

ELISÂNGELA DE SOUZA NEVES

**AVALIAÇÃO “*in vivo*” DA EFICIÊNCIA DE DOIS IMUNÓGENOS
RECOMBINANTES DERIVADOS DO PEPTÍDEO SBm7462® PARA
O CONTROLE DO CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus (Canestrini 1887)**

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
2011**

ELISÂNGELA DE SOUZA NEVES

**AVALIAÇÃO *in vivo* DA EFICIÊNCIA DE DOIS IMUNÓGENOS
RECOMBINANTES DERIVADOS DO PEPTÍDEO SBm7462® PARA
O CONTROLE DO CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus (Canestrini 1887)**

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: 21 de fevereiro de 2011.

Prof^ª. Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Co-orientadora)

Dr. Sidimar Sossai
(Co-orientador)

Dr. John Furlong

Prof. Joaquin H. Patarroyo Salcedo
(Orientador)

Onde quer que você esteja esse é o ponto de partida.

Kabir (1440-1518)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo!

Ao professor Patarroyo, pela generosidade, por conceder esta oportunidade única.

A meu marido Sidimar, dedico este trabalho, pelo amor, carinho, paciência, amizade e principalmente, sua doação incondicional. Você é muito especial, te amo.

Agradecimento especial ao Marcinho, fundamental ao desenvolvimento deste trabalho, por sua amizade recheada de mau humor e implicância, meu muito obrigada!!

A Cauzinho, por ter me ajudado na “caçada” aos bezerros, leite e cuidados.

A Cíntia, Gabriel Artur, Gabriel Tafur pela ajuda nos trabalhos.

Aos meus pais, por terem me ajudado desde o começo com amor, carinho, amizade e oração, enfim, presentes mesmo distantes.

Aos meus irmãos, Ângela, André e, em especial, a Amanda, pela força e superação, maravilhosa surpresa!

Aos meus queridos sobrinhos, Nicolly, Maria Eduarda e Kaíque pela alegria.

A tia Jeane, tia Preta, vó Helena e vô Manoel, *in memoriam*.

A amigas, Fer, Elisa, Lú, Miroca pelas conversas e crises de riso.

A Nalva pela paciência e amizade, luz nos dias nublados.

A Universidade Federal de Viçosa, por toda a minha formação,

A todos que de alguma forma me ajudaram, obrigada!!!

BIOGRAFIA

Elisangela de Souza Neves nasceu em 08 de julho de 1981, em Santo André, São Paulo, filha de Eber Moreno Neves e Marlene aparecida de Souza Neves.

Conclui ensino médio na escola de Primeiro e segundo grau, Wilfredo Pinheiro, na cidade de São Paulo – SP.

Formou-se em medicina veterinária na Universidade Federal de Viçosa em 05/05/2006.

Ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa em fevereiro de 2009.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 O carrapato <i>Rhipicephalus Boophilus microplus</i>	4
3.2 Importância DO <i>R. (B). microplus</i>	6
3.3 Métodos de controle.....	8
3.3.1 Controle químico.....	8
3.3.2 Controle imunológico.....	12
3.4 Imunologia carrapatos.....	13
3.4.1 Imunidade a antígenos ocultos “ <i>concealed antigens</i> ”.....	16
3.4.2 Imunógeno SBm7462 [®]	18
3.5 Uso de antígenos recombinantes.....	19
3.6 <i>Pichia pastoris</i>	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Locais dos estudos.....	23
4.2 Animais utilizados e manutenção.....	23

4.3	Peptídeos rBmseq1 e rBmseq4.....	24
4.4	Adjuvante saponina.....	24
4.5	Esquema de inoculação.....	24
4.6	Desafio.....	25
4.6.1	Manutenção da colônia de <i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	25
4.6.2	Infestações experimentais dos bovinos.....	25
4.6.3	Avaliação dos parâmetros biológicos das teleóginas desprendidas dos animais.....	26
4.6.3.1	Número de teleóginas.....	26
4.6.3.2	Peso das teleóginas.....	26
4.6.3.3	Peso da postura.....	26
4.6.3.4	Relação peso larva/grama de ovos.....	26
4.6.3.5	Fórmulas para avaliação dos parâmetros biológicos.....	27
4.7	Estudo da cinética humoral.....	28
4.7.1	Coleta de sangue para sorologia.....	28
4.7.2	Teste de ELISA para medição da resposta imune humoral.....	29
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
6.1	Cinética de anticorpos anti-peptídeo recombinante rBm7462.....	31
6.2	Avaliação dos parâmetros biológicos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> provenientes de animais inoculados com os peptídeos rBmseq1	36

e rBmseq4.....	
6.2.1 Número de teleóginas desprendidas.....	38
6.2.2 Peso das teleóginas desprendidas e peso dos ovos.....	40
6.2.3 Relação larva/grama de ovos.....	40
6.3 Eficácia vacinal.....	40
CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	46

RESUMO

NEVES, Elisângela de Souza M.Sc., Universidade Federal de Viçosa fevereiro de 2011. **Avaliação “*in vivo*” da eficiência de dois imunógenos recombinantes derivados do peptídeo SBm7462® para o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1887).** Orientador: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Coorientadores: Sidimar Sossai e Marlene Isabel Vargas Viloria.

Os peptídeos recombinantes rBmseq1 e rBmseq4 foram avaliados como imunógenos para o controle do carrapato *R. (B.) microplus* em teste de estábulo. Foram utilizados 17 bovinos mestiços com média de sangue 7/8 (H/Z), os quais foram mantidos sob o manejo rotineiro no Setor de Isolamento de Bovinos do Departamento de Veterinária – UFV. Os animais foram separados em quatro grupos constituídos por quatro animais cada: grupo vacinal rBmseq1, grupo vacinal rBmseq4, grupo controle e grupo *P. pastoris*, sendo os grupos vacinais imunizados nos dias 0, 30 e 60 com 2 mg de peptídeo recombinante associado ao adjuvante saponina. Os animais do grupo controle foram inoculados com solução fisiológica e o grupo *Pichia pastoris* com 2 mg de extrato bruto de *P. pastoris* não transformada. Foram realizadas coletas de sangue seriadas e semanais até a 14^o semana do estudo. Após 21 dias da terceira inoculação, os animais foram submetidos a infestação artificial com um total de 4.500 larvas/animal de *R. (B.) microplus* (amostra “Viçosa”). A partir do 19^o dia após a infestação os animais foram observados diariamente quanto ao desenvolvimento larval. A partir do 21^o dia foi realizada lavagem, duas vezes ao dia, das baias e coletas manuais das teleóginas desprendidas, as quais foram contadas, pesadas, identificadas e incubadas em estufa B.O.D. por quinze dias à 28°C±2°C e 80% de umidade relativa, quando seus respectivos ovos foram pesados. Foram analisados números de teleóginas desprendidas, peso dos ovos, relação peso larvas/grama de ovos e sua viabilidade. A cinética da produção de anticorpos foi acompanhada através de ELISA, obtendo-se títulos maiores para os grupos vacinais, estatisticamente diferentes aos grupos controle e *Pichia pastoris* (p 0,05) Os parâmetros biológicos foram analisados levando-se em consideração o

número e peso das teleóginas, peso e fertilidade dos ovos. A eficácia calculada foi 52,72% para o grupo vacinal rBmseq1 e de 72,40% para o grupo vacinal rBmseq4. Quanto à avaliação do número de carrapatos, houve diferença estatística entre os grupos testados, entre si e quando comparados ao grupo controle, sendo marcadamente acentuada no grupo rBmseq4. Os parâmetros peso das teleóginas ao desprendimento e peso médio da oviposição dos grupos vacinais não diferiram estatisticamente quando comparados ao grupo controle. Os resultados obtidos mostram que os peptídeos recombinantes rBmseq1 e rBmseq4 são alternativas viáveis para o controle do carrapato *R. (B). microplus*, pela sua eficácia, segurança ambiental e baixo custo.

ABSTRACT

NEVES, Elisangela de Souza M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. ***Evaluation efficacy "in live" of two recombinant immunogens derivatives of peptide SBm7462[®] in the control of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini 1887)****. Adviser: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo. Co-advisers: Sidimar Sossai and Marlene Isabel Vargas Vilorio.

Recombinant peptides rBmseq1 and RBmseq4 were evaluated as immunogenic for the control of ticks *R. (B.) microplus* in test of stable. We used 17 bovine animals of the half-breed average degree of blood of 7/8 (H/Z), which were kept under the management routine in the Sector of isolation of bovine animals in the Department of Veterinary – UFV. The animals were separated into four groups: group vaccine rBmseq1, group rBmseq4 vaccine, control group and group *P. pastoris*, being immunized vaccine groups on days 0, 30 and 60 with 2 mg peptide recombinant associated with adjuvant saponin. The animals of the control group were inoculated with saline solution and the group *Pichia pastoris* with 2 mg of crude extract of *P. pastoris* not processed. Collections were made serial blood and weekly until the 14TH week of the study. After 21 days of the third inoculation, the animals were submitted to artificial infestation with a total of 4,500 larvae/animal of *R. (B.) microplus* (sample "Viçosa"). From the 19th day after the infestation animals were observed daily to the larval development. From the 21TH day was performed washing twice a day of the stalls and collections of manuals teleóginas detached, which were counted, weighed, identified and incubated in greenhouse B. O. D. by fifteen days, when their eggs were weighed. Numbers were analyzed teleóginas detached, egg weight, relation weight larvae/gram of eggs and its viability. The kinetics of production of antibodies was accompanied by ELISA, getting securities greater for vaccine groups, statistically different groups controlling and *Pichia pastoris* (p 0,05) The biological parameters were analyzed taking-account of the number of teleóginas, weight and fertility of eggs. Efficacy was 52.72% for group rBmseq1 vaccine and 72.40% for group rBmseq4 vaccine. Regarding the assessment of the number of ticks, there was statistical

difference between the groups, between themselves and when compared to the control group, markedly marked in the group rBmse4. The parameters weight of teleóginas to detachment and average weight of oviposition of vaccine groups, did not differ statistically when compared to the control group. The results obtained show that the peptides recombinant rBmse4 rBmse1 and are viable alternatives for the control of ticks *R. (B). microplus*, its efficiency, environmental safety and low cost.

1. INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, constitui o principal problema para a indústria de bovinos. Está amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com expansão para outras áreas devido às mudanças climáticas (BARKER e MURREL, 2004); (OLWOCH *et al*, 2007). Infestações com *Rhipicephalus Boophilus microplus* causam grande impacto econômico como a redução do ganho de peso, diminuição na produção de leite, e por transmitir patógenos que causam babesiose (*Babesia bovis* e *Babesia bigemina*) e anaplasmose (*Anaplasma marginale*) (PETER *et al*, 2005).

O uso de acaricidas, controle químico, constitui a principal estratégia para o controle de carrapatos (GRAF *et al*, 2004). Esse tipo de controle é utilizado sob a forma de banhos de aspersão, imersão, tratamentos “pour-on” e fármacos injetáveis. Entretanto, o uso de acaricidas tem sua eficácia limitada na redução na infestação de carrapatos e é frequentemente acompanhada por sérios problemas, incluída a seleção de carrapatos resistentes, contaminação ambiental e de produtos de origem animal, como leite e carne com seus resíduos (GRAF *et al*, 2004). Todas essas questões reforçam a necessidade por pesquisas alternativas para o controle de carrapatos (DE LA FUENTE e KOCAN, 2006); (WILLADSEN, 2006).

Na década de 1990, foram desenvolvidas vacinas para induzir proteção dos hospedeiros vertebrados contra infestações de carrapatos. Estas vacinas foram baseadas na proteína intestinal Bm86 sendo expressa em proteínas recombinantes (WILLADSEN, 2006); (DE LA FUENTE e KOCAN, 2003). Essas vacinas reduziram o número de teleóginas, peso e a capacidade reprodutiva, tendo como principal efeito na redução do número de larvas nas subseqüentes infestações (CANALES *et al*, 2009).

SOSSAI (2009) desenhou quatro genes, tendo como base a seqüência de aminoácidos do peptídeo sintético SBm7462[®] e otimizados para uso na levedura *Pichia pastoris*. O peptídeo rBmseq1 foi desenhado de tal forma que o peptídeo SBm7462 foi repetido em *tandem* por três vezes. Já o peptídeo rBmseq4 possui a seqüência original do peptídeo SBm7462. Os peptídeos heterólogos foram caracterizados por SDS-PAGE e Western blotting sendo reconhecidos por soro hiperimune de coelho imunizado com o

peptídeo SBm7462, demonstrando que os peptídeos verificados no SDS-PAGE eram os produtos dos genes sintéticos. Dos peptídeos expressados - rBmseq1, rBmseq2, rBmseq3 e rBmseq4, foram selecionados os que obtiveram maior resposta humoral, rBmseq1 e rBmseq4 para teste na espécie alvo, bovinos, objeto desse presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL:

- ✓ Determinar as eficácias vacinais na espécie bovina de dois imunógenos vacinais produzidos em levedura *P. pastoris*.

2.2. - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Determinar as cinéticas humorais dos anticorpos anti-peptídeos recombinantes.
- ✓ Determinar as eficácias vacinais das duas formulações utilizadas no estudo frente ao desafio com a amostra Viçosa de *R. (B.) microplus*.
- ✓ Determinar os parâmetros biológicos parasitários e não parasitários da cepa Viçosa de *R. (B.) microplus* alimentada sobre bovinos vacinados e controle.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1- O CARRAPATO *Ripicephalus (Boophilus) microplus*.

Postula-se que os carrapatos se desenvolveram como parasitas obrigatórios de répteis na era paleozóica, período carbônico, em climas quentes e úmidos. Supõe-se que quando esses répteis se ramificaram em numerosas formas de vida, preenchendo nichos aquáticos e terrestres, seus carrapatos mais primitivos evoluíram em duas principais famílias, Argasidae e Ixodidae (HOOGSTRAAL e WASSEF, 1985).

Desde a metade do século dezenove, quando a indústria de gado foi desenvolvida em muitos países tropicais e subtropicais, os carrapatos se tornaram um problema econômico e, conseqüentemente, as medidas para o seu controle começaram a se desenvolver.

Em função das expedições exploradoras registradas na história, com a movimentação de animais e mercadorias, ocorreu a sua expansão e introdução na maioria das regiões tropicais e subtropicais: Austrália, México, América Central, América do Sul e África, tendo se estabelecido dentro dos climas demarcados pelos paralelos 32° Norte e 32° Sul, com alguns focos no 35° Sul (NUÑES *et al.*, 1982).

A introdução no Brasil parece ter ocorrido no início do século XVIII, via o estado do Rio Grande do Sul, por animais comprados do Chile. Atualmente, os carrapatos encontram-se distribuídos em todo o país, variando de intensidade de acordo com os tipos raciais de bovinos e com as condições climáticas (ANDREOTTI, 2002).

De acordo com FLECHTMANN (1990), o *R. B. microplus* (FIGURA 1) possuía a seguinte posição sistemática:

Filo – Arthropoda (Von Siebold & Slannius, 1845)

Subfilo – Chelicerata (Heymons, 1901)

Classe – Aracnida (Lamarck, 1802)

Subclasse – Acari (Leach, 1817)

Ordem – Parasitiformes (Renter 1909)

Subordem – Metastigmata (Canestrini, 1891)

(Ixodides Leach, 1815)

Família – Ixodidae (Murray, 1887)

Gênero – *Boophilus* (Canestrini, 1887)

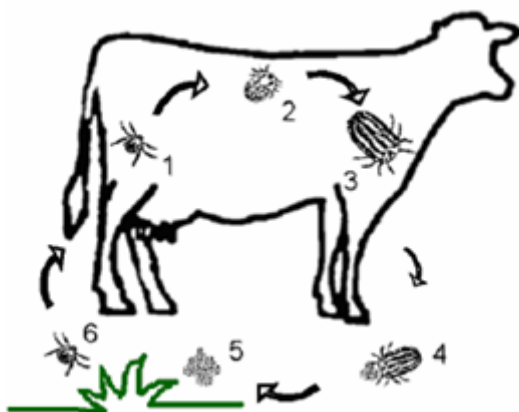
Em 2002, as cinco espécies do gênero *Boophilus* foram incluídas dentro do gênero *Rhipicephalus* por HORAK, CAMICAS e KEIRANS (2002), baseando-se nas proximidades genéticas e evolutivas de ambos. Como o gênero *Boophilus* é um dos mais estudados e conhecidos no mundo, o nome *Boophilus* permaneceu como subgênero. Assim, o *Boophilus microplus* passou a ser denominado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (HORAK; CAMICAS; KEIRANS, 2002; JONGEJAN e UILENBERG, 2004; BARKER e MURRELL, 2002).

