERNOVA, I.; QUINN, W. J. III.; MUGNIER, M.; CANCRO, M. P.; E ALLMAN, D.; Long-lived bone marrow plasma cells are induced early in response to T cell-independent or t cell-dependent antigens. **J Immunol**; 188:5389-5396. 2012.

BOUSSO, P.; KOURILSKY, P. A clonal view of ab T cell responses. **Semin. Immunol.**, v. 11, p. 423-431, 1999.

BOUSSO, P. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nature Rev. Immunol.* 8: 675–684. 2009.

BOUSSO, P.; ROBEY, E. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nature Immunol.* 4:579–585. 2003.

BRAKE, D.K., PÉREZ DE LEÓN, A.A., Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. **Parasites Vect.** 5, 38. 2012.

BREART, B e BOUSSO P. Cellular orchestration of T cell priming in lymph nodes. **Current opinion in immunology**. 18(4):483-90. 2006.

BRUM, J. G. W. **Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecia lapagei* (Grimont et al. 1981): etiopatogenia e sazonalidade**. 1988. 95 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1988.

CANALES, M., VILLAR, M., DE LA FUENTE, J. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. **Vaccine** 30, P265–272. 2012.

CANALES, M., ALMAZAN, C., NARANJO, V., JONGEJAN, F., DE LA FUENTE, J., Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. **BMC Biotechnol.** 9, 29. 2009.

CANNONS, J. L.; LU, K, T.; SCHWARTZBERG, P. L. Lymph node choreography: B cells take the lead. **Nature Immunology**. 13, 7. 630-632. 2012.

CASTRO-JANER, E., MARTINS, J.R., MENDES, M.C., NAMINDOME, A., KLAFKE, G.M., SCHUMAKER, T.T., Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. **Vet. Parasitol.** 173: 300-306. 2010a.

CASTRO-JANER E, RIFRAN L, GONZALEZ P, PIAGGIO J, GIL A, SCHUMAKER TTS. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays. **Vet Parasitol.** 169(1-2): 172-177. 2010b.

CAVALCANTI, M. P.; LORENA, V. M. B.; GOMES, Y, M.; Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Rev. Patol. Trop.** 37 (1): 1-14. 2008.

CEREGHINO, G. P.L.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 422-427, 1999.

CEREGHINO, J. L. CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Review**, 24: 45-66. 2000.

CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of 1 recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current 2 Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 329-332, 2002.

CHAI, Q.; ONDER, L.; SCANDELLA, E.; GIL-CRUZ, C.; PEREZ-SHIBAYAMA, C.; CUPOVIC, J.; DANUSER, R.; SPARWASSER, T.; LUTHER, S. A.; THIEL, V.; RÜLICHE, T.; STEIN, J. V.; HEHLGANS, T E LUDEWIG, B. Maturation of lymph node fibroblastic reticular cells from myofibroblastic precursors is critical for antiviral immunity. *Immunity* 38, 1013–1024, May 23, 2013.

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

COBON, G., HUNGERFORD, WOODROW M., SMITH, D., WILLADSEN, P. Vaccination against *Boophilus microplus*: the Australian field experience. Recombinant Vaccines for the control of cattle tick. Habana: *Elpos Scientiae*, 280 p., 1995.

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

COUTO-PIMENTEL, J. C. **A vacina sintética SBm7462 no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em animais estabulados e a campo**. 2002. 87p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.

CUNHA, R. C.; PÉREZ DE LEÓN, A. A.; PEREIRA, F. L. L; DA SILVA PINTO, L; GONÇALVES DOS SANTOS, A; ANDREOTTI, R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 254-262, 2012.

DAIRY, 2011. In: ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. *PSD: production, supply and distribution online*. Reports. Washington, D.C.: United States Department of Agriculture - USDA, 2011. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: ago. 2013.

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

DE LA FUENTE, J., KOCAN, K.M. 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. **Parasite Immunol**. 28: 275–283.

DE LA FUENTE, J., KOCAN, K.M. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. **Parasite Immunol**. 28: 275–283. 2006.

DE LA FUENTE, M, J. RODRÍGUEZ, H. FRAGOSO et al., Efficacy of vaccination with Gavac™ in the control of *Boophilus microplus* infestations. In: J. de la Fuente, Editor, Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick, Elfos Scientiae, La Habana, Cuba pp. 177–185, 1995.