O ciclo de vida do carrapato *R. (B.) microplus* (FIGURA 02) divide-se em fase de vida livre e fase de vida parasitária. Em condições favoráveis, a fase de vida livre dura em torno de 32 dias durante os quais o carrapato não se alimenta e sobrevive exclusivamente de suas reservas, esta fase inicia-se após a queda da teleógina ingurgitada com o período de pré-postura. A postura inicia-se três dias após a queda ao solo, com período de postura em torno de 15 dias, quando a fêmea morre. O peso total dos ovos (2000 a 3000 ovos) após o término da postura equivale a 52% do peso vivo da teleógina. A eclosão das larvas pode demorar em torno de vinte e dois a trinta dias. As larvas são bastante vulneráveis a baixas temperaturas, mas em presença de alta umidade relativa podem sobreviver no solo até 8 meses (ANDREOTTI, *et al.*, 2002).

Seis dias após a eclosão, com as cutículas fortalecidas, as larvas estão prontas para subir nas pastagens por geotropismo negativo, localizar o hospedeiro pelo odor, vibrações, sombreamento, estímulo visual e gradiente de concentração de CO₂ e alcançar o hospedeiro. Ao entrar em contato com o bovino, as larvas se fixam em regiões que favorecerão o seu crescimento. Essas regiões incluem úbere, regiões perineal, perianal, vulvar e entre pernas e são determinadas em função da espessura, vascularização e temperatura da pele, bem como pela dificuldade de acesso as lambidas do hospedeiro (ANDREOTTI, 2007).

Uma vez que as larvas infectantes se encontram fixadas ao hospedeiro se inicia a fase parasitária (nesta fase o carrapato é pouco afetado pelas condições climáticas ambientais, mas mesmo assim, ele procura regiões da pele onde a temperatura varie de 31° a 38°C (JONSSON, 2006). Após sete dias de sua fixação ocorre a mudança para ninfas e estas mudam para adultos com marcado dimorfismo sexual em

aproximadamente oito dias. A fase parasitária desenvolve-se até a fecundação e ingurgitamento total das teleóginas.



Fase parasitária: (1)- larva infectante realizando a fixação do bovino; (2)- ninfa; (3)- teleógina em estágio final de ingurgitamento. Fase de vida livre: (4)- teleógina em período de postura no solo; (5)- ovos, no solo, em período de incubação; (6)- larva, no solo, em período de incubação.

FIGURA 01: Esquema simplificado do ciclo de vida carrapato *R.(B) microplus*.

As larvas de *R. (B). microplus* alimentam-se preferencialmente de plasma. O sangue se torna o principal constituinte alimentar apenas nos momentos que precedem o rápido ingurgitamento das ninfas e das fêmeas. A partir do 17º dia que se segue a infestação ocorre o acasalamento, com rápido ingurgitamento após a cópula aumentando seu peso em até 200 vezes (JONSSON, 2006) e subsequente queda da fêmea de *R. (B). microplus*, tendo RIEK (1957) estimou que cada teleógina seja responsável pela perda de 1 ml de sangue do bovino ou 2 a 3 ml de sangue bovino como citado por (GONZALES, 1995).

3.2 – IMPORTÂNCIA DO *R. (B). microplus*

O Brasil tem o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, em torno de 206 milhões de cabeças (IBGE, 2010).

A eficiência da exploração comercial bovina em regiões tropicais depende, em grande parte, do potencial de produção dos animais, bem como da capacidade de adaptação ao ambiente. A infestação pelo carrapato *R. (B) microplus* assume papel de fundamental importância, pois esse parasita se destaca como um dos que mais prejudica

o desempenho dos animais, em consequência das ações espoliadora, mecânica e tóxica (FRAGA *et al.*, 2003).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e os agentes da tristeza parasitária bovina (*Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*) são considerados fatores limitantes para o desenvolvimento adequado da pecuária na América Latina (NARI, 1995). O Brasil tem uma perda estimada em US\$2 bilhões anuais devido a efeitos diretos e indiretos de infestações por este artrópode (GRISI *et al.*, 2002) tais como perda na produção de leite, carne, e couro, anemia, transmissão de parasitas, mortalidade, redução da natalidade, consumo de carrapaticidas, campanhas de educação do produtor, investimentos em infra-estrutura e mão-de-obra para tratamento. Na Argentina as perdas superam 100 milhões de dólares anuais (SIGNORINI, 1991). No México, calcularam em 30 kg de carne por animal/ano (WOODHAN *et al.* 1983).

Segundo SPRINGELL (1983), em um estudo conduzido para a FAO (Food and Agriculture Organization), as perdas econômicas causadas pelo carrapato *R. (B) microplus* podem ser estratificadas como: 36% causadas pelo aumento do custo do trabalho aplicado ao controle e tratamento dos animais parasitados; 20% relacionados à perda de produtividade cárnea, 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, tais como a diminuição do valor do couro, veiculação de doenças e tratamento destas, descarte de animais.

Sua ação espoliativa, que corresponde a perda pelo bovino de 2 a 3 ml de sangue por fêmea do carrapato (GONZALES, 1995), causa queda na produção de leite e carne, com perda média anual de 240 gramas de peso vivo por carrapato (SUTHERST *et al.*, 1983). Além disso, o *R. (B) microplus* causa danos ao couro dos bovinos pelas reações inflamatórias provocadas no local de fixação (SEIFERT *et al.*, 1968; HORN e ARTECHE, 1985).

Numa visão global, os carrapatos Ixodídeos são considerados os mais importantes vetores de doenças que afetam rebanhos, humanos e animais de companhia (JONGEJAN e WILENBERG, 2004). São estimados que os custos globais para controlar os carrapatos e as doenças por eles transmitidas de uma forma geral em bovinos estejam entre US\$ 13,9 a 18,7 bilhões anualmente (DE CASTRO, 1997).

3.3- MÉTODOS DE CONTROLE

3.3.1 - CONTROLE QUÍMICO

O método de controle que mais tem sido utilizado desde a década de 50 é o uso de acaricidas (PRUETT, 1999). O controle do carrapato tem sido praticamente dependente do uso de acaricidas, e o aparecimento de isolados resistentes a estas drogas representa um sério problema para a saúde e produção animal, em várias partes do mundo (SOLOMON, 1983).

Além do desenvolvimento de resistência, a presença de resíduos químicos em alimentos também é preocupante (WILLADSEN, 2006). É dispendioso, além de poder causar danos ao meio ambiente e à saúde pública, por meio da contaminação de rios e solos (CRUZ, 2008). Ao mesmo tempo, o desenvolvimento de novos acaricidas demanda muito tempo e é caro, reforçando a necessidade de novas alternativas para controle de infestações de carrapatos (GINSBERG, 2001).

Até a metade do século XX, as medidas disponíveis para o controle dos carrapatos eram limitadas. Os produtos mais utilizados eram os derivados arsênicos, caracterizados por sua baixa eficácia, alta toxicidade ao gado e efeito residual. Populações de *R.(B.) microplus* e *B. decoloratus* desenvolveram resistência ao arsênico após 1935, e com a falta de um acaricida alternativo, as infestações por *R.(B) microplus* em várias partes do mundo tomaram enormes proporções.

Em 1940 os primeiros organoclorados começaram a ser avaliados (SHAW, 1970). O DDT e outros organoclorados (lindane, dieldrin, aldrin, BHC e toxafen) aparecem entre 1940 e 1950, quando surgiu a resistência as compostos arsênicos (GRAF *et al.*, 2004). Organoclorados foram os primeiros inseticidas orgânicos sintéticos comercializados. DDT e benzenohexaclorido (BHC) são os primeiros componentes do grupo a serem utilizados como acaricidas (COBBET, 1947; MAUNDER, 1949, WHITNALL *et al*, 1951). Em áreas como a Austrália (NORRIS e STONE, 1956; STONE e MEYERS, 1957) e regiões sul e equatorial da África (WHITEHEAD, 1958; BAKER E SHAW, 1965), ocorreram resistência cruzada de diferentes populações de carrapatos incluindo *R. microplus*, *B. decoloratus* e *Rhipicephalus appendiculatus* para todos organoclorados abreviaram a vida útil destes químicos (GEORGE; POUND; DAVEY, 2004).

O desenvolvimento dos organofosforados foi primariamente determinado para o controle de *R. (B). microplus* resistente aos organoclorados nas áreas tropicais e subtropicais (SHAW, 1970). Assim como os organofosforados, os carbamatos inibem o sítio da acetilcolinesterase, mas com baixa toxicidade a mamíferos. Porém, o valor dos carbamatos para controle de carrapatos é limitado devido a sua resistência cruzada com organofosforados (ROULSTON, 1972; DOUGAL e MACHIN, 1988). A resistência a organofosforados e carbamatos diminuiu sua utilidade na Austrália, grande parte da África e partes da América Latina (KUNZ e KEMP, 1994).

Uma década depois, quando os organofosforados começaram a perder sua eficácia, surgiram as associações com amidinas (principal representante sendo o amitraz). A resistência as amidinas apareceu no final de 1970 e os piretróides (flumetrina, cipermetrina, deltametrina e cialotrina), baseados na sua excelente eficácia e seu largo espectro, tomaram grande parte do mercado em 1980, espalhando-se rapidamente na década de 90 e permitindo um importante retorno das amidinas, que não foram completamente exploradas na sua introdução inicial (GRAF *et al.*, 2004). O uso aumentado das amidinas levou ao reaparecimento da resistência a esta classe de substâncias. Novos produtos e soluções apareceram durante a última década focando principalmente o *R. microplus*. São designados: as lactonas macrocíclicas (ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e as milbemicinas), os fenilpirazóis (fipronil), os reguladores de crescimento (fluazuron) e as spinosinas (spinosad) (GRAF *et al.*, 2004; VERCRUYSSSE, 2004).

No Brasil, há relatos de resistência a lactonas macrocíclicas por *R.(B) microplus* (VERCRUYSSSE, 2004) especificamente doramectina com resistência cruzada a ivermectina e a moxidectina. As limitadas alternativas de acaricidas e o uso difundido de lactonas macrocíclicas podem levar a sérios problemas de resistência (GEORGE; POUND; DAVEY, 2004).

Fipronil pertence à família dos fenilpirazóis, é utilizado para o controle de carrapatos em vários países da América Latina, mas não foi registrado nos Estados Unidos e em outros países para o uso em animais de produção (GEORGE; POUND; DAVEY, 2004).

Fluazuron, uma benzoilfeniluréia, atua na síntese de quitina em *R. (B). microplus* (TAYLOR, 2001). A principal ação sobre o carrapato é a redução da fecundidade e fertilidade de fêmeas ingurgitadas e mortalidade de larvas devido sua capacidade de atingir o próximo instar. A eficácia de fluazuron persiste por, aproximadamente, doze semanas e por causa das suas características de ligação à gordura, é excretado no leite. Por deixar resíduo na gordura, é proibido o consumo de carne derivada dos animais tratados, por seis semanas (BULL *et al.*, 1996).

Spinosad representa uma nova classe de pesticida, as spinosinas. É derivado da mistura de dois componentes, spinosina A e spinosina D (WEST, 1996), os quais são metabólitos da fermentação do actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* (THOMPSON *et al.* 1995b) e tem um único modo de ação que envolve rompimento da ligação de acetilcolina em receptores acetilcolina/nicotina nas células pós-sinápticas (WARE, 2000). Este modo único de ação qualifica-o como acaricida alternativo para o controle de *R. microplus* resistentes a outros químicos (GEORGE; POUND; DAVEY, 2004). Entretanto o produto é muito tóxico quando ingerido (SPARKS, CROUSE & DURST, 2001).

A tabela 01 sumariza a incidência de resistência ao *R. microplus* a diferentes acaricidas.

TABELA 01 – Surgimento de resistência a compostos carrapaticidas.

Componente ativo (data aproximada da introdução)	Localização e data do surgimento de resistência
Compostos arsênicos (1893)	Austrália, 1936; Argentina, 1936; Brasil, 1948; Colômbia, 1948; Uruguai, 1953; Venezuela, 1966.
DDT (1946)	Argentina, 1953; Brasil, 1953; Austrália, 1953; Venezuela, 1966; Sul da África, 1979.
Ciclodienos e Toxafeno (1947)	Austrália, 1953; Argentina, 1953; Brasil, 1953; Venezuela, 1966; Colômbia, 1966; Sul da África, 1979.
Organofosfatos - Carbamatos (1955)	Austrália, 1963; Argentina, 1964; Brasil, 1963; Colômbia, 1967; Venezuela, 1967; Sul da África, 1979; Uruguai, 1983; México, 1986.
Formamidinas (1975)	Austrália, 1981; Brasil, 1995; Colômbia, 2000; México, 2002.
Piretróides (1977)	Austrália, 1978; Brasil, 1989; México, 1994; Venezuela, 1995; Colômbia, 1997; Argentina, 2000.
Lactonas macrocíclicas (1981)	Brasil, 2001

Compilado dos dados de Wharton (1976), Solomon (1983), Aguirre, J. *et al.* (1986), Ortiz, Santamaria & Fragoso (1994), Coronado (1995), Martins *et al.* (1995), Romero *et al.* (1997), Strydom & Peter (1999), Aguirre, D. H. *et al.* (2000), Benavides, Rodriguez & Romero (2000), Martins & Furlong (2001) and Soberanes *et al.* (2002).

CASTRO-JANET *et al.*, (2010), reportam o primeiro caso de resistência ao fipronil em cepas de *R. (B.) microplus*, diagnosticado por bioensaios com larvas, no Brasil.

Entende-se por resistência de carrapatos a carrapaticidas o processo de seleção genética em que alguns carrapatos de uma população sobrevivem após exposições continuadas a uma família ou grupo químico carrapaticida – letais para a maioria dos indivíduos normais da espécie - chegando a um ponto em que toda a população fique resistente (FURLONG, 1998). PATARROYO e VARGAS (1982) consideram como axiomático o fato de que, uma vez tenha aparecido resistência comprovada a um acaricida de determinado grupo químico, ela é irreversível, e que o emprego de uma mesma base química após determinado tempo não terá qualquer proveito para o controle

do carrapato. RIDLES e NOLAN (1986) afirmam que pode ocorrer resistência cruzada a alguns produtos de grupos químicos diferentes, como o caso dos clorados com os piretróides.

No Brasil, o primeiro relato de populações de carrapatos resistentes é oriundo de Freire-RS em 1953, envolvendo compostos arseniacais. Seguindo desta forma, há muitas cepas resistentes a organofosforados, piretróides, associações entre piretróides e organofosforados, amidinas, fenilpirazolonas, lactonas macrocíclicas. Em Minas Gerais, há um alto número de cepas de campo resistentes a multi drogas (MARTINS *et al*, 2003).

A evolução da resistência aos principais grupos químicos disponíveis no mercado para controle de carrapatos em bovinos e o pouco desenvolvimento de novos produtos têm comprometido o futuro do controle químico (GEORGE; POUND; DAVEY, 2004) e estimulado pesquisas para o desenvolvimento de tecnologias alternativas, tal como o controle imunológico.

3.3.2 – CONTROLE IMUNOLÓGICO

A vacinação representa o melhor método avaliado com custo efetivo para prevenir perdas econômicas e aumentar a duração e qualidade de vida dos animais de produção (ANDRÉ, 2001; BABIUK, 2002). Vacinas convencionais são usadas há mais de 200 anos, desde o reconhecimento, por Edward Jenner, de que vacina poderia proteger os seres humanos contra a varíola, em 1798 (TIZARD, 1999).

Conseguir formas alternativas para o controle do carrapato impõe-se como uma necessidade premente. Os estudos para atingir este objetivo têm sido concentrados no controle imunológico, procurando desenvolver vacinas, e, em menor escala, no controle biológico, através do uso de organismos entomopatogênicos (MONTEIRO *et al.*, 1998).

Várias tentativas vêm sendo realizadas para a obtenção de vacinas contra artrópodes. O uso de antígenos particulados de *Stomoxys calcitrans* para induzir a imunidade reduziu o grau de ingurgitamento deste muscídeo (WEBSTER, *et al*, 1992). Utilizando extratos de membrana peritrófica de *Lucilia cuprina*, para imunizar ovinos foi observada a inibição do crescimento da larva deste díptero no hospedeiro (EISEMANN, BINNINGTON, 1994). MUNCUOGLU, *et al.*, 1996, localizaram antígenos no trato digestivo de *Pediculus humanus* que conferem imunidade humana.

Entre as possibilidades de controle de carrapatos, uma das mais promissoras é o uso de vacinas baseadas em antígenos do(s) carrapato(s) alvo (DE LA FUENTE, *et al.*, 2004). A utilização de vacinas no controle de carrapatos é uma alternativa atrativa aos acaricidas químicos, desde que estes vêm apresentando várias desvantagens, incluindo desenvolvimento de resistência acaricida em carrapatos, toxicidade, contaminações de produtos alimentícios (carne, leite), riscos para o homem, além de poluição ambiental (SOSSAI *et al.*, 2005).

Há mais de 70 anos que parcial ou forte imunidade contra infestações de carrapatos é induzida por vacinação com uma variedade de materiais antigênicos, incluindo macerados de todo o carrapato, extratos das glândulas salivares, material intestinal, cutículas, entre outros (WILLADSEN, 2004).

A aplicação de amplas técnicas moleculares revolucionou os conhecimentos sobre resposta imune protetora frente a ectoparasitas e levantou possíveis alvos para o desenvolvimento de vacinas. E não há dúvida de que a vacinação contra carrapatos apresenta maior sucesso do que contra qualquer outro ectoparasita, provavelmente porque os primeiros se alimentam mais devagar do que outros insetos, ficando mais tempo em contato com componentes do sistema imune do hospedeiro, ou pela forma de digestão intracelular (WILLADSEN, 2001; DALTON e MULCAHY, 2001).

Segundo WILLADSEN (1987), para qualquer ectoparasita hematófago, o repertório de antígenos em potencial, ou seja, moléculas do parasita que possam ser encontradas pelo sistema imune do hospedeiro, durante a alimentação, são bastante limitadas, enquanto que a variedade de moléculas do parasita que é exposta aos componentes do sangue do hospedeiro durante a ingurgitação é grande. Portanto, deve existir, no parasito, uma diversidade de alvos em potencial para um ataque imunológico do hospedeiro.

3.4 – IMUNOLOGIA CARRAPATOS

O controle de ectoparasitas pela vacinação tem sido estudado nas últimas cinco décadas (WIKEL, 1996). Do ponto de vista imunológico, o primeiro relato de imunidade do hospedeiro a carrapatos foi feito em 1911 por NUTTAL, referindo-se ao fenômeno de imunidade natural em humanos. Posteriormente, TRAGER (1939) observou que em infestações repetidas de *Dermacentor variabilis* em cobaios e coelhos,

havia um aumento de resistência, sólida o suficiente para reduzir o número de adultos, diminuição do peso ao desprendimento e do número de ovos e larvas viáveis e que a imunidade não era estritamente local ou de hipersensibilidade.

A coevolução das espécies de parasitas e hospedeiros ao longo do tempo contribuiu para uma compatibilidade seletiva responsável pela coexistência de ambas. As infecções parasíticas freqüentemente são caracterizadas pelo aparecimento de anticorpos e imunidade celular contra vários antígenos do parasita, os quais são muitas vezes imunodominantes e não essenciais à sua sobrevivência. Os parasitas, portanto, desenvolveram maneiras de evadir ou suprimir respostas imunes contra moléculas essenciais a sua sobrevivência (WIKEL *et al.*, 1994).

A resposta imune do hospedeiro e os mecanismos de escape do parasita estão em um equilíbrio extremamente refinado, que permite à sobrevivência de ambas as espécies. Como os carrapatos não tiveram oportunidade de desenvolver estratégias de escape da resposta imune contra antígenos ocultos devido à falta de contato entre estes antígenos e o sistema imune do bovino, esta resposta seria, teoricamente, mais eficaz que uma resposta imune natural (WILLADSEN, 1988).

Sabe-se que a distribuição de uma população de parasitas em uma população de hospedeiros não é uma distribuição normal e acredita-se que a imunidade inata e a resistência adquirida contribuam para isso. Desta forma, a aplicação de uma vacina eficaz permitiria o aumento da população de hospedeiros resistentes possibilitando a redução da infestação e o controle da população de parasitas (PRUETT, 1999).

Com objetivo de induzir uma melhor resistência aos animais, vários estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de obtê-la por imunização artificial. A capacidade dos bovinos imunizados de produzirem uma resposta imune para extratos de carrapatos e proteínas purificadas tem sido descrita. Foi observado que a taxa de fecundidade dos carrapatos alimentados em bovinos imunizados com ovo, larva ou tecidos adultos de *R. (B). microplus* é mais baixa que daqueles alimentados em bovinos não imunizados (DA SILVA VAZ JR *et al.*, 1998).

A resistência adquirida mediada imunologicamente (ALLEN, 1989) pode ser aferida pela redução no número de carrapatos que se fixam no hospedeiro, pela diminuição do peso das teleóginas e pela redução da produção de ovos e, conseqüentemente, de larvas (WIKEL & BERGMAN, 1997). A observação da diminuição de peso e número de ovos forneceu bases para as futuras tentativas de

utilização de vacinas no controle de ectoparasitas. Testes de imunização com diferentes antígenos têm fornecido evidências de que o controle destes ectoparasitas pode ser realizado através da vacinação (WILLADSEN, 2006). WILADSEN, 1989, considera que o primeiro passo para a produção de uma vacina prática deve ser, obrigatoriamente, a identificação de um número de antígenos alvos, suficientemente eficazes, e na forma purificada. É necessário também, além da identificação de proteínas capazes de induzir uma resposta imune protetora, o conhecimento dos mecanismos da resposta imunológica dos hospedeiros (WIKEL, 1996).

Em geral, dois tipos distintos de alvos antigênicos têm sido explorados para o desenvolvimento de vacinas. O primeiro é um antígeno convencional secretado na saliva durante o repasto sanguíneo, chamados de antígenos expostos. Usualmente, eles são proteínas ou peptídeos sintetizados na glândula salivar. Antígenos expostos são captados, no momento do repasto sanguíneo, pelas células dendríticas, as quais processam e apresentam aos linfócitos T, iniciando resposta imune humoral ou celular (ALLEN, *et al.*, 1979; LARREGINA, 2005). Em contraste, antígenos ocultos são normalmente não expostos aos mecanismos imunes do hospedeiro (WILLADSEN, 1988). Antígenos ocultos são originados, geralmente, do intestino de carrapatos e interagem com imunoglobulinas específicas, captadas no sangue ingerido.

Demonstrou-se que anticorpos de bovinos imunes, específicos para tecidos de carrapatos, estão presentes na hemolinfa de fêmeas de *R. (B.) microplus* ingurgitadas, com atividade preservada por até 48 horas após o ciclo de vida parasitária ser concluído (GUDDERRA *et al*, 2002). A análise da hemolinfa de *D. variabilis*, que é um carrapato de cães, comprovou a presença de imunoglobulina G (IgG) com capacidade de localização das proteínas alvo em órgãos como glândula salivar e ovário (ACKERMAN *et al*, 1985). Estudo semelhante feito em *A. americanum* demonstrou a presença de imunoglobulinas IgM sem indícios de degradação e com atividade preservada na hemolinfa desse carrapato (JASINKAS *et al*, 2000). Em *R. appendiculatus*, um carrapato ixodídeo como o *R. (B.) microplus*, a IgG presente na hemolinfa, no extrato de glândula salivar e na saliva mantêm 35-42% da atividade biológica até o sexto dia de alimentação do parasita (WANG e NUTTALL, 1994). Em diferentes espécies de mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Aedes* também foi observada a presença de IgG do hospedeiro na hemolinfa até 24 horas após a ingestão do sangue (VAUGHAN e AZAD, 1988). Soro de bovinos infestados com larvas de *R. (B.) microplus* reconhecem

antígenos de baixo peso molecular (10 a 20 KDa) presentes em órgãos distintos do carrapato, como glândula salivar e intestino, e em fases distintas do desenvolvimento (larva, ninfa e adulto). Essas observações comprovam o desenvolvimento de resposta imune pelo hospedeiro capaz de reconhecer estruturas internas do parasita. A presença de anticorpos contra esses componentes parasitários no soro dos hospedeiros possibilitaria resposta imune contra o parasita ao longo da fase de vida parasitária (DA SILVA VAZ Jr *et al*, 1996).

3.4.1 – IMUNIDADE A ANTÍGENOS OCULTOS “*concealed antigens*”

A imunidade induzida por antígenos protéicos ocultos, provenientes de *R. (B). microplus*, seja naturais, recombinantes ou sintéticos, tem resultado uma variável eficácia em um grande número de experimentos em campo e controlados (MASSARD *et al.*, 1995; RODRIGUEZ *et al.*, 1995; CANALES *et al.*, 1997; DE LA FUENTE *et al.*, 1998; PORTELA, 2000; PIMENTEL, 2002). Por não serem expostos ao hospedeiro em uma infestação natural, os antígenos ocultos não devem gerar mecanismos de escape do parasita por pressão seletiva (PRUETT, 1999; WILLADSEN e KEMP, 1988).

As vacinas baseadas no conceito de antígenos ocultos (WILLADSEN *et al.*, 1989), induzem resposta imune, causando danos aos carrapatos após a captura de sangue do hospedeiro contendo anticorpos específicos ao intestino juntamente com outros efetores humorais como o complemento (DE LA FUENTE *et al.*, 1998; GARCIA-GARCIA *et al.*, 1998). Essa resposta é determinada essencialmente por anticorpos (e possivelmente por componentes do complemento), sendo a eficácia da vacina, dependente e mantida por altos títulos destes. Para vacinas baseadas na proteína Bm86, alternativas têm sido testadas (WILLADSEN, 1999). Anticorpos interagem com antígeno oculto na superfície do intestino, causando ruptura, havendo hemorragia interna para a cavidade (RAND, *et al*, 1989), interferindo na digestão do sangue, subsequente produção de ovos e morte (NUTALL, *et al*, 2006).

HERNÁNDEZ *et al.*, 1997, constataram que o sangue dos animais vacinados ingeridos pelos carrapatos, continha altos níveis de anticorpos e outros elementos como o complemento, os quais mediam a resposta imune. Segundo AGBEDE & KEMP, (1986); 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 e postura dos ovos e, finalmente, na viabilidade dos ovos (RODRÍGUEZ, PENICHET, MOURÍZ, 1995), RODRIGUEZ, RUBIERA, MONTESINOS, 1994), (COBON, *et al*, 1995). O principal efeito não é eliminar instantaneamente os carrapatos nos bovinos, mas, reduzi-lo a próxima contaminação, dessa forma, diminuir o desafio na próxima geração (COBON, *et al*, 1995).

Existiram duas vacinas no mercado baseadas neste conceito, a TickGARD (Biotech Australia Pty. Ltd., Austrália) e a GAVAC (Heber Biotec S.A., Havana, Cuba). Ambas utilizaram um único antígeno, a Bm86, uma glicoproteína de membrana de células intestinais de *R. (B.) microplus*, expresso em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*, respectivamente.

A GAVAC™ foi registrada em Cuba em 1993, Colômbia e República Dominicana e em 1995 no Brasil, Paraguai e Bolívia. Testes em condições controladas foram conduzidos no México (FRAGOSO *et al*, 1995), Brasil (MASSARD, *et al*, 1995), Colômbia e Cuba (DE LA FUENTE, RODRIGUES, FRAGOSO, 1995) e testes em condições de campo em Cuba (RODRÍGUEZ, PENICHET, MOURÍZ, 1995) (RODRÍGUEZ *et al*, 1995), Brasil (RODRÍGUEZ, MASSARD, FONSECA, 1995) Argentina (LAMBERTI, SIGNORINI, MATTOS, 1995) e Colômbia (VANEGAS, *et al*, 1995).

Experimentos utilizando homogenatos de fêmeas adultas semi-ingurgitadas de *R. (B.) microplus* como antígenos mostraram que a resposta imune dos animais vacinados causou danos nas células intestinais do ectoparasita (PRUETT, 1999). Este efeito revelou resposta diferente da imunidade desencadeada por infestação natural. Como consequência, existe, de fato, redução da infestação e da capacidade reprodutiva dos carrapatos. Porém, a eficácia das vacinas baseadas na Bm86 é muito variável e suas principais limitações são os fatos de não induzir imunidade duradoura e não dispensar o uso combinado de acaricidas (DALTON e MULCAHY, 2001).

No Brasil, os primeiros testes conduzidos com a GAVAC foram realizados por MASSARD *et al.*, em 1995, os quais obtiveram cerca de 40% de redução no número de teleóginas e 51% de eficácia total, em animais estabulados. Em experimento a campo, realizado com gado holandês e mestiço, RODRIGUEZ *et al.* (1995) observaram redução significativa do número de teleóginas sobre os hospedeiros, durante 36 semanas

de desafio natural. LABRUNA *et al.*, (1999) observaram, em Carlos Chagas, estado de Minas Gerais, que a vacina isoladamente foi eficaz em controlar a população de carrapatos somente durante o período mais seco do ano. No sul do Brasil, HUNGERFORD *et al.* (1995) associaram o uso da TickGARD[®] com tratamentos carrapaticidas, obtendo resultados satisfatórios. A terceira vacina veio em 1996, a TickGARD PLUS[®], na qual além da Bm86 foi adicionada a Bm95 e de um novo adjuvante, chamado Vaximax[®], o qual induziria a produção de títulos mais altos de anticorpos específicos. Esta vacina foi testada com sucesso em várias raças de bovinos na Austrália (WILLADSEN, 1997).

A ação desses imunógenos é reduzir o número de carrapatos, a ovoposição, o peso das teleóginas e a fertilidade dos ovos (WILLADSEN, 1987; MASSARD *et al.*, 1995; OLIVEIRA, 1998; PORTELA, 2000, PATARROYO *et al.*, 2002).

3.4.2 – IMUNÓGENO SBm7462[®]

A partir da seqüência da Bm86, escolheram-se alguns peptídeos com possíveis características antigênicas. A escolha de tais peptídeos dentro da estrutura da proteína íntegra se baseou em estudos de predição computacional de sítios imunogênicos, com base nas propriedades de proteínas, tais como antigenicidade (HOOP e WOODS, 1981), potencialidade de alfa e beta hélice e Beta Sheet (CHOU e FASMAN, 1978), hidrofobicidade e hidrofiliçidade (KYTE e DOOLITTLE, 1982). A partir dessas análises, foram escolhidas três seqüências definidas como contendo alguns dos possíveis determinantes imunogênicos da Bm86. Estas seqüências foram desenhadas no LBCH/BIOAGRO/DVT da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, e sintetizadas no "Instituto de Inmunologia del Hospital San Juan de Dios" em Bogotá, Colômbia. Esses peptídeos foram catalogados pelo livro de seqüências como 4822 (a.a. 398-411), 4823 (a.a. 21-35) e 4824 (a.a. 132-145). A seqüência do peptídeo SBm7462 é resultado da síntese contínua dos peptídeos, 4822 (a.a. 398-411), 4824 (a.a. 132-145) e 4823 (a.a. 21-35).