DE LA FUENTE J., ALMAZÁN C., CANALES M., PÉREZ DE LA LASTRA J.M., KOCAN K.M. & WILLADSEN P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. Animal Health Research Reviews/ Conference of Research Workers in Animal Disease. 8(1): 23-8. 2007.

ELDER, J. K. et al. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistance cattle and pasture spelling. Aust. Vet. J., Victoria, v. 56, n. 5, p. 219-231, 1980.

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

FAO (Food and Agriculture Organization). Tick and tick-borne diseases: selected articles from the World Animal Review, vol. 36. FAO Animal Production and Health Paper, Rome, Italy. 1983.

FAO. Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention, pp. 25-77. Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines. 2004.

FOOKSMAN, D.R., SCHWICKERT, T., VICTORA G.D. Development and Migration of Plasma Cells in the Mouse Lymph Node. **Immunity**. 33(1):118-127. 2010.

FU, Y., SAINT-ANDRÉ, M.I., MARCHAL, T., BOSQUET, G., PETAVY, A.F. Cellular immune response of lymph nodes from dogs following the intradermal injection of a recombinant antigen corresponding to a 66kDa protein of *Echinococcus granulosus*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 74, p. 195-208. 2000.

FURLONG, J. **Carrapatos dos bovinos: conheça bem para controlar melhor**. Juiz de Fora, MG: EMBRAPA-CNPGL, Circular Técnica, 46. 1998. 21p. ISSN 0100-8757.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 25 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular técnica, 59). 2000.

FREIRE, J. J. Arseno e cloro resistência e emprego de tiofosfato de dietilparanitrofenila (Parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Bol. Dir. Prod. Anim. 9:3-31. 1953.

FREITAS, C. M. B. **Resposta immune induzida por *Babesia bovis* (Starcovicci, 1983): reconhecimento e ativação ex vivo de PBMC por peptídeos sintéticos e eventos celulares em linfonodos de bovinos.** Viçosa: UFV, 2001. 91p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

GÁRCIA-GÁRCIA, J. C.; SOTO, A.; NIGRO, F.; MAZZA, M.; JOGLAR, M.; HECHEVARRIA, M.; LAMBERTI, J.; FUENTE, J. Adjuvant and immunostimulating properties of the recombinant Bm86 protein expressed in *Pichia pastoris*. Vaccine, v. 16, p. 1053-1055, 1998.

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. Control of Ticks resistant to the immunization with BM86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *B. microplus*. **Vaccine**. 18: 2275-2287. 2000.

GASPAL, F.M., LANE, P.J., KIM, M.Y. 2004. Two sides of a cellular coin: CD4+CD3- cells regulate memory responses and lymph-node organization. **Nat. Rev. Immunol.** 5:655-60.

GELLISSEN, G., Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Appl. **Microbiology Biotechnology**, v, 54,n. 7, p. 741-750, 2000.

GONZÁLES, J. C. **O controle do carrapato do boi.** 2. ed. Porto Alegre: Sulina, 235 p. 1995.

GONZÁLEZ, C. Z. **Resposta imune de bovinos vacinados com peptídeo sintético Sbm7462 com vistas ao controle do *Boophilus microplus* (CANESTRINI,1887).** 2003. 91p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

GOUGH, J. M., KEMP, D. H. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labelling. **J. Parasitol**, v. 79, p. 900-907, 1993.

GRAF JF, GOGOLEWSKI R, LEACH-BING N, SABATINI GA, MOLENTO MB, BORDIN EL, *et al.* Tick control: an industry point of view. **Parasitol**; 129:427-442. 2004.

GRISI, L. The economic impact of parasitism in cattle in Brazil. In: International symposium on tick control and tick-borne diseases, I, 2013, Campo Grande, MS. **The economic impact of parasitism in cattle in Brazil.** Brasília, DF: Embrapa Gado de Corte, 2013.

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

GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Acaricide Resistance Mechanisms in *Rhipicephalus microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** Jaboticabal, SP, v.21, n. 1, p. 1-6. jan./mar. 2012a.