O peptídeo sintético SBm4912 foi avaliado, experimentalmente, como imunógeno para o controle de *B. microplus* em bovinos da raça Hereford estabelecidos por OLIVEIRA (1998) no LBCH/DVT/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, utilizando-se três doses de 2,0 mg do peptídeo e 1,5 mg de saponina. Avaliaram-se também dois grupos controles, um para o adjuvante e outro como controle geral. Todos

os animais foram desafiados com 1.500 larvas/dia, durante 3 dias consecutivos, a partir do 21º dia após a terceira inoculação. Obteve-se 23,45%, na redução do número de teleóginas, 8,4% na redução do peso médio das teleóginas e 10,32% do peso médio da ovoposição, segundo fórmulas descritas por DE LA FUENTE (1995). Foram demonstradas, ainda, as interações *in situ* dos anticorpos no epitélio intestinal das teleóginas e as lesões produzidas por essas interações.

Devido a problemas com hidrossolubilidade e procurando-se aumentar a imunogenicidade, os mesmos laboratórios desenvolveram outros dois peptídeos, denominados SBm74622 (seqüência 4822-4824-4823) e SBm19733 (seqüência 4822-4823-4824, contendo pontes KEK entre as referidas seqüências), também baseado na estrutura da Bm86. PORTELA (2000) comparou a eficiência dos peptídeos SBm4912, SBm7462 e SBm19733, inoculando-os em animais estabulados da raça Jersey, seguindo o modelo experimental de OLIVEIRA (1998). As respectivas eficácias ($p < 0,01$) foram: 72,4% para o peptídeo SBm4912, 81,05% para o SBm7462 e de 35,87% para o SBm19733, tendo sido analisadas a redução no número das teleóginas, redução do peso dos ovos e redução da fertilidade, segundo DE LA FUENTE (1995). Tanto as interações *in situ* dos anticorpos produzidos no intestino dos carrapatos, quanto as lesões produzidas por tais, foram confirmadas para os peptídeos SBm4912 e SBm7462. De posse de tais resultados, era necessário analisar em teste misto, campo e estábulo, o peptídeo SBm7462.

Trabalhos realizados com imunógeno SBm7462[®] desenvolvidos por PORTELA (2000), PIMENTEL (2002) e PATARROYO *et al.* (2002), demonstraram um efeito protetor em animais imunizados relacionando os níveis de imunoglobulinas específicas em soro com a eficácia dos imunógenos, sendo que, PATARROYO *et al.* (2002) evidenciou o reconhecimento *in situ* desses anticorpos.

A vacina sintética SBm7462[®] contém determinantes antigênicos das proteína Bm86 os quais são comuns em diferentes cepas de carrapatos (PECONICK *et al.*, 2008) e adicionada a saponina como adjuvante, quando testada em bovinos obteve eficácia de 81,05% (PATARROYO, *et al.*, 2002).

Estas vacinas reforçam a idéia de que a imunoprofilaxia adotada com antígenos melhor selecionados possa ser uma maneira eficiente de se fazer o controle do carrapato *R. (B). microplus*.

3.5 – USO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES

A expressão heteróloga de proteínas recombinantes possui uma grande aplicabilidade, tanto biotecnológica quanto medicinal. Nos últimos anos, o número de proteínas recombinantes utilizadas para estes fins tem aumentado consideravelmente, com grande demanda no mercado (JANA e DEB, 2005).

Diversos são os sistemas de expressão utilizados, incluindo *Escherichia coli*, *Baculovirus*, *S. cerevisiae*, células de mamíferos, *Schizosaccharomyces pombe* e *Pichia pastoris*. Dentre esses, *P. pastoris* tem-se mostrado um sistema altamente eficaz na produção de várias proteínas (JANA e DEB, 2005).

Vários antígenos, isolados de diversos tecidos de carrapatos e expressos em proteínas recombinantes, têm sido testados como candidatos vacinais (tabela 02) (NUTALL, et al., 2006).

TABELA 02- Antígenos ocultos avaliados como vacinas recombinantes anti-carrapatos.

Espécie Carrapato	Comentários	Referências
<i>B. microplus</i>	Vacina comercial TickGARD	WILLADSEN <i>et al</i> , 1995
<i>B. microplus</i>	Aumento da eficácia de Bm86	WILLADSEN <i>et al</i> , 1996
<i>B. microplus</i>	Sequência variante de Bm86 usada na vacina cubana, GAVAC, protege bovinos contra infestações por cepas de <i>B. microplus</i> de diferentes áreas geográficas	GARCIA-GARCIA <i>et al</i> , 2000.
<i>B. microplus</i>	Proteína nativa eficaz, porém, não eficaz na forma recombinante	TELLAM <i>et al</i> , 2002.
<i>B. microplus</i>	Proteína recombinante (rBmPR M) liga a IgG e serpina colágeno	FERREIRA <i>et al</i> , 2002.
<i>H. longicornis</i>	Serpina; efeito nas ninfas	SUGINO <i>et al</i> , 2002
<i>A. hebraeum</i>	Proteína gonadal de machos; prejudica alimentação de fêmeas em coelhos	WEISS BL & KAUFMAN, 2004.
<i>H. longicornis</i>	Serpina; efeito nas ninfas e adultos	IMAMURA <i>et al</i> , 2005
<i>H. longicornis</i>	Proteína troponina I-like, prejudicou a alimentação de carrapatos em camundongos imunizados	MYUNG-JO, 2005.
<i>I. scapularis</i>	Efetivo contra adultos quando testados experimentalmente em ovelhas	ALMAZAN <i>et al</i> , 2005

Em medicina veterinária, a sequência de nucleotídeos codificante da proteína intestinal do carrapato *R. microplus* - Bm86 - vem sendo utilizada para a produção de diferentes versões da proteína recombinante, no intuito do desenvolvimento de maiores graus de proteção. O gene da Bm86 foi clonado e expressado em *Escherichia coli* (RAND *et al*, 1989), em fungos filamentosos (*Aspergillus nidulans* e *A. Niger*)

(TURNBULL *et al.*, 1990), em baculovírus (RICHARDSON *et al.*, 1993) e *Pichia pastoris* (RODRÍGUEZ *et al.*, 1994).

As vacinas baseadas em antígenos recombinantes não apresentam risco à saúde, são seguras para o ambiente e o desenvolvimento de resistência pelos carrapatos por meio de adaptação seletiva é pouco provável (NUTTALL *et al.*, 2006).

3.6 – *Pichia pastoris*

A levedura *P. pastoris* é um organismo metilotrófico capaz de metabolizar metanol como única fonte de carbono em seu meio de crescimento. Essa característica está sob controle de um forte promotor induzível, denominado pAOX1, que controla a expressão do gene álcool oxidase (AOX1), envolvido na oxidação de metanol. Em *P. pastoris* existem dois genes que codificam para a álcool oxidase, AOX1 e AOX2. Todavia, 95% da atividade da álcool oxidase é atribuída a AOX1. O mecanismo de ativação deste gene envolve tanto a indução do seu promotor por metanol quanto a sua repressão pela ausência de outras fontes de carbono (TSCHOPP *et al.*, 1987). A concentração desta proteína pode alcançar cerca de 30% do total de proteínas solúveis.

O uso desse sistema de expressão tem crescido muito nos últimos anos. Isso pode ser atribuído a diversos fatores, como a simplicidade das técnicas utilizadas para a manipulação genética (alta frequência de transformação de DNA, clonagem por complementação funcional) e sua similaridade com *S. cerevisiae*, um dos sistemas experimentais mais caracterizados na biologia moderna. Outras características marcantes são a 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; CREGG, (1999); CEREGHINO; CREGG, (2000); GELLISSEN, (2000); TORRES; MORAES, (2000); CEREGHINO *et al.*, 2002). *P. pastoris* também é considerada uma levedura com capacidade fermentativa pobre, tendo preferência por

crescimento respiratório (CEREGHINO *et al.*, 2002). A vantagem desta característica sobre as leveduras fermentativas é a possibilidade de obter cultivos com densidades celulares extremas sem que os produtos de fermentação causem danos de toxicidade para as células (TORRES e MORAES, 2000; CEREGHINO *et al.*, 2002).

Modificações pós-traducionais de proteínas realizadas na *P. pastoris* representam a grande vantagem deste sistema de expressão. Além do processamento do peptídeo sinal, a formação de pontes dissulfídicas e a adição de certos lipídios, realizam tanto a N- quanto a O- glicosilação de proteínas (DALY; HEARN, 2005). No entanto, em relação a *S. cerevisiae*, *P. pastoris* não possui tendência de hiper-glicosilação e realiza a adição de manoses terminais por ligações 1,2 e não 1,3, como a *S. cerevisiae*, a qual é considerada alergênica (CEREGHINO; CREGG, 2000; GELLISSEN, 2000).

Em virtude dessas características, algumas proteínas como, por exemplo, proteína G acoplada a receptores que não são expressas eficientemente em bactérias *S. cerevisiae* ou em baculovírus têm sido expressas eficientemente na sua forma ativa em *P. pastoris* (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

Estratégias para produção de proteínas heterólogas em *Pichia pastoris* têm sido desenvolvidas por muitos pesquisadores (CUNHA, *et al.*, 2004, DAMASCENO, *et al.*, 2004, HELLWIG, *et al.*, 2001, COS, *et al.*, 2006, D'ANJOU, *et al.*, 2000). Aproximadamente 400 proteínas de procariotos, eucariotos e vírus têm sido expressas nesta levedura (CEREGHINO *et al.*, 2002).

O objetivo central deste trabalho foi à avaliação da eficiência vacinal de dois peptídeos recombinantes desenhados a partir de epitopos antigênicos da proteína intestinal Bm86 e expresso na levedura *P. pastoris* transformadas com genes sintéticos com códons otimizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – LOCAIS DOS ESTUDOS

O estudo foi realizado em duas etapas, nos seguintes locais:

- Isolamento de Bovinos – Departamento de Veterinária – UFV – constituído por 12 baias com capacidade de manter dois animais por área. O setor é caracterizado por ser isolado do ambiente externo, através de telas de malhas finas, a fim de evitar o contato dos animais com artrópodes. Nesse local foram realizados todos os estudos “*in vivo*”.
- LBCHV (Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores) – Bioagro – Departamento de Veterinária – UFV onde foram realizados os ensaios laboratoriais para a avaliação da cinética humoral por ELISA; manutenção da colônia de carrapatos e avaliações biológicas das fases não parasitárias do carrapato.

4.2 – ANIMAIS UTILIZADOS E MANUTENÇÃO.

Todos os procedimentos experimentais que envolveram a manipulação dos animais utilizados foram realizados seguindo rigorosamente as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV, estando registrado e aprovado no Comitê de Ética da instituição.

Foram utilizados 17 bovinos machos mestiços (H/Z), média de sangue 7/8, com idade entre 6 e 10 meses, oriundos de fazendas leiteiras do município de Viçosa-MG e mantidos desde o seu nascimento no isolamento de bovinos.

Os animais foram identificados por meio de brincos auriculares numerados. A alimentação foi baseada em ração balanceada e de volumoso (feno) com 17% de proteína, oferecida às 8 horas da manhã e às 16 horas e água *ad libitum*. Um animal macho *Bos taurus taurus* foi utilizado para a manutenção da colônia de carrapatos *R. (B) microplus*.

4.3 – PEPTÍDEOS rBmseq1 e rBmseq4

SOSSAI (2009) desenhou genes sintéticos para produção de peptídeos imunodefinidos derivados da proteína intestinal Bm86 do carrapato *R. microplus*, os quais tiveram como base a seqüência de aminoácidos do peptídeo sintético SBm7462[®]. Os genes foram otimizados para uso na levedura *Pichia pastoris* Km71 e expressos a partir do vetor pPIC9 (Invitrogen USA).

O gene *seq1* foi desenhado de tal forma que o peptídeo SBm7462 foi repetido em *tandem* por três vezes. Já o gene *seq4* possui a seqüência original do peptídeo SBm7462. Ambos os genes apresentam sítios de N-glicosilação nos sítios N-X-T. Os produtos desses genes foram recuperados do meio extracelular por ultrafiltração tangencial e diálise. Os peptídeos heterólogos foram caracterizados por SDS-PAGE e Western blotting sendo reconhecidos por soro hiperimune de coelho imunizado com o peptídeo SBm7462, demonstrando que os peptídeos verificados no SDS-PAGE eram os produtos dos genes sintéticos.

4.4 – ADJUVANTE SAPONINA

Foi utilizado o adjuvante saponina na dose de 1,5 mg/animal diluído em água milli Q estéril para os grupos rBmseq1 e rBmseq4.

4.5 - ESQUEMA DE INOCULAÇÃO VACINAL

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos de 04 animais cada. As inoculações foram realizadas em três doses, via subcutânea, sendo:

- Primeira inoculação: dia 0 (zero)
- Segunda inoculação: dia 30
- Terceira inoculação: dia 60

O esquema de inoculação está descrito abaixo:

- Grupo **rBmseq1**: 1,5 mg de saponina adicionado de 2 mg do peptídeo **rBmseq1** diluído em 4 ml de água milli Q estéril.
- Grupo **rBmseq4**: 1,5 mg de saponina adicionado de 2 mg do peptídeo **rBmseq4** diluído em 4 ml de água milli Q estéril.
- Grupo Controle : 4 ml de água milli Q estéril.

- Grupo *Pichia pastoris*: 2 mg de extrato bruto de *P.pastoris* diluído em 4 ml de água milli Q estéril.

4.6 – DESAFIO

4.6.1 - MANUTENÇÃO DA COLÔNIA DE *Rhipicephalus (B.) microplus*

A cepa de carrapatos utilizada foi denominada cepa “Viçosa”, cujo perfil de resistência é desconhecido.

As teleóginas foram mantidas em estufa B.O.D. a 28°C e umidade relativa de 80%. Os ovos dos três primeiros dias foram utilizados para produção de larvas para expansão da colônia. Para o desafio, foram feitas 50 alíquotas de 75 miligramas de ovos cada uma, o que corresponde a 1.500 ovos, segundo (LABRUNA *et al.*, 1997, PEREIRA, 1998) em tubos de 5ml vedadas com chumaço de algodão. Tais alíquotas foram mantidas em estufa até a eclosão, de forma que as larvas provenientes teriam no máximo duas semanas de eclosão quando usadas para o desafio.

4.6.2. INFESTAÇÕES EXPERIMENTAIS DOS BOVINOS

Após 21 dias da última inoculação dos peptídeos, os animais foram desafiados com larvas de *R. (B.) microplus* na quantidade de 1.500 larvas por dia, durante três dias, no início da manhã. O desafio dos animais foi conforme PIMENTEL, 2002, abaixo descrito:

Dia 1 - Região do peito e barbela

Dia 2 - Região escapular e entre os membros anteriores

Dia 3 - Região escrotal e inguinal

Os animais foram mantidos em cabresto e com as caudas amarradas por 8 horas, a fim de correta fixação das larvas.

4.6.3 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DAS TELEÓGINAS DESPRENDIDAS DOS ANIMAIS.

Após o desafio com as larvas de carrapato, foram realizadas observações diárias até o décimo oitavo dia, para verificar o desenvolvimento das larvas, ninfas e prever o provável dia do início do desprendimento de teleóginas. Aos 21 dias, com o começo da queda das fêmeas, foi iniciado procedimento de coleta manual de todas as teleóginas encontradas no chão das baias, no cocho de alimentação e na grade de escoamento de detritos. Para uma coleta mais fiel, a baia foi lavada duas vezes ao dia e todo o material resultante dessa lavagem foi peneirado, e as teleóginas retiradas foram contadas e identificadas.

4.6.3.1 - NÚMERO DAS TELEÓGINAS.

Foram contabilizadas as teleóginas desprendidas naturalmente e também as pisoteadas.

4.6.3.2 - PESO DAS TELEÓGINAS.

As teleóginas coletadas foram lavadas em água corrente e pesadas em balança analítica, com precisão de 3 casas decimais, a fim de determinar a porcentagem de redução de seu peso médio.

4.6.3.3 - PESO DA POSTURA (PPO)

Após o término da postura, foi avaliado o peso total de postura de cada grupo.