GUERRERO, F. D., MILLER, R. J., PEREZ DE LEON, A. A. Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? p 421–427. **Int. J. Parasitol** 42. 2012b.

GUGLIELMONE, AA, ROBBINS, RG, APANASKEVICH, DA, PETNEY, TN, ESTRADA-PENA, A, HORAK, IG, SHAO, R & BARKER SC. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa* 2528: 1–28. 2010.

GULBRANSON-JUDGE; MACLENNEN, I. Sequential antigen-specific growth of T cells in the T zones and follicles in response to pigeon cytochrome C. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 1830-1837, 1996.

HAJEK AE, DELALIBERA JR I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **BioControl**; 55:147-158. 2012.

HERNÁNDEZ A. F. El manejo integrado en el control de garrapatas. Manual de Ganadería Doble Propósito. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. p 384-391. 2005.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2011. **Produção da pecuária municipal (PPM) / Ministério da Agricultura**. ISSN: 01014234. Vol. 39. 63p. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 03 jul. 2013.

INTERNATIONAL CONSORTIUM OF TICKS AND TICK-BORNE DISEASES (ICTTD) 2004. **Ticks of Veterinary and Medical Importance**. A series of three CD's on ticks on livestock in Africa, the Mediterranean Region and Latin America (<http://www.ictt.nl>).

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

JONSSON NN, MATSCHOSS AL, PEPPER P, GREEN PE, ALBRECHT MS, HUNGERFORD J AND ANSELL J. Evaluation of tick- GARD(PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein–Friesian cows. **Veterinary Parasitology** 88: 275–285. 2000.

KEARNEY, S. Acaricide (Chemical) Resistance in Cattle Ticks. Comunicado técnico do Northern Territory Government. ISSN 0157-8243 (No. 845) Agdex No. 420/662. 2013.

KELSOE, G. In situ studies of the germinal center reaction. **Adv. Immunol.**, v. 60, p. 267-288, 1995.

KEMP, D. H., AGBEDE, R. I.S., JOHNSTON, L. A. Y.; GOUGH, J. M. immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts deriver from adult female ticks: feeding and survival of parasite on vaccinated cattle. *Int. J. Parasitoogyl.*, v. 16, n.2, p.115-120, 1986.

LABRUNA, M. B.; NARANJO, V.; MANGOLD, A. J.; THOMPSON C.,; ESTRADA-PEÑA, A.; GUGLIELMONE, A. A.; JONGEJAN, F.; e DE LA FUENTE, J. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Evolutionary Biology**; 9:46-58. 2009.

LEAL A.T., SEIXAS A., POHL C.P., FERREIRA C.A., LOGULLO C., OLIVEIRA P.L., FARIAS S.E., TERMIGNONI C., DA SILVA VAZ JR. I. e MASUDA A. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 114(3-4): 341-345. 2006.

LEE, R. P., OPDEBEECK, J. P. Antigens identified by monoclonal antibodies in tissue sections of *Boophilus microplus*. *Int. J. Parasitol.*, v. 25, p. 241-248, 1994.

LEVY PS; LEMESHOW S. Sampling for health professionals. Belmont: LLP, 1980.

LI, A.Y.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J.; GEORGE, J. E. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n.2, p. 193-200, Mar. 2004.

LIMA, W.S; RIBEIRO, M.F; GUIMARAES, M.P. Seasonal Variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in Cattle in Minas Gerais State, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, 32 (6) 375-380. 2000.

LIU, Y-J., JOHNSON, G D., GORDON, J. AND MACLENNAN, I. C.M. Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. **Immunol Today** ,v.13, p. 17-21, 1992.

LIU, Y.J., ARPIN, C. Germinal center development. **Immunol. Rev.** 156: 111–126. 1997.

LOVIS L. **Evaluation Of Acaricide Resistance In The Cattle Tick, *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*, Using A New In Vitro Test And Molecular Tools**. 2012. 204p. Tese (Doutorado), Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel, Neuchâtel. 2012.

LUTHER, S. Plasma cell precursors: long-distance travelers looking for a home. **Immunity**. 33(1):9-11. 2010.

LWANGA SK; LEMESHOW S. Sample size determination in health studies: a practical manual. Geneva: World Health Organization, 1991.