4.6.3.4 - RELAÇÃO PESO LARVA/GRAMA DE OVOS

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

4.6.3.5 - FÓRMULAS PARA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS

Com o objetivo de avaliar o efeito dos imunógenos sobre os parâmetros biológicos do carrapato, foram empregadas as fórmulas preconizadas por DE LA FUENTE (1995) utilizadas para a rBM86, para os grupos vacinais e para os grupos controle, como mostrado a seguir:

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

onde:

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

NTV- nº teleóginas para cada grupo vacinal

NTC - nº teleóginas grupo Controle.

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

onde:

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

PMTV - Peso médio das teleóginas para cada grupo vacinal;

PMTC - Peso médio das teleóginas grupo Controle.

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

onde:

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

PMOV - Peso médio dos ovos para cada grupo vacinal

PMOC - Peso médio dos ovos grupo Controle.

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

Onde:

DF(%) - Redução na fertilidade dos ovos

PPLOV - Peso médio das larvas por grama de ovos em cada grupo vacinal

PPLOC - Peso médio das larvas por grama de ovos no grupo Controle

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

onde:

EF(%) - Eficácia do imunógeno

CRT - Redução no número de fêmeas adultas (1 - DT)

CRO - Redução na capacidade de ovipostura (1 - DO)

CRF - Redução na fertilidade (1- DF)

Os valores obtidos para cada grupo vacinal foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey.

4.7 - ESTUDO DA CINÉTICA HUMORAL

4.7.1. COLETA DE SANGUE PARA SOROLOGIA

A coleta de sangue dos animais foi feita semanalmente a partir da semana 0 até a 14^o semana, sendo que a primeira coleta foi realizada antes da primeira inoculação. O sangue foi coletado através da punção da veia jugular utilizando frascos do tipo “vaccuntainer” de 10ml sem anticoagulante.

O sangue coletado foi enviado para o Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/Departamento de Veterinária/BIAGRO/UFV, onde foi mantido “overnight” a temperatura ambiente, protegido da luz. Na manhã seguinte, as amostras foram centrifugadas a 1500g por 5 minutos. O soro obtido de cada amostra foi alíquotado e estocado à -20°C em tubos de 2 ml devidamente identificados.

4.7.2 - TESTE DE ELISA PARA MEDIÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

A cinética de anticorpos anti- rBmseq1 e rBmseq4 foi medida utilizando-se o teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), de acordo com a técnica utilizada rotineiramente no LBCHV e adaptada para peptídeos recombinantes (SOSSAI, 2009).

Para cada amostra foram feitas triplicatas. Para cada dia da realização de um teste eram usados soros dos animais dos 4 grupos.

As placas de Maxisorp[®] foram sensibilizadas com uma solução de Tampão Carbonato pH 9,6 (0,159g Na₂CO₃; 0,293g NaHCO₃; H₂O milli Q q.s.p. 100ml), na qual se diluiu o peptídeo na quantidade de 2µg/well, deixando-se adsorver a 4°C “overnight”. Decorrido este período, as placas foram lavadas duas vezes com solução Tampão de Lavagem (9,0g de NaCl; 0,5ml Tween 20, H₂O dd q.s.p. 1000ml) e adicionada a solução de bloqueio – Caseína 2% em PBS pH 7,6 (4,25g NaCl; 0,64g Na₂HPO₄; 0,068g NaH₂PO₄.H₂O; H₂O milli Q q.s.p. 500ml) por uma hora à temperatura ambiente. Lavou-se as placas duas vezes e, posteriormente, adicionou-se 100ml/well dos soros dos animais do experimento diluídos 1:100 em solução Tampão de Incubação (87,5 ml de PBS pH 7,6; 12,5 ml de caseína 2% em PBS pH 7,6; 50ml de Tween 20) e deixou-se incubar por duas horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas seis vezes com solução Tampão de Lavagem e procedeu-se à incubação, por duas horas à temperatura ambiente, do anticorpo secundário – IgG de coelho anti-IgG bovina conjugada com peroxidase (Sigma[®] título 1:20.000), diluída em solução Tampão de incubação, no volume de 100ml/well. Lavou-se as placas seis vezes com Tampão de Lavagem e adicionou-se a solução reveladora no volume de 100ml/well, composta de 20ml de Tampão Substrato (7,19g Na₂HPO₄, 5,19g ácido cítrico e H₂O milli Q q.s.p. 1000ml), 4mg de O. P. D. (q- fenildiaminobenzeno) e 2,5ml de H₂O₂, por um período de 20 minutos em local escuro. A reação foi parada com 30ml/well de ácido sulfúrico 1:20. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 492nm (Titer Multiskan[®] PLUS8).

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

5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se do teste de Análise de Variância (ANOVA) para comparação entre os diversos ensaios. Para isto, foi verificado se os dados atendiam as pressuposições de normalidade e variância das amostras, e dessa forma, foi feito o teste de Tukey.

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software estatístico Sigmastat[®] Versão 2006.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CINÉTICA DE ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEO RECOMBINANTE rBm7462

Todos os resultados descritos abaixo se referem aos soros dos animais que compuseram os grupos vacinais, controle e *Pichia pastoris*, coletados conforme já descrito nos materiais e métodos.

Os resultados obtidos nos testes de ELISA encontram-se no quadro 1 e na figura 2.

A escolha da técnica de ELISA para mensuração da resposta imune humoral (IgG) aos peptídeos recombinantes utilizados neste experimento se deu pela boa sensibilidade e especificidade da técnica, aliada ao baixo custo e praticidade, sendo eficaz em identificar os anticorpos anti-rBmseq1 e anti-rBmseq4. Vários autores citam o emprego dessa técnica em antígenos derivados de carrapatos, como extratos de intestino e ovos de carrapatos (KIMARO e OPDEBEECK, 1994), extratos de embrião, larvas, glândulas salivares e membranas intestinais (OPDEBEECK *et al*, 1988; VAZ JÚNIOR *et al*, 1994; PENICHET *et al*, 1994) extratos de fêmeas adultas (KEMP *et al*, 1986; JACKSON e OPDEBEECK, 1994), extratos purificados de Bm86 (WILLADSEN *et al*., 1989), formas recombinantes de Bm86 (WILLADSEN e MCKENNA, 1991; SOSSAI, 2009) e peptídeos sintéticos baseados na estrutura de Bm86 (SHARP *et al*., 1990; OLIVEIRA, *et al* 1998; PATARROYO *et al*., 2002).

QUADRO 1 - Médias de absorvância óptica (492nm) em teste de ELISA. Os números representam as médias de absorvância, sendo que para cada soro de cada amostra de soro foram feitas três repetições. Letras diferentes (a, b, c, d) seguindo os resultados, na mesma coluna, significam diferença estatística em Teste tukey ($p < 0,05$).

Médias de Absorbância Óptica (492 nm)															
Grupos	Semanas														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
rBmseql	0,7056 ^a	1,07 ^a	0,5988 ^a	0,5306 ^a	0,6084 ^a	1,0052 ^a	1,3715 ^a	1,2446 ^a	1,0408 ^a	2,325 ^a	1,8759 ^a	1,7726 ^a	1,8476 ^a	1,7699 ^a	1,601 ^a
rBmseq4	0,8407 ^a	0,8526 ^a	0,6926 ^a	0,7036 ^a	0,7368 ^a	1,4197 ^a	1,4619 ^a	1,2371 ^a	1,1094 ^a	2,335 ^a	2,054 ^a	1,8624 ^a	2 ^a	1,7564 ^a	1,7746 ^a
Controle	0,8111 ^a	0,6729 ^a	0,6211 ^a	0,689 ^a	0,7262 ^a	0,9363 ^a	0,680 ^c	0,730 ^a	0,737 ^a	0,6930 ^c	0,8189 ^c	0,838 ^c	0,67 ^c	0,67 ^c	0,652 ^c
Pichia	0,8588 ^a	0,6633 ^a	0,6156 ^a	0,6453 ^a	0,6067 ^a	0,9684 ^a	0,7677 ^c	0,8088 ^a	0,6761 ^a	0,7685 ^c	0,6553 ^c	0,6137 ^c	0,6245 ^c	0,62 ^c	0,6442 ^c

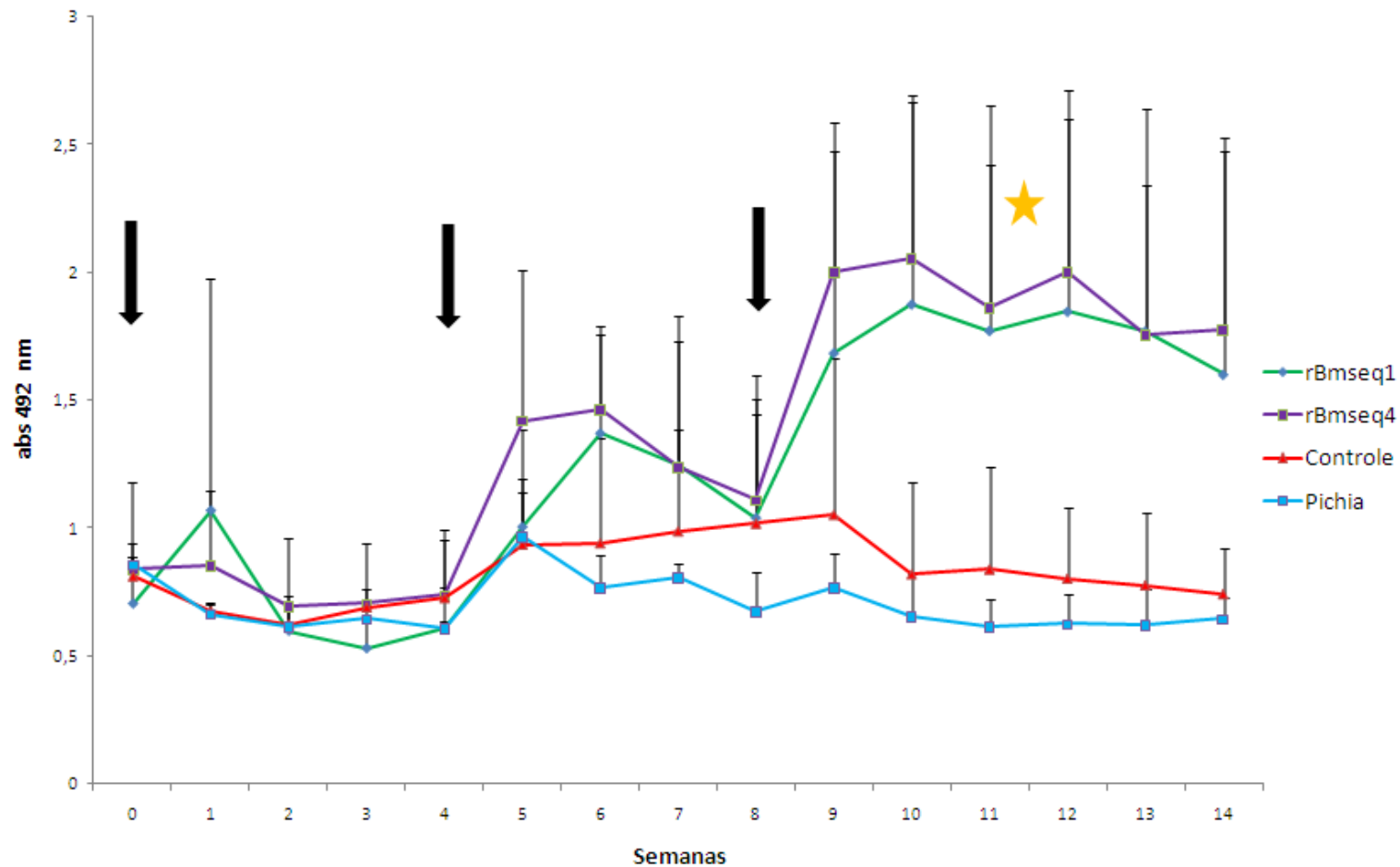


FIGURA 2 – Cinética de anticorpos em animais imunizados com rBmseq1 e rBmseq4. As setas indicam as inoculações com os peptídeos recombinantes e a estrela o desafio com larvas de *R.(B) microplus* em estábulo.

O quadro 1 e a figura 2 demonstram o quanto a técnica de ELISA empregada no experimento foi eficaz em identificar os anticorpos anti-rBmseq1 e rBmseq4 produzidos nos bovinos vacinados.

Os perfis das respostas imune humorais dos peptídeos rBmseq1 e rBmseq4 são mostrados na figura 2. O nível de anticorpos específicos anti-IgG aumenta a partir da quarta semana - 28 dias - após a primeira inoculação ocorrendo aumento do título de anticorpos após cada inoculação, o que demonstra a resposta imune secundária via células de memória produzidas a partir da primo- vacinação.

A cinética da resposta aos peptídeos rBmseq1 e rBmseq4 seguiu uma curva clássica de resposta IgG. Pelo conceito clássico de resposta imune, a partir do contato primário do sistema imune com o antígeno, há o processamento deste pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) e posterior apresentação dos determinantes antigênicos às células imunocompetentes CD4+, restritas ao Complexo Maior de Histocompatibilidade do Tipo II (MHC II) (ou CD8+, restritas ao MHC I), as quais modulariam a resposta protetora com a produção de citocinas. O perfil das citocinas produzidas direciona a resposta para o tipo Th2, com uma maior produção de anticorpos por linfócitos B, ou Th1, com predominância de uma resposta celular (BONA, *et al.*, 1998).

Após a terceira inoculação entre a 8^o e 14^o semanas verificou-se uma característica resposta secundária, onde a fase *lag* (semana 8) foi mais curta que na resposta primária, a fase *log* foi mais rápida e atingindo níveis mais elevados de anticorpos (semanas 8 a 10) e a fase de declínio entre a 10^o e 14^o semana não foi tão rápida.

Os maiores níveis de IgG foram obtidos na resposta secundária, o que é muito evidente após a terceira inoculação, com pico maior e atingido mais rapidamente na décima semana do estudo e com uma manutenção desses anticorpos a níveis estatisticamente diferentes até a 14^a semana quando comparados os grupos vacinados aos grupos controle e *P.pastoris*. O maior pico de produção de IgGs específicas após a terceira inoculação concordam com os achados de OLIVEIRA, (1998), PORTELA, (2000), COUTO-PIMENTEL, (2002), SOSSAI, (2009) e PATARROYO, *et al.*, 2009.

A afinidade de anticorpos ao antígeno aumentou progressivamente durante a resposta ligada ao peptídeo rBmseq4, essa maturação por afinidade foi mais pronunciada após a segunda inoculação, uma possível explicação seria a seleção clonal,

como consequência do aumento de afinidade, a avidéz dos anticorpos aumenta durante toda a resposta, gradual as três inoculações.

As médias obtidas das absorbâncias estão descritas no quadro 1. Duas semanas após a segunda inoculação – 63 dias – observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação aos grupos vacinais comparados aos grupos controle e *P. pastoris*. Os grupos vacinais não diferiram entre si durante todo o estudo.

Os grupos controle e *Pichia pastoris* se mantiveram em níveis basais sem discrepâncias, e iguais estatisticamente ($p < 0,05$), não havendo influência da levedura na resposta imune.

A variação das respostas individuais entre os animais de um mesmo grupo foi alta, o que é verificado pelos altos desvios-padrão nos grupos vacinados (figura 2). Isso pode ser justificado porque os animais deste experimento possuem graus de sangue diferentes dentro de uma mesma raça, podendo, geneticamente, possuírem características distintas quanto ao processamento e apresentação de antígenos pelo MHCII, primordiais na apresentação de antígenos e na comunicação entre células do sistema imune (STEAR *et al.*, 1989; HUGHES e YAGER, 1998).

Neste trabalho optou-se por não se usar um grupo saponina baseando-se nos trabalhos de OLIVEIRA (1998), PATARROYO *et al.*, 2002 e SOSSAI (2009), nos quais se demonstrou não haver diferença estatística entre o controle negativo e o grupo adjuvante.

Não foi realizada a isotipagem das subclasses de IgG neste trabalho, pois, as respostas vacinais com os antígenos Bm86 e SBm7462 são induzidas por linfócitos TH2, com perfis de citocinas IL-4 e IL-5 e produção do isotipo IgG₁ (TRIGUERO *et al.*, 1999; VALLE *et al.*, 2001; GONZALES-LOMBANA, 2004; SALES-JÚNIOR *et al.*, 2005, MONTAÑO, 2006; PATARROYO *et al.*, 2009), da mesma forma, como demonstrado por SOSSAI, 2009, para os peptídeos rBmseq1 e rBmseq4, a prevalência do isotipo IgG₁.

6.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* PROVENIENTES DE ANIMAIS INOCULADOS COM OS PEPTÍDEOS rBmseq1 e rBmseq4.

Após 21 dias da última inoculação dos peptídeos rBmseq1 e rBmseq4 foi realizado o desafio dos animais através de infestação artificial com *R.(B) microplus*. A partir do 19º dia desta, foi monitorado o desenvolvimento larval à teleógina, para isto, foi feito recolhimento diário, pela manhã e pela tarde, no chão das baias e no grade de escoamento.

Os valores relativos à contagem, peso médio, peso médio da oviposição das teleóginas desprendidas, relação peso larva/grama de ovos e eficácia do imunógeno são mostrados no Quadro 2.

QUADRO 02 - Parâmetros biológicos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de animais inoculados com as seqüências rBmseq1 e rBmseq4 e do grupo controle.

Parâmetros Biológicos			
	Controle	rBmseq1	rBmseq4
Número de teleógenas desprendidas	1049 ^a	679 ^b	362 ^c
Peso médio das teleógenas desprendidas	0,2553 ^a	0,2585 ^a	0,2516 ^a
Peso médio de oviposição	0,1224 ^a	0,1230 ^a	0,1183 ^a
Peso larva/grama de ovos	0,0533 ^a	0,0391 ^b	0,0441 ^b
Redução peso dos ovos (DO)		0,49% ^a	3,35% ^b
Redução teleógenas (DT)		35,27% ^a	65,49% ^b
Redução fertilidade (DF)		26,64% ^a	17,26% ^a
Eficácia (EF)		52,72^a	72,40^b

As letras diferentes (a, b), numa mesma linha, indicam diferença estatística significativa ao nível de significância de 0,05% no Teste de Tukey.

6.2.1. - NÚMERO DE TELEÓGINAS DESPRENDIDAS

Quanto ao número de teleóginas, os grupos vacinados são estatisticamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$) e, estes, diferentes entre si. Notadamente há uma redução do número de teleóginas (DT) para o grupo rBmseq1 de 35,27% e de 65,49% para rBmseq4.

No gráfico 1, pode-se observar que enquanto no grupo controle há um aumento ascendente até o terceiro dia de desprendimento, nos grupos vacinais o pico de desprendimento de teleóginas ocorre no segundo dia do início, com níveis abaixo de 100 carrapatos por dia (quadro 3) para a rBmseq4 e para rBmseq1 entre 100-150 carrapatos/dia até dia 7, data em que não há mais teleóginas nos animais. O grupo controle teve uma persistência maior quanto à duração do período de desprendimento das teleóginas e, sendo que o número de teleóginas, manteve valores superiores aos demais grupos do estudo.

A redução na população de carrapato é provavelmente decorrente da alteração dos processos biológicos, especialmente os processos metabólicos da digestão, afetando as gerações que se sucedem. Conseqüentemente, a reprodução torna-se menos eficiente e a capacidade de sobrevivência e o poder de fixação das larvas diminui substancialmente. As alterações nos parâmetros biológicos de *R. (B.) microplus* contribuem para a redução das populações deste carrapato nas pastagens.

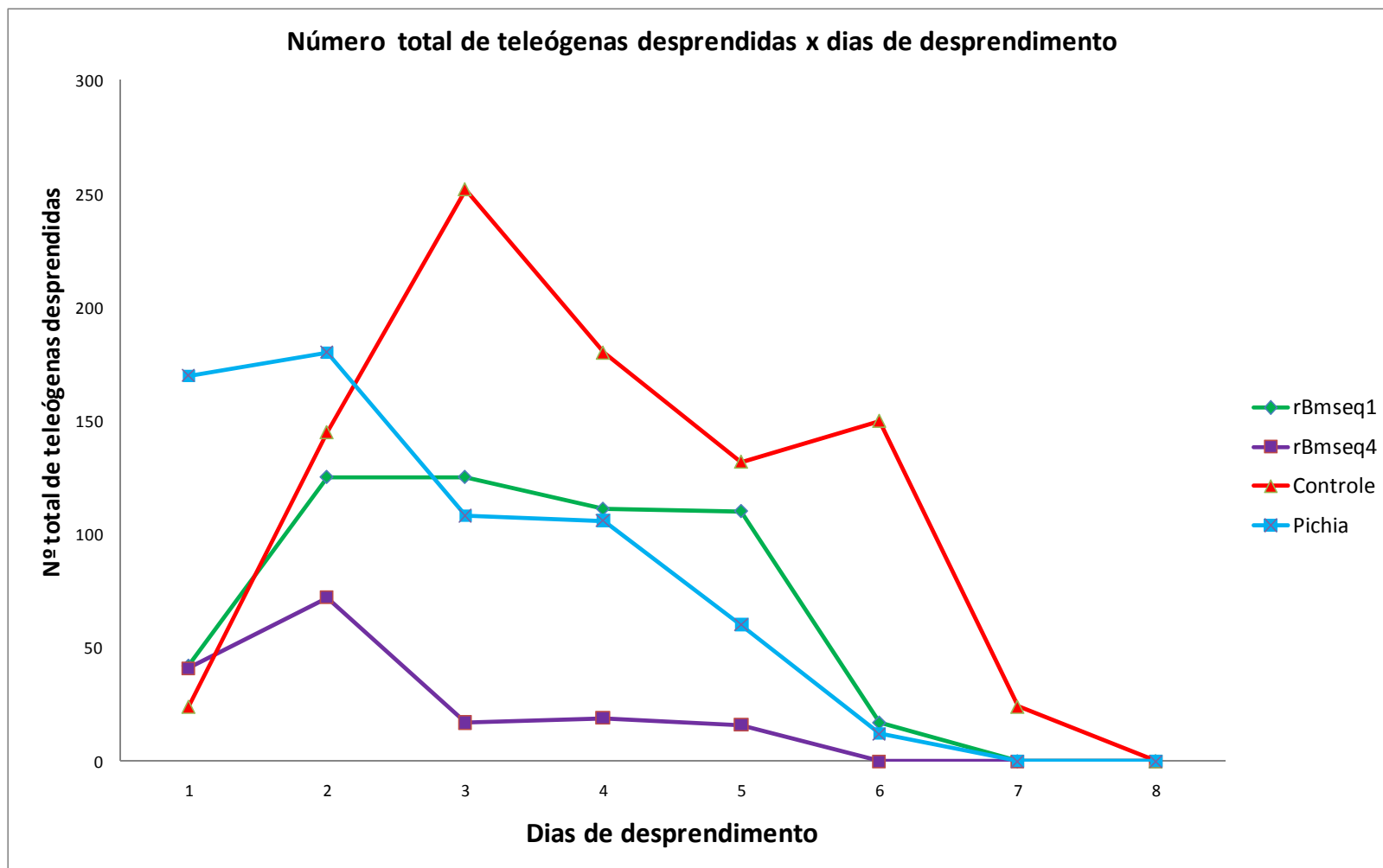


GRÁFICO 01- Efeito biológico sobre o número de teleógenas desprendidas de animais inoculados com os peptídeos Rbmseq1 e rBmseq4 em teste de estábulo. O primeiro dia de desprendimento correspondeu ao 19º dia pós infestação artificial com larvas de *R. (B.) microplus*.

6.2.2 - PESO DAS TELEÓGINAS DESPRENDIDAS E PESO DOS OVOS

Quanto ao peso das teleóginas e peso dos ovos, não houve diferença estatística entre os grupos vacinais e controle ($p > 0,05$). Porém, para o DO (redução do peso dos ovos) há diferença estatística entre os grupos vacinais ($p < 0,05$), demonstrando uma maior redução do parâmetro no grupo rBmseq4 (QUADRO 2). Esse resultado pode ser devido da ação dos anticorpos anti-rBmseq4 na proteína Bm86 “*in situ*” prejudicando a digestão do sangue e a produção da vitelogenina dos ovos a qual tem participação direta na nutrição do embrião (LOGULLO *et al.*, 1998).

6.2.3 - RELAÇÃO LARVA/GRAMA DE OVOS

Para a relação larvas/grama de ovos nota-se maior redução de peso das larvas entre os grupos vacinais, quando comparado com o controle, em especial no grupo rBmseq1, o que, diretamente, faz com que DF (redução da fertilidade) seja maior no mesmo grupo (QUADRO 02). Sugere-se que a ação dos anticorpos protetores sobre a atividade da vitelogenina tenha ocasionado a diminuição da fertilidade e eclodibilidade dos ovos, aumentando o valor de DF.

6.3 - EFICÁCIA VACINAL

A eficiência vacinal das sequências rBmseq1 e rBmseq4 derivadas do peptídeo SBm7462 foi de 52,72% e de 72,40%, respectivamente. Estes resultados estão condizentes com aqueles obtidos com a vacina GAVAC, entre 50 e 91%, contra diferentes cepas de carrapatos diferentes raças bovinas, sendo que estes valores resultam da redução da viabilidade e do número de ovos, conseqüentemente diminuindo o número de carrapatos nas gerações subseqüentes, tendo todos os estágios de desenvolvimento comprometidos (RODRIGUEZ, *et al.*, 1994, JONSSON *et al.*, 2000).

Ao analisar o quadro 1, são observadas altas médias de absorvâncias no grupo rBmseq1, sem diferença estatística quando comparada ao grupo vacinal rBmseq4 durante todo o estudo, porém, mesmo sem diferirem estatisticamente, o peptídeo rBmseq1 apresentou menor eficiência final em comparação com peptídeo rBmseq4. Uma possível explicação para tal fato, pode ser inferida a possível inadequação da dose de rBmseq1 a bovinos neste estudo, visto que, uma dose superior a adequada a espécie, poderia levar a uma tolerância, mesmo que parcial, influenciando diretamente a resposta imunogênica, ocasionando uma menor proteção, conseqüentemente, uma

menor eficiência. Estudo realizado por COUTO-PIMENTEL, 2002, em condições semelhantes, mostrou claramente que a variação das eficácias encontradas pelo, foi determinada pela dose de antígeno administrada: com 1mg de proteína obteve 15,8% de eficácia, enquanto que com uma dose de 2mg foi atingido 53,39%, em igual situação.

A eficácia vacinal do peptídeo rBmseq1 comparada aos estudos realizados com a vacina GAVAC obteve resultado semelhante ao menor valor de eficácia dentro do grupo. Comparada ao resultados encontrados com o peptídeo sintético, foi superior ao teste realizado com 1 mg do peptídeo em COUTO-PIMENTEL, 2002. Isso pode ser devido ao descrito acima.

A eficácia vacinal do peptídeo rBmseq4 comparada aos estudos realizados com a vacina GAVAC obteve resultado superior, sendo inferior somente aos testes realizados com cepas Camcord, Cenapa e Yeerongpigly (PENICHET, *et al.*, 1994) e Camcord (RODRIGUEZ *et al.*, 1994).

Quanto aos estudos realizados com o peptídeo SBm7462, os resultados aqui obtidos mostraram eficácia inferior somente quando comparado com o estudo de PORTELA, 2000. Os resultados deste trabalho evidenciam que o peptídeo rBmseq4 produz uma resposta imune protetora contra o *R. (B).microplus*, com uma eficácia semelhante aos demais ensaios com a vacina GAVAC e com o peptídeo sintético SBm7462.

TABELA 02 – Comparação dos resultados obtidos neste experimento – ensaios 11 e 12 - com resultados obtidos em 10 estudos realizados para efeito da vacinação com Gavac™ - estudos 1 a 10 - e estudos realizados com o peptídeo SBm7462 – estudos 13, 14 e 15.

Experimento	Cepa Carrapato	Raça (N)	Local do experimento	%Redução				Referência
				DT	DO	DF	Eficácia (%)	
1	Camcord	Holandês (6)	Havana, Cuba	74	60	12	91	Penichet et al., 1994
2	Camcord	Holandês (10)	Havana, Cuba	30	61	13	76	Rodriguez et al., 1994
3	Camcord	Holandês (10)	Havana, Cuba	46	43	10	72	Garcia et al, não publicado
4	Yeerongpilly	Holandês (6)	Havana, Cuba	43	50	11	75	Penichet et al., 1994
5	Cenapa	Holandês (6)	Havana, Cuba	67	46	12	84	Penichet et al., 1994
6	Tuxpan	Holandês (6)	Havana, Cuba	9	38	13	51	Penichet et al., 1994
7	Tuxpan	aberdeen angus (4)	Cuernavaca, México	43	22	0	56	Fragoso, 1995
8	Mora	aberdeen angus (4)	Cuernavaca, México	19	26	30	58	Fragoso, 1995
9	Colombiana	Normando (6)	Bogota, Colômbia	41	26	8,5	60	Garcia
10	Brasileira	Jersey (5)	Rio de Janeiro, Brasil	40	8	10,2	51	Massard et al., 1995
11*	Viçosa	Holandês (4)	Viçosa, Brasil	35,27	0,49	26,64	52,72	Tese
12*	Viçosa	Holandês (4)	Viçosa, Brasil	65,49	3,35	17,26	72,4	Tese
13*	Porto Alegre	Holandês (10)	Viçosa, Brasil	10,36	2,57	3,58	15,8	Couto-Pimentel, 2002
14*	Porto Alegre	Holandês (10)	Viçosa, Brasil	47,85	5,48	5,22	53,29	Couto-Pimentel, 2002
15*	Viçosa 1	Jersey (4)	Viçosa, Brasil	60,92	27,53	5,44	81,05	Portela, 2000

DT – Porcentagem da redução do número de teleóginas

DO – Porcentagem da redução do peso médio dos ovos

DF – Redução na fertilidade dos ovos

¹⁻¹⁰ estudos de eficácia comparativos com a vacina GAVAC™ (CANALES, *et al.*, 1997)

¹¹ estudos de eficácia rBmseql

¹² estudos de eficácia rBmseq4

¹³ 1 mg de proteína - sBm7462 – teste misto (COUTO-PIMENTEL, 2002)

¹⁴ 2 mg de proteína - sBm7462 – teste misto (COUTO- PIMENTEL, 2002)

¹⁵ 2 sBm7462 – teste estábulo (PORTELA, 2000)

Considerando a tabela 2, nota-se que o valor de DT do peptídeo rBmseq4 foi superior, em sua maioria, aos encontrados nos estudos realizados com a vacina GAVAC™.

Ainda a respeito a DF, a maioria dos valores encontrados nesse estudo foram inferiores aos que se observaram com os dois imunógenos, exceto o experimento número 8. Por outro lado, os valores de DO, dos dois peptídeos, demonstraram-se inferiores aos demais resultados.

Comparando os resultados obtidos com os peptídeos recombinantes aqui testados e o seu homólogo sintético sBm7462, nota-se que houve uma maior redução do número de teleóginas para o peptídeo rBmseq4, predominantemente sobre os peptídeos rBmseq1 e peptídeo sintético testado a campo, teste misto e em estábulo. Em relação ao peso de ovos (DO), houve uma maior redução da oviposição nos estudos com o peptídeo sintético a campo com 2mg de proteína e estudo em estábulo, com superioridade prevalente para este. Em relação à redução da fertilidade (DF), houve uma significativa superioridade para os grupos testados com a proteína recombinante em relação aos estudos com o peptídeo sintético.

A principal hipótese determinante das ações das vacinas com peptídeos recombinantes produzidos em *Pichia pastoris* sobre os parâmetros biológicos e a cinética humoral aqui verificada poderia estar ligada às glicosilações dos peptídeos utilizados – N-glicosilação – sobre o sítio NXT, possivelmente tendo como característica o aumento do poder antigênico e imunogênico dos antígenos, refletindo nos altos títulos de anticorpos encontrados nos soros dos animais vacinados e maiores afinidades, responsáveis, em conjunto com componentes do complemento pela ação direta na Bm86 intestinal do carrapato, reduzindo a sua capacidade digestiva, seu ingurgitamento e conseqüente diminuição na conversão de componentes sanguíneos em vitelogina (BALASHOV, 1972; SONESHINE, 1991), compostos importantes para o desenvolvimento e alimentação da larva pré e pós-eclosão.