MACAULEY. S., P.; FAZENDA, M., L.; MCNEIL, B., HARVEY, L., M., Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*; 22: 249–270. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/yea.1208. 2005.

MACLENNAN M I C. Germinal Centers. **Ann Rev Immunol**. Vol. 12, p. 117-139,1994.

MARTINS, A. R. L., ROCHA, R. S., PORTZ, A. J., MOITA, S. R., FEIJÓ, L. D., DANTAS, R. M. **USO DA IVERMECTINA NA BOVINOCULTURA DE CORTE DO BRASIL E O SEUS IMPACTOS ECONÔMICOS**. Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2010.

MILAZZOTTO, M. P.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O.; BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO ANIMAL. **Ciênc. vet. tróp**. Recife-PE, v. 11, suplemento 1, p.145,-148 abril, 2008.

MILLER, R. J., W. H. WHITE, R. B. DAVEY, J. E. GEORGE, e L. A. PEREZ DE. Efficacy of spinosad against acaricide-resistant and -susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and acaricide-susceptible *Amblyomma americanum* and *Dermacentor variabilis*. **J. Med. Entomol**. 48:358-365. 2011.

MIRANDA, R. N.; KHOURY, J. D.; MEDEIROS, L. J. Reactive follicular hyperplasia. atlas of anatomic pathology. pp 11-13. 2013.

MONSERRAT, J. S.; REYES, M. E.; PRIETO, A. M.; Células presentadoras de antígeno. **Medicine**. 11(28):1720-7. 2013.

MORRISON, W.I.; LALOR, P.A.; CHRISTENSEN, A.K. e WEBSTER, P. Cellular constituents and structural organization of bovine thymus and lymph node. In: **The ruminant immune system in health and disease** (Morrison, W.I.), Cambridge University, 1986.

MUELLER, S. N.; GEBHARDT, T.; CARBONE, F. R. HEATH, W. R. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. **Annu. Rev. Immunol**. 2013.31:137-161. 2013.

MURRELL, A., CAMPBELL, N. J., BARKER S. C. Phylogenetic analyses of the rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. **Mol. Phylogenet. Evol**. 16:1-7. 2000.

NEVES DE SOUSA, E. **Avaliação da eficácia das vacinas recombinantes rBm7462 – SEQ1 e rBm7462-SEQ4 contra o carrapato *Rhipicephalus microplus***. 2011. 87p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

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

NUTTALL, P.A., TRIMNELL, A.R., KAZIMIROVA, M, LABUDA, M., Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite immunology*, v. 28, p. 155-163, 2006.

OAKESHOTT, J. G.; HOME I.; SUTHERLAND, T. D.; RUSSELL, R. J. The genomics of insecticide resistance. **Genome Biology**, v.4, p. 1-4, Issue1. Article 202. Jan. 2003.

OKADA, T., MILLER, M.J., PARKER, I., KRUMMEL, MF., NEIGHBORS, M., HARTLEY, S.B., O'GARRA, A., CAHALAN, M.D., CYSTER, J.G. Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. **PLOS. Biol.** 3: 150. 2005.

OLIVEIRA TMV. Amostragem não probabilística: adequação e situações para uso e limitações de amostras por conveniência, julgamento e cotas. **Rev Adm On Line** 2001 jul/ago/set.; 2(3).

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Substâncias químicas perigosas à saúde e ao ambiente. São Paulo: Cultura Acadêmica, ISBN 978-85-98605-47-0. 106 p. 2000.

PAL, I; RAMSEY J. D. The role of the lymphatic system in vaccine trafficking and immune response. **Advanced Drug Delivery Reviews** 63 909–922. 2011.

PARIZI, L.F., POHL, P.C., MASUDA, A., DA SILVA VAZ JR., I., New approaches toward *anti-Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal** 18, 1–7. 2009.

PARIZI, L.F., UTIUMI, K.U., IMAMURA, S., ONUMA, M., OHASHI, K., MASUDA, A., DA SILVA VAZ JR., I., Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Exp. Parasitol.** 127, 113–118. 2011.

PARIZI. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: A field evaluation 2012.

PATARROYO, J. H.; VARGAS, M. I. **Fatores de resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 9p. 1982.