Recentes artigos têm apresentado avanços e estratégias para a descoberta de vacinas contra carrapatos (DE LA FUENTE, KOCAM, 2003; WILLADSEN, 2004; WILLADSEN, 2006; DE LA FUENTE, KOCAM, 2006 e NUTTAL *et al.*, 2006). Entretanto, a importância de epítomos de açúcar como antígenos vacinais de carrapatos,

brevemente discutidos por NUTTAL *et al.*, 2006 e WILLADSEN, 2004 tem sido pouco investigada e largamente negligenciadas.

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

CONCLUSÕES

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

- Os peptídeos recombinantes foram capazes de induzir uma resposta imune protetora contra a amostra “VIÇOSA” de *R.(B.) microplus* em bovinos mestiços (H/Z) em teste controlado. O número de teleóginas desprendidas dos grupos vacinados foi menor que do grupo controle. As teleóginas provenientes de animais imunizados com os peptídeos rBmseq1 e rBmseq4 não diferiram do grupo controle e entre si quanto o peso médio das teleóginas desprendidas e sua oviposição. A taxa de eclodibilidade dos ovos provenientes de teleóginas dos grupos vacinados foi menor do que a de teleóginas provenientes de animais do grupo controle.
- A sequência rBmseq4 se mostrou mais efetiva quando comparada ao peptídeo rBmseq1. A eficácia dos peptídeos recombinantes rBmseq1 e rBmseq4, considerando os parâmetros biológicos do *R.(B.) microplus* nos grupos testados, foi de 52,72% e 72,40%, respectivamente.
- Os resultados encontrados corroboram com encontrados por Pimentel, 2002 e Portela, 2000.
- Os peptídeos recombinantes utilizados neste estudo são potenciais antígenos vacinais para uso no controle do *R.(B.) microplus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN S, CLARE FB, MCGILL TW, SONENSHINE DE. Passage of host serum components, including antibody, across the digestive tract of *Dermacentor variabilis* (Say). *J Parasitol.* Oct; 67(5):737-40. 1985.

AGUIRRE, J., SOBRINO, L., SANTAMARIA, M., ABURTO, S., ROMAN, E., HERNANDEZ, M., ORTIZ, M. & ORTIZ, Y. A. Resistencia de garrapatas en Mexico. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, 1986, México. *Anais...* Cuernavaca, Morelos: Editora Cavazzani, 1986, p. 282–306.

ALLEN, J.R. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. *Experimental Applied Acarology*, v.7, n .1, p. 5-13, 1989.

AGUIRRE, D. H., VINˆ ABAL, A. E., SALATIN, A. O., CAFRUNE, M.M., VOLPOGNI, M.M., MANGOLD, A. J. & GUGLIEMONE, A. A. Susceptibility to two pyrethroids in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) populations in northwest Argentina: Preliminary Results. *Veterinary Parasitology* v88, p. 329–334, 2000.

ALLEN J, KHALIL H & WIKEL S. Langerhans cells trap tick salivary antigens in tick-resistant guinea pigs. *J Immunology*, p. 122: 563, 1979

ALMAZAN C, KOCAN KM, BLOUIN EF & DE LA FUENTE J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*, 2005; in press.

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

ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K. C.; SASAKI, S. D.; SAMPAIO, C. A. M.; TANAKA, A. S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *Internacional Immunopharmacology*, Amsterdam, v. 2, p. 557-563, 2002.

ANDREOTTI, R. A synthetic bmti n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen Trial. *Experimental Parasitology*, v. 116, p. 66-70, 2007.

ARTECHE, C. C. P.; ARTECHE, A. C. M. Vacina, o fim da tristeza parasitária bovina. *A hora veterinária*, ano 23, n. 137, p. 39-41, 2004.

BABIUK, L. A. Vaccination: a management tool in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, v. 164, p.188±201, 2002.

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

BARKER, S.C.; MURREL, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. *Experimental and Applied Acarology*, v. 28, p.55-68, 2002.

BARKER SC, MURRELL A: Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, v. 129, p. S15-S36, 2004.

BENAVIDES, E., RODRI'GUEZ, J. L. & ROMERO, A.. Isolation and partial characterization of the Montecitos strain of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1877) multi-resistant to different acaricides. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, p. 668–671, 2000.

BONA, C. A., CASARES, S., BRUMEANU, T., D. Towards development of T-cell vaccines. *Immunol. Today*, v. 19, n. 3, p. 126-132, 1998.

BULL, M. S., SWINDALE, S., OVEREND, D. & HESS, E. A. Suppression of *Boophilus microplus* populations with fluazuron – an acarine growth regulator. *Australian Veterinary Journal*, v. 74, p. 468–470, 1996.

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

CANALES, A. M., ENRÍQUEZ, E. RAMOS, D. CABRERA, H. DANDIE, A. SOTO, V. FALCÓN, M. RODRÍGUEZ AND J. DE LA FUENTE, Large scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. *Vaccine*, n. 15 1997.

CANALES, M.; ALMAZÁN, 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 Biotechnology*, p1-8. 2009.

CASTRO-JANER, E.; MARTINS, J.R.; MENDES, M. C.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G.M.; SCHUMAKER. Diagnóstico de cepas de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* resistentes a fipronil usando bioensaio em larvas. *Veterinary Parasitology*, v. 173, p. 300-306, 2010.

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

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M., Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Fems Microbiology Reviews*, v. 24, n. 1. P. 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.

CHOU, P. Y., FASMAN, G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from

their amino acid sequence. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, v.47, p. 45- 148, 1978.

COBON, G., 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.

COBBETT, N. G. (Preliminary tests in Mexico with DDT, cube hexachlorocyclohexane (Benzene hexachloride), and combinations thereof, for the control of the cattle fever tick, *Boophilus annulatus*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 8, p. 280–283, 1947.

CORONADO, A.. Current status of the tropical cattle tick, *Boophilus microplus* in Venezuela. In Resistencia y Control en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria, In: III Seminario Internacional Parasitologia Animal, 1995, Acapulco, Guerrero, Mexico, ed. Rodriquez, S. & Fragoso, H., pp. 22–29.

COS, ORIOL,. A Simple Model-Based Control for *Pichia pastoris* Allows a More Efficient Heterologous Protein Production Bioprocess. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 95, n. 1, p. 145-154, 2006.

CRUZ, A.P.R. Resposta immune humoral de bovinos infestados experimentalmente contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 2008. 66 p. *Dissertação (Mestrado)*. Rio Grande do Sul; PUCRS, 2008.

CUNHA, A. E., Methanol Induction Optimization for scFv Antibody Fragment Production in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 86, n. 4, 2004.

DA SILVA VAZ JR., I. *et al.* Immunization of bovinos with na aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 66, p. 331-341, 1998.

DA SILVA VAZ JR., I., et al. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Veterinary Parasitology*, v. 62, n. 1-2, p. 155-160, 1996.

DA SILVA VAZ JR., OZAKI, L. S., AND MASUDA, A. Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissues. *Veterinary Parasitology*, v. 52, p. 71-78, 1994.

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

DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*: a 22 useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, v. 18, p. 119-138, 2005.

DAMASCENO, LEONARDO M. *et al.* An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. 2004, v. 37, p. 18–26, 2004.

D'ANJOU, MARC C. AND DAUGULIS, ANDREW J., Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 341– 346, 2000.

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

DE CASTRO, J. J.. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary Parasitology*, v. 71, p. 77–97, 1997.

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, RODRIGUEZ M, REDONDO M *et al.* Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac (TM) against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine*, v. 16, p. 366–373, 1998.

DE LA FUENTE J, KOCAN KM: Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Rev Vaccines*, v. 2, p.583-593, 2003.

DE LA FUENTE, J.; NARANJO, V.; RUIZ-FONS, F.; VICENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; ALMAZAN, C.; KOCAN, K, M.; MARTÍN, M. P.; GORTAZAR, C.; Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (acari: Ixodidae) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *Eur J Wildl Res.* V.50, p.187-196, 2004.

DE LA FUENTE J, KOCAN KM: Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol*, v. 28, p. 275-283, 2006.

EISEMANN CH E BINNINGTON KC. The peritrophiv membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. *International Journal for Parasitology*, v. 24, p. 15-26, 1994.

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

FERREIRA CA, BARBOSA MC, SILVEIRA TC, VALENZUELA JG, VAZ IDA S JR & MASUDA A. cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. *Parasitology*, v. 125, p. 265–274, 2002.

FLECHTMANN, C. H. W. Ácaros de importância médico veterinária. 2. ed. São Paulo: Nobel,p. 197 , 1990.

FRAGA, A. B.; ALENCAR, M. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J.N. S. G. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, n. 6, supl. 1, 2003.

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

FREIRE, J. J. Arseno e cloro resistência e emprego de tiofosfato de dietilparanitrofenila (Parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Boletim da diretoria de Produção Animal*, Porto Alegre, v.9, n. 17, p. 3-21, 1953.

FURLONG, J. Carrapato dos bovinos: Conheça bem para controlar melhor. *Circular Técnica Embrapa*, v. 46, 1998.

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 JC, MONTERO C, REDONDO M. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*, v. 18, p. 2275–2287, 2000.

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

GEORGE, J.E.; POUND, J.M.; DAVEY, R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, v. 129, p. S353-S366, 2004.

GONZALES JC. O controle do carrapato do boi. 2ed. Porto Alegre. Edição do Autor, 1995.

GONZALES LOMBANA, C. Resposta immune de bovinos vacinados com peptídeo sintético SBm7462 com vistas ao controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). 2003. 77 p. Dissertação (mestrado). UFV, Viçosa, 2003.

GRAF, J.F.; GOGOLEWSKI, R.; LEACH-BING, N.; SABATINI, G.A; MOLENTO, M.B.; BORDIN, E. L.; ARANTES, G.J. Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, v. 129, p.S427-S442, 2004.

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

GUDDERRA NP, SONENSHINE DE, APPERSON CS, ROE RM. Hemolymph proteins in ticks. *J Insect Physiology*, v. 48, n. 3, p. 269-278, 2002.

GINSBERG, H.S. Integrated pest management and allocation of control efforts for vector-borne diseases. *Journal of Vector Ecology*, v. 26, p. 32-38, 2001.

HELLWIG, STEPHAN, Analysis of Single-Chain Antibody Production in *Pichia pastoris* Using On-Line Methanol Control in Fed-Batch and Mixed-Feed Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 74, n. 4, p. 344-352, 2001.

HERNÁNDEZ, C.M., MASSARD, C. L., SOARES, C. O., FONSECA, A. H. Alterações histológicas do trato digestivo de *Boophilus microplus* pela ação de anticorpos anti rBm 86. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 6, n. 1, p. 33-37, 1997.

HOOGSTRAAL H, WASSEF HY. Dermacentor (Indocentor) atrosignatus (Acari: Ixodoidea: Ixodidae): hosts and distribution in the Malay Peninsula, Indonesia, Borneo, and southern Philippines. *J Med Entomol.*, v. 27; n. 6, p. 644-647, 1985.

- HOOP, T. P., WOODS, K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.78, n.6, p.3824-3828, 1981.
- HORAK, I.G.; CAMICAS, J.L.; KEIRANS, J.E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari:Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental and Applied Acarology*, v. 28, p. 27-54, 2002.
- HORN, S. C., ARTECHE, C. C. P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. *A Hora Vet.*, v.4, n.1, p.12-32, 1985.
- HUGHES A. L., YEAGER M. Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annu Rev Genet*, v. 32, p.415-435, 1998.
- HUNGEFORD, J., PULGA, M., ZWITSCH, E. Efficacy of TickGard in Brazil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, Proceedings..., Acapulco, p. 139., 1995.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Acesso em: www.ibge.gov.br. 17/04/2011.
- IMAMURA S, DA SILVA VAZ JR I, SUGINO M, OHASHI K & ONUMA M. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*, v. 23, p. 1301–1311, 2005.
- JANA, S.; DEB, J.K., Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.67, n.3. p. 289-298, 2005.
- JACKSON, L.A., OPDEBEECK, J.P. Quil A and ISCOMs as adjuvants for midgut membrane antigens of *Boophilus microplus*. *Appl. Parasitology.*, v.35, n.2, p.87-98, 1994.

JASINKAS, A.; JAWORSKI, D.C.; BARBOUR, A.G. *Amblyomma americanum*: specific uptake of immunoglobulins into tick hemolymph during feeding. *Exp Parasitology*, v. 96, n. 4, p. 213-221, 2000.

JONGEJAN, F.; UILEMBERG, G. The global importance of ticks. *Parasitology*, v.129, S3-S14, 2004.

JONSSON, N.N., MATSCHOSS, A.L., PEPPER, P., GREEN, P.E., ALBRECHT, M.S., HUNGERFORD, J., ANSELL, J. Evaluation of TickGARDPLUS, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Veterinary Parasitology*. v. 88, p.275-285, 2000b.

JONSSON, N.N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattles and their crosses *Veterinary Parasitology*, v. 137, p. 1-10, 2006.

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

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

KUNZ, S. E. & KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: Resistance and environmental impact. *Revue scientifique et technique Office International des Epizooties*, v. 13, p. 1249–1286, 1994.

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

LABRUNA, M. B., LEITE, R. C. Vacinas contra carrapatos. *Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG*, v. 27, p. 27-42, 1999.

LAMBERTI, J.A. SIGNORINI, C. MATTOS *et al.*, Evaluation of the recombinant vaccine against *Boophilus microplus* in grazing cattle in Argentina. In: J. de la Fuente, Editor, *Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick*, *Elfos Scientiae*, La Habana, Cuba (1995), p. 205–227, 1995.

LARREGINA AT & FALO LD. Changing paradigms in cutaneous immunology: adapting with dendritic cells. *J Invest Dermatol*, v. 124, p. 1-12, 2005.

LOGULLO, C.; DA SILVA VAZ JR., I.; SORGINE, M.H.F.; PAIVASILVA, G.O.; FARIA, F.S.; ZINGALI, R.; ROSA DE LIMA, M.; ABREU, L., OLIVEIRA, E.F.; ALVES, E.W.; MASUDA, H.; GONZALES, J.C.; MASUDA, A. and OLIVEIRA, P.L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*, v. 116, p. 525- 532, 1998.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M.; Heterologous protein production using the *Pischia pastoris* expression system. *Yeast*, v. 22, n. 4. P. 249-270, 2005.

MARTINS, J. R.; CERESÉR, V. H.; CORRÊA, B. L.; ARTECHE, C.C. O controle correto do carrapato. Porto Alegre: FEPAGRO; Secretaria da Ciência e Tecnologia, 8 p. (Circular técnica, 5), 1995.

MARTINS, J. R. & FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *The Veterinary Record*, v. 14 ,n. 64, 2001.

MARTINS, J. R.; LEITE, R. C.; FURLONG, J. First evaluation of doramectin against a strain of the cattle tick *Boophilus microplus* with characteristic of resistance to macrocyclic lactones in the field. In.: V INTERNATIONAL SEMINAR IN ANIMAL PARASITOLOGY. Anais... Mérida, Yucatan, México 1 – 3 October, 2003..

MASSARD, C. L., FONSECA, A. H., BITTENCOURT, V. R. E. P., SILVA, K. M. M. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm86 “GAVAC™” contra o carrapato *B. microplus* no Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.17, n.4, p.167-173, 1995.

MAUNDER, J. C. J. Cattle tick control: Results achieved in the field with DDT and BHC. *Queensland Agricultural Journal September*, p. 1–8, 1949.

MCKENNA RV, RIDING GA, JARMEY JM, PEARSON RD & WILLADSEN P. Vaccination of cattle against the *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. *Parasite Immunology*, v. 20, p. 325–336, 1998.

MCDUGALL, K.W. & MACHIN, M. V. Stabilization of the carbamate acaricide promacyl in cattle dipping fluid. *Pesticide Science*, v. 22, p. 307–315, 1988.