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

PATARROYO, J. H., 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. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *B. microplus* gut protein (Bm86). **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 88: p.163 – 172. 2002.

PATARROYO, J.H; VARGAS, M.I; GÓNZALEZ, C.Z; GUZMAN, F; MARTISNS-FILHO, O.A; AFONSO, L.C.C; VALENTE, F.L; PECONICK, A.P; MARCIANO, A.P; PATARROYO, A.M; SOSSAI, S. Immune response of bovines stimulated

by synthetic vaccine SBm7462[®] against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 166 p. 333-339. 2009.

PECONICK, A. P. **Conservação de sequências nucleotídicas do gene bm86 e das sequências peptídicas 4822 e 4823, constituintes da vacina sintética SBm7462**. 2008. 81p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

PECONICK, A. P., SOSSAI, S., GIRÃO, F. A., RODRIGUES, M. Q. R. B., SOUZA e SILVA, C. H., GUZMAN, F., PATARROYO, A. M., VARGAS, A. M., VARGAS, M. I., PATARROYO, J. H. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. **Experimental Parasitology**, 119: 37-43. 2008.

PEREIRA, A., A. **Aspectos ecológicos de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARINA: IXODIDAE) no município de Franca, nordeste de São Paulo**. Jaboticabal, 2008, 106 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P.; KLAFKE, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (biologia, controle e resistência)**. São Paulo: MedVet, 169 p. 2008.

PEREZ-COGOLLO LC, RODRIGUEZ-VIVAS RI, RAMIREZ-CRUZ GT, MILLER RJ. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. **Vet Parasitol**; 168(1-2): 165-169. 2010.

PLAYFORD, M., Review of Research Needs for Cattle Tick Control, Phases I and II, Meat & Livestock Australia Limited, North Sydney, ISBN 1 74036 685 9. 2005.

POPARA, M.; VILLAR, M.; MATEOS-HERNÁNDEZ, L; FERNÁNDEZ DE MERA, I. G.; DE LA FUENTE, J. Proteomics Approach to the Study of Cattle Tick Adaptation to White Tailed Deer. **BioMed Research International**. 8p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/319812>. 2013.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B; SOBIN, L. H. Laboratory methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, DC. 279 p. 1992.

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

RANDOLPH, J., ANGELI, V., SWARTZ. A. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. **nature reviews immunology**. 5 : 617-628. 2005.

RESENDE M.D. **Resposta celular em linfonodos de bovinos inoculados com *Anaplasma marginale***. Viçosa: UFV, 2003. 60p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, 2003.

ROCHA, U. F. Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini). Jaboticabal: (Boletim Técnico) FCAV-UNESP, 35 p. 1984.

ROCHA-WOELZ, C.; ROCHA, U.F. Ecologia de carrapatos. I. Predatismo de formigas sobre carrapatos e seus ovos. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 8., 1983, São Paulo. Resumos... São Paulo: Sociedade Brasileira de Parasitologia, p.133. 1983a.

ROCHA-WOELZ, C.; ROCHA, U.F. Ecologia de carrapatos. II. Predatismo de aranhas sobre o carrapato comum dos bovinos. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 8., 1983, São Paulo. Resumos... São Paulo: Sociedade Brasileira de Parasitologia, p.135. 1983b.

RODRIGUEZ M, RUBIERA R, PENICHET M, MONTESINO R, CREMATA J, FALCON V, SANCHEZ G, BRINGAS R, CORDOVEZ C, VALDES M, LEONART R, HERRERA L AND DE LA FUENTE J. High level expression of the *Boophilus microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal of Biotechnology** 33: 135–146. 1994.

RODRIGUEZ VALLE M, MENDEZ L, VALDEZ M, REDONDO M, ESPINOSA C., VARGAS M, CRUZ R., BARRIOS H., SEOANE G, RAMIREZ ES, BOUE O, VIGIL J., MACHADO H, NORDELO C. e PINEIRO M. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac. **Experimental and Applied Acarology** 34: 375–382. 2004.

ROMERO-PALOMO, F.; RISALDE, M. A.; MOLINA, V.; SÁNCHEZ-CORDÓN, P. J.; PEDRERA, M. e GÓMEZ-VILLAMANDOS J. C. Immunohistochemical Detection of Dendritic Cell Markers in Cattle. *Vet Pathol* published online 25 March 2013.

ROOZENDAAL, R.; MEBIUS, R.; KRAAL, G. The conduit system of the lymph node. **International Immunology**, Vol. 20, No. 12, pp. 1483–1487. 2008.

ROSENTHAL, K.S & ZIMMERMAN, D.H., 2006. Vaccines: all things considered. **Clin. Vaccine Immunol.** 19: 821–829.

SAKAMOTO T, CABRERA PA. Immunohistochemical observations on cellular response in unilocular hydatid lesions and lymph nodes of cattle. **Acta Trop.** V. 85, n. 2, p. 271-9, 2003.

SALLUSTO, F; LANZAVECCHIA, A; ARAKI, K; AHMED, R. From Vaccines to Memory and Back.. **Immunity** 33, 451- 463.DOI 10.1016/j.immuni.2010.10.008. 2010.

SEIXAS A.; DOS SANTOS P.C.; VELLOSO F.F.; DA SILVA VAZ JR.; I., MASUDA A.; HORN F.; TERMIGNONI C. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. **Parasitology**. 126: 155-163. 2003.

SEIXAS A., LEAL A.T., NASCIMENTO-SILVA M.C., MASUDA A., TERMIGNONI C. & DA SILVA VAZ JR. I. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 124(3-4): 322-340. 2008.

SINCLAIR AM, ELLIOTT S. Glycoengineering: The effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. **J Pharm Sci** 2005; 94: 1626-1635.

SINDAN. Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Saúde Animal, 2010. Mercado veterinário por classe terapêutica e espécie animal, 2009. Disponível em: < <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html> >. Acesso em: 12 jul. 2013.

SIXT, M., KANAZAWA, N., SELG, M., SAMSON, T., ROOS, G., REINHARDT, D.P., PABST, R., LUTZ, M.B., SOROKIN, L The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. **Immunity**. 22:19–29, 2005.

SMITH-GARVIN, J.E., G.A. KORETZKY AND M. S. JORDAN, **T CELL ACTIVATION**. ANNU. REV. IMMUNOL., 27: 591-619. DOI: 10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132706. 2009.

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

SOSSAI, S., PECONICK, A. P., SALES-JUNIOR, P. A., MARCELINO, F. C., VARGAS, M. I., NEVES, E. S., PATARROYO, J. H. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*, **Experimental & Applied Acarology**, 37:199–214. 2005.

SOSSAI, S. **Expressão de quatro peptídeos recombinantes derivados do peptídeo sintético sbm7462 em *Pichia pastoris* e avaliação da resposta imunológica induzida em camundongos**. 2009. 137p. Tese (Doutorado em Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

SPRINGELL, P. H. The cattle tick in relation to animal production in Australia. FAO Animal Production and Health Papers series—Ticks and Tick-borne Diseases: Selected Articles from the World Animal Review. FAO, Rome, 77 pp. 1983.

SUTHERST, R. W. *et al.* Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, London, v. 295, p. 320-321, 1982.

TAFUR, G. A.; VARGAS, M. I.; PATARROYO, J. H.; NEVES, E. S.; SOSSAI, S.; ARAUJO, L.; PECONICK, A.P; KALKS, K. H. Immunological response in bovine Lymph nodes stimulated with subunits vaccines. **American Journal of Immunology** 9 (2): 48-57, 2013.

TAFUR, G. A. **Imunização de bovinos com dois peptídeos recombinantes derivados do peptídeo sbm7462®: resposta imune de linfonodos e alterações histológicas do intestino do *Rhipicephalus (boophilus)***

***microplus* (canestrini, 1887).** 2011. 93p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

TAFUR, G. A. **Respuesta inmune celular en ganglios linfáticos de ratones balb/c, producida por el peptido sintético sbm 7462®, anti *Rhipicephalus (boophilus) microplus*, expresado en *Pichia pastoris*.** 2008. 47p. Monografia (graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima-Colombia. 2008.