MONTAÑO, J. A. B. Avaliação dos peptídeos sintéticos SBbo23290 e SBm7462 na forma monovalente e polivalente em bovinos desafiados com *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (CANESTRINI, 1887) E *Babesia bovis* (BABES, 1888; STARCOVICI, 1888). Resposta humoral, parâmetros clínicos e biológicos. 2006. 60 p. Dissertação (mestrado). UFV: Viçosa, 2006

MONTEIRO, A.C.; FIORIN, A.C. and CORREIA, A.C.B. Pathogenicity of isolates of *Metharhizium anisopliae* (mestch.) sorokin towards the cattle *Boophilus microplus* (can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Rev. Microbiology*, v. 29, n. 2, p. 109-112, 1998.

MYUNG-JO Y. Immunization of mice with recombinant P27/30 protein confers protection against hard tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) infestation. *J Vet Sci*, v. 6, p. 47– 51, 2005.

MUNCUOGLU, K. Y., RAHAMIM, E., BEM-YAKIR, D., et al., 1996. *J. Med. Entomol.*, v.33, n. 1, p. 74-77.

NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Veterinary Parasitology*, v. 57, p. 153-65, 1995.

NORRIS, K. R. & STONE, B. F. Toxaphene-resistant cattle ticks (*Boophilus microplus* (Canestrini)) occurring in Queensland. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.7, 211–226, 1956.

NUÑES, J. L.; MUÑOZ COBENAS, M. E.; MOLTEDO, H. L. *Boophilus microplus*, la garrapata comun del ganado vacuno. Buenos Aires: *Hemisfério Sur*, p.19, 1982.

NUTTAL, G. H. F. Symptoms following tick-bites in man. *Parasitology*, v.4, p.89-93, 1911.

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.

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

OLWOCH JM, VAN JAARSVELD AS, SCHOLTZ CH, HORAK IG: Climate change and the genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae) in Africa. *Onderstepoort J Vet Res*, v. p. 74:45-72, 2007.

OPDEBEECK, J. P., WONG, J. Y. M., JACKSON, L. A., DOBSON, C. Vaccines to protect Hereford cattle against the tick, *Boophilus microplus*. *Immunol.*, v.63, n.3, p.363-367, 1988.

ORTIZ, E.M., SANTAMARIA, E.M. & FRAGOSO, S. H.. Resistencia em garrapatas *Boophilus microplus*, a los ixodicidas en Mexico. In XIV Pan American Congress on Veterinary Sciences, Proceedings (ed. Pere´z Trujillo, J. M. & Gonzales Padilla, E.), pp. 473–474. Acapulco, Guerrero, Mexico, 1994.

PATARROYO, J. H.; PORTELA, R. W.; CASTRO, R. O.; PIMENTEL, J. C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; VARGAS, M. I.; PRATES, A. A.; MENDES, M. A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 25, p. 163-167, 2002.

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

PATARROYO, J. H., VARGAS, M. I. Fatores de resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. P. 9, 1982.

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

PEREIRA, M. C. *Boophilus microplus* – revisão taxionômica e morfo-biológica. Rio de Janeiro: Químico Divisão Veterinária, 1982.

PETER RJ, BOSSCHE P VAN DEN, PENZHORN BL, SHARP B: Tick, fly, and mosquito control-Lessons from the past, solutions for the future. *Vet Parasitol*, v. 132, n. 205-215, 2005.

PIMENTEL, J.C. *A vacina sintética SBm7462 no controle do carrapato Boophilus microplus (Canestrini, 1887) em animais estabulados e a campo*. 2002. 78f .Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

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

POWELL, R.T.; REID, T.J. Project tick control. Queensland Agricultural journal, Brisbane, v.108, n.6, p.279-300, 1982.

PRUETT JH. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. *International J Parasitology*. v. 29, p. 25-32, 1999.

RAND, K.N., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, k., Tellam, R., Willadsen, P., Cobon, G.S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, p. 9657-9661, 1989.

RICHARDSON, M.A., SMITH, D.R.J.; KEMP, D. H., TELLAM, R.L. Native and baculovirus-expressed forms of the immune-protective protein Bm86 from *Boophilus microplus* are anchored to the cell membrane by a glycolysilphosphatidyl inositol linkage. *Insect Molecular Biology*, v. 1, p. 139-147, 1993.

RIDLES, P. W., NOLAN, J. Prospects for the managment of arthropod resistance to pesticides. In: INERNATIONAL CONGRESS OF PARASITOLOGY, Proceedings... , Camberra, p. 679-687, 1986.

RODRIGUEZ, M., RUBIERA, R., PENICHET, M.L., MONSTESINOS, R., CREMATA, J., FALCON, V., SÁNCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOVÉS, C., VALDÉS, M., LIEONART, R., HERRERA, L., DE LA FUENTE, J. High expression of the *Boophilus microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *Journal de Biotechnology*, v. 33, p. 135-146, 1994.

RODRIGUEZ, M., MASSARD, C. L., FONSECA, A. H., RAMOS, N. F., MACHADO, H., LABARTA, V. DE LA FUENTE, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm 86 antigen preparation on natural infestation of *B. microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. *Vaccine* , v.13, n.18, p.1804-1808, 1995.

RODRIGUEZ, M.; PENICHER, M. L.; MOURIS, A. E.; LABARTA, V.; LORENZO LUACES, L.; RUBIERA, R.; CORDOVES, C.; SANCHEZ, P. A.; RAMOS, E.; SOTO, A. Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 57, p. 339-349, 1995b.

RODRIGUEZ, M., RUBIERA, R., PENICHER, M., MONTESINOS, R., CREMATA, J., FALCON, V., SANCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOVÉS, C., VALDES, M., LEONART, R., HERRERA, L., DE LA FUENTE, J. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J. Biothec.*, v.33, n.2, p.135-146, 1994.

ROMERO, A., BENAVIDES, E., HERRERA, C. & PARRA, M. H.. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a acaricides organofosforados y piretroides sintéticos em el departamento del Huila. *Revista Colombiana de Entomologia*, v. 23, p. 9–17, 1997.

ROULSTON, W. J., H. J. SCHNITZERLING, C. A. SCHUNTNER, AND J. T. WILSON. Acetylcholinesterase insensitivity in the Biarra strain of the cattle tick *Boophilus microplus*, as a cause of resistance to organophosphorus and carbamate acaricides. *Aust. J. Biol. Sci.*, v. 21, p.759-767, 1968.

SALES JUNIOR, P.; GUZMAN, F.; VARGAS, M.I.; SOSSAI, S.; PATARROYO, A. M.; LOMBANA, C.Z.G.; PATARROYO, J. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm7462. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 107, n. 3, p. 281- 290, 2005.

SEIFERT GW, SPRINGELL PH, TACHELL RJ. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs, and adult of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*, v. 58, p. 415-30, 1968.

SHARP, P.J., MCINERNEY, B. V., SMITH, D. R.,TURNBULL, L. F., KEMP,D. H., RAND, K. N., COBON, G. S. Chromatography and generation specific antisera to

synthetic peptides from a protective *B. microplus* antigen. *J. Chromatogr.*, v. 512: p. 189-202, 1990.

SHAW, R. D. Tick control on domestic animals (ii) The effect of modern treatment methods. *Tropical Science*, v. 12, p. 29–36, 1970.

SIGNORINI, A. R. Avances en la campaña de erradicación de la garrapata *Boophilus microplus* en la Argentina. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*, v. 22, p. 183–188, 1991.

SILVA, M. C. L.; NEVES SOBRINHO, R.; LINHARES, G. F. C. Avaliação *in vitro* da eficácia do clorfenvinfós e da cialotrina sobre o *Boophilus microplus*, colhidos em bovinos da bacia leiteira da microrregião de Goiânia – Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, v. 2 p. 143 – 148, 2000.

SOBERANES, N., SANTAMARIA, M., FRAGOSO, H. & GARCIA, Z. Primer caso de resistencia al amitraz em garrapata del Ganado *Boophilus microplus* en México. *Técnica Pecuaria en México*, v. 40, p. 81–92, 2002.

SOLOMON, K.R. Acaricide resistance in ticks. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, v. 27, p. 273-296, 1983.

SONENSHINE, D. Biology of Ticks . v. 1. *New York: Oxford University Press.*, v. 1, p. 447, 1991a.

SPARKS, T.C., KIRST, H.A., MYNDERSE, J.S., THOMPSON, G.D., TURNER, J.R., JANTZ, O.K., HERTLEIN, M.B., LARSON, L.L., BAKER, P.J., BROUGHTON, M.C. Chemistry and biology of the spinosyns: components of spinosad (Tracer), the first entry into DowElanco's naturlyte class of insect control products. In: Dugger, P., Richter, D.A. (Eds.), Proceedings of the 1996 Beltwide Cotton Conf., Natl. Cotton Council, Nashville, TN, 9–12 January, p. 844–846, 1996.

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 p, 1983.

STEAR, M. J., NICHOLAS, F. W., BROWN, S. C. Class I antigens of the bovine major histocompatibility system and resistance to the cattle tick *Boophilus microplus* assessed in three different seasons. *Vet. Parasitol.*, v. 31, p. 303-315, 1989.

STRYDOM, T. & PETER, R. Acaricides and *Boophilus* spp. Resistance in South Africa. In Control de La Resistencia en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria y Enfermedades que transmiten, IV Seminario Internacional de Parasitología Animal (ed. Morales, G., Fragosa, H. & Garcia, Z.), pp. 35–40. Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico, 1999.

STONE, B. F. & MEYERS, R. A. J. Dieldrin-resistant cattle ticks, *Boophilus microplus* (Canestrini), in Queensland. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 8, p. 312–317, 1957.

SUGINO M, IMAMURA S, MULENGA A *et al.* A serine proteinase inhibitor (serpin) from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning, and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine*, v. 21, p. 2844–2851, 2003.

SUTHERST, R. W.; KERR, J. D.; MAYWALD, G. F.; STEGEMAN, D. A. The effect of season and nutrition on the resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus*. *Journal of Agricultural Research, Washington*, v. 34, p. 329-339, 1983.

TAYLOR, M.A. Recent Developments in Ectoparasiticides. *Veterinary Journal*, v. 161, n. 3, p. 253-268, 2001.

TELLAM RL, SMITH D, KEMP DH & WILLADSEN P. Vaccination against ticks. In *Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology*, ed. Yong WK. Boca Raton: CRC Press; v. 303, 1992.

TELLAM RL, KEMP D, RIDING G *et al.* Reduced oviposition of *B. microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Vet Parasitology*, v. 103, p. 141–156, 2002.

THOMPSON, G.D., BUSACCA, J.D., JANTZ, O.K., KIRST, H.A., LARSON, L.L., SPARKS, T.C. Spinosyns: an overview of new natural insect management systems. In: Richter, D.A., Armour, J. (Eds.), Proceedings of the 1995 Beltwide Cotton Conf., *Natl. Cotton Council, Memphis, TN*, p. 1039–1043, 1995b.

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

TRAGER, W. Acquired immunity to ticks. *J. Parasitol.*, v.25, n.1, p. 57-81, 1939.

TRIGUERO, AL, BLANCO, R., MACHADO, H., RODRIGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. Development of enzyme linked immunosorbent assays to measure Bm86 antigen of *Boophilus microplus* (cattle tick) and to detect anti-Bm86 antibodies in serum samples. *Biotechnology techniques*, v.13, p. 119-125, 1999.

TSCHOPP. J. F.; BRUST, P. F.; CREGG, J. M.; STILLMAN, C. A.; GINGERAS, T. R., Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research*, v. 15, n.9, p. 3859-3876, 1987

TURNBULL, I.F.; SMITH, D.R.J., SHARP, P.J., COBON, G.S., HYNES, M.J. Expression and secretion in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger* of a cell surface glycoprotein from the cattle tick, *Boophilus microplus*, by using the fungal amdS promoter system. *Applied and Environment Microbiology*, v. 56, p. 2847-2852, 1990.

VALLE, M. R., MONTERO, C., MACHADO, H., JOGLAR, M. The evaluation of yeast derivatives as adjuvants for the immune response to the Bm86 antigen in cattle. *BMC Biotechnology*, v. 1, p. 2, 2001.

VANEGAS, L. F., S.A. PARRA, C.G. VANEGAS AND J. DE LA FUENTE, Commercialization of the recombinant vaccine Gavac™ against *Boophilus microplus* in

Colombia. In: J. de la Fuente, Editor, *Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick*, Elfos Scientiae, La Habana, Cuba, pp. 196–199, 1995.

VAUGHAN JA, AZAD AF. Passage of host immunoglobulin G from blood meal into hemolymph of selected mosquito species (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, v. 25, n. 6, p.472-474, 1988.

VAZ JR., I.S.; MARTINEZ, R.H.; OLIVEIRA, A.; HECK, A.; LOOGULLO, C.; GONZALES, J.C.; DEWES, H.; MASUDA, A. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet Parasitol*, v.62, p.155-60, 1996.

VERCCRUYSSSE, J.; KNOX, D.P.; SCHETTERS, T.P.M.; WILLADSEN, P. veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *TRENDS in Parasitology*, v. 20, n. 10, p. 288-492, 2004.

VIDOTTO, O. Estratégias de Combate aos principais parasitas que afetam os bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, Maringá/PR, 2002. Anais do Sul - Leite. *NUPEL*, p. 192-212, 2002.

WANG, H.; NUTTALL, P .A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* v. 109, p 525-530, 1994.

WARE, G.W.. *The Pesticide Book*, 5th edn. Thomson Publications, Fresno, California, 2000.

WEBSTER, K. A.; RANKIN, M.; GODDARD, N. *Vet. Parasitology*, v. 44, n. 12, p. 143-150, 1992.

WEISS BL & KAUFMAN WR. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 101, p.5874–5879, 2004.

WEST, S.D. Determination of the naturally derived insect control agent spinosad in cottonseed and processed commodities by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.*, v. 44, p. 3170–3177, 1996.

WHARTON, R. H.. Tick-borne livestock diseases and their vectors. 5. Acaricide resistance and alternative methods of tick control. *World Animal Review*, v. 20, p. 8–15, 1976.

WHITNALL, A. B.M., MCHARDY, W.M., WHITEHEAD, G. B. & MEERHOLZ, F. Some observations on the control of the bont tick, *Amblyomma hebraeum* Koch. *Bulletin of Entomological Research*, v. 41, p. 577–591, 1951.

WIKEL, S. K., RAMACHANDRA, R. N., BERGMAN, D.K. Tick-induced modulation of the host immune response. *International Journal for Parasitology*, v. 24, n. 1, p. 59-66, 1994.

WIKEL SK. Host immunity to ticks. *Ann Rev Entomol*, v. 41, p. 1-22, 1996.

WIKEL, S. K. Tick Modulation of Host Cytokines. *Experimental Parasitology*, v. 84, p. 304-309, 1996.

WIKEL, S. K.; BERGMAN, D. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*, v. 13, p. 383-389, 1997.

WILLADSEN, P. Immunological approaches to the control of ticks. *International Journal for Parasitology*, v. 17, p. 671-677, 1987.

WILLADSEN P, KEMP DH. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. *Parasitol Today*, v. 4, n. 7, p. 196-198, 1988.

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 parasite arthropod, identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *Immunology*, v.143, n. 4, p. 1346-1351, 1989.

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

WILLADSEN P, BIRD P, COBON GS & HUNGERFORD J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, v.110, p.43–50, 1995.

WILLADSEN P, SMITH D, COBON G & MCKENNA RV. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol*, v. 18, p. 241–246, 1996.

WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. Immunology of the Tick-Host Interaction and the control of Ticks and Tick-borne Diseases. *Parasitology Today*, v. 15, n. 7, p. 258-262, 1999.

WILLADSEN P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary Parasitology*. v. 101, p. 353-367. 2001.

WILLADSEN P. Anti-tick vaccines. *Parasitol*, v. 129, p. S367–S387, 2004.

WILLADSEN P. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Vet Parasitol.*, v. 138, p.161-168, 2006.

WOODHAN, C.B., GONZALES, O.A., LÓPEZ, L.A. Progress in the eradication of *Boophilus* ticks in Mexico 1960-80. *World Animal Review*, v. 48, p.18-24, 1983.