THAKURA, A.; RIBER, U.; DAVIS, W. C.; JUNGENSEN, G. Increasing the ex vivo antigen-specific IFN- production in subpopulations of T cells and NKp46+ cells by anti-CD28, anti-CD49d and recombinant IL-12 costimulation in cattle vaccinated with recombinant proteins from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 155 (2013) 276–283. 2013.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. de. Proteínas recombinantes produzidas em 24 leveduras. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. v. 12, p. 20-22, 2000.

UNFPA, Fundo de População das Nações Unidas. Disponível em: <<http://www.unfpa.org>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

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

VICTORA, G.D.; NUSSENZWEIG, M.C. Germinal centers. **Annu. Rev. Immunol.**, 30: 429-457. DOI:10.1146/annurev-immunol-020711-075032. 2012.

WHARTON, R.H.; NORRIS K.R. Control of parasitic arthropods. **Vet Parasitology** 6, 1–3, P 135–164.1980.

WILLADSEN, P., RIDING, G. A., MCKENNA, R. V., KEMP, D. H., TELLAM, R. L., NIELSEN, J. N., LAHNSTEIN, J., COBON, G. S., GOUGH, J. M. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, 143(4):1346-1351. 2004.

ANEXO 1

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo n.º 44/2013, intitulado “Resposta celular em linfonodos em bovinos de diferentes raças a campo com vacina recombinante rSBm 7462 anti *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*”, coordenado pela professora, Marlene Isabel Vargas Vilória do Departamento de Medicina veterinária, está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 04/09/2013, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 44/2013, named “Cell response of different breed bovine’s lymph nodes inoculated at field with a recombinant vaccine rSBm 7462 against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Laboratory of Animals (SBCAL) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on September 04, 2013 approved this process. This certificate expire in 12 months.



Prof. Cláudio César Fonseca

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ UFV

ANEXO 2

Detecção do antígeno rSBm7462 em linfonodos bovinos

Etapa		Reagente - solução	Equipamento	Temperatura	Tempo
Desparafinização	1.		Estufa	60°C	2 horas
		Xilol		TA°C	15 min
		Xilol		TA°C	15 min
Rehidratação	2.	Álcool 100 %		TA°C	5 min
		Álcool 100 %		TA°C	5 min
Bloqueio de peroxidase endógena	3.	Peróxido de hidrogênio metanólico 3%		TA°C	30 min
Rehidratação	4.	Álcool 96 %		TA°C	5 min
		Álcool 96 %		TA°C	5 min
	5.	Álcool 70 %		TA°C	5 min
Lavagem	6.	PBS pH 7,4		TA°C	5 min
		PBS PH 7,4		TA°C	5 min
Recuperação antigênica	7.	Buffer Citrato de Sódio pH 6	STEAMER	TA°C	35 min
		Preencher com H2O destilada e repousar a TA		TA	20 min
Lavagem	8.	PBS pH 7,4		TA°C	5 min
		PBS pH 7,4		TA°C	5 min
	9.	Albumina Sérica Bovina (BSA) 1%	Câmara úmida	TA°C	45 min
Incubação do anticorpo primário	10.	Soro de coelho anti-SBm7462 1:20 em PBS	Câmara úmida	4°C	<i>Overnight</i>
Lavagem	11.	PBS pH 7,4		TA°C	5 min
		PBS pH 7,4		TA°C	5 min
Incubação do anticorpo secundário	12.	IgG de cabra anti-IgG de coelho 1:10 em PBS	Câmara úmida	37 °	45 min
Lavagem	13.	PBS pH 7,4		TA°C	5 min
		PBS pH 7,4		TA°C	5 min
		Complexo PAP 1:200		37 °	45 min
Lavagem	15.	PBS pH 7,4		TA°C	5 min
Revelação	16.	DAB 25mg em 100ml de PBS + 200µl de H ₂ O ₂	Câmara úmida na escuridade	TA°C	5 min
Lavagem		Água corrente		TA°C	5 min
Contracoloração	17.	Hematoxilina de Harris		TA°C	1 min
Desidratação	18.	Álcool 70 %		TA°C	5 min
		Álcool 80 %		TA°C	5 min
		Álcool 90 %		TA°C	5 min
		Álcool 100 %		TA°C	5 min
		Álcool 100 %		TA°C	5 min
	19.	Xilol I		TA°C	5 min
		Xilol II		TA°C	5 min
Montagem	20.	Entellan®		TA°C	