

DANILLO VELLOSO FERREIRA MURTA

**ESTUDO A CAMPO DA VACINA RECOMBINANTE rSBm 7462 ANTI Rhipicephalus
microplus**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL**

2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M972e
2015 Murta, Danillo Velloso Ferreira, 1982-
Estudo a campo da vacina recombinante rSBm 7462
ANTI *Rhipicephalus microplus* / Danillo Velloso Ferreira
Murta. - Viçosa, MG, 2015.
vii, 69f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador : Marlene Isabel Vargas Vilória.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.58-66.

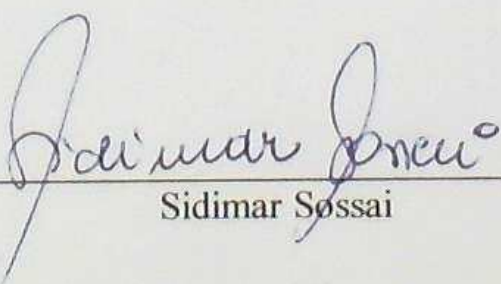
1. Imunologia veterinária. 2. Vacinas. 3. Proteínas recombinantes. 4. Peptídeo. 5. Bovino - Doenças. 6. Carrapato - Controle. 7. *Rhipicephalus microplus*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0896079

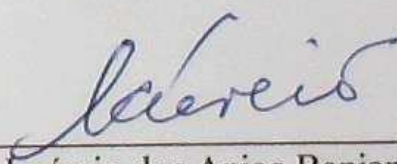
**ESTUDO A CAMPO DA VACINA RECOMBINANTE rSBm7462 ANTI
*Rhipicephalus microplus***

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


APROVADA: 26 de agosto de 2015.



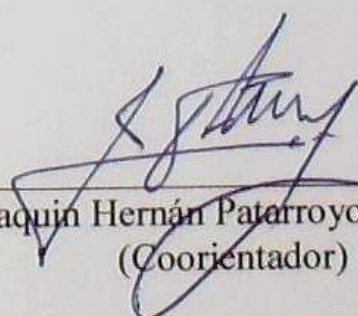
Sidimar Sossai



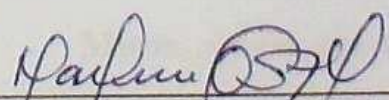
Laércio dos Anjos Benjamin



Gabriel Domingos Carvalho



Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo
(Coorientador)



Marlene Isabel Vargas Vilória
(Orientadora)

**Dedico à minha filha Sophia
Murta, minha grande conquista e presente de DEUS.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à DEUS a quem sempre busquei forças a superar meus obstáculos;

Aos meus pais Vila e Gracia, meu alicerce nos estudos e pela confiança e apoio nesta conquista;

Aos meus amigos Joaquin Patarroyo e Marlene Vargas pelos momentos inesquecíveis vividos nestes 5 anos, ensinamentos, companheirismo e por aceitarem me orientar no decorrer deste trabalho;

À minha irmã Tika e cunhado Alfredo pela amizade e apoio;

À Família Patarroyo, Bebel, Pedrinho, Ana Carolina, Fernando, Adriana, Emerson, Angélica e Conceição, por me receberem sempre com alegria como um membro da família;

Aos amigos Pedro e Sophia por estarem sempre juntos desde o início;

À minha amiga Nena pelas conversas e orientações;

Aos meus alunos e estagiários que se tornaram motivos de inspiração;

À Cia Rural pelo apoio financeiro e fornecer a base estrutural para os trabalhos serem desenvolvidos;

À Dani pelo apoio na reta final.

Sumário

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 A indústria pecuária	3
2.2 Perfil da pecuária leiteira no Brasil	4
2.3 Importância da infestação pelo carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> em rebanhos bovinos.....	6
2.4 O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	6
2.4.1 Efeitos diretos	7
2.4.2 Efeitos indiretos	8
2.4.3 Perdas econômicas relacionadas à infestações por <i>Rhipicephalus microplus</i>	9
2.4.4 Controle químico.....	10
2.4.5 Perfil de sensibilidade a carrapaticidas	14
2.4.6 Controle alternativo	16
2.4.7 Controle imunológico.....	18
2.4.8 Novos candidatos para o controle do <i>Rhipicephalus microplus</i>	20
2.4.8.1 Glutathione S-transferases (GSTs).....	21
2.4.8.2 Cisteína endopeptidase degradadora de vitelina (VTDCE)	22
2.4.8.3 Pró-catepsina de ovo de <i>Rhipicephalus microplus</i> (BYC).....	22
2.4.8.4 Tick Heme-binding Aspartic Protease (THAP)	22
2.4.8.5 RmLCE e BmCL1	23
2.4.8.6 Inibidores da tripsina	23
2.4.8.7 Ferritina 2	24
2.4.8.8 Subolesina	24
2.4.8.9 Alelos regionais da Bm86	25
2.4.9 Antígenos ocultos “concealed antigens”.....	25
2.4.10 Vacinas comerciais vigentes	27
2.4.11 Peptídeo SBm7462	28
2.4.12 Produção do peptídeo recombinante 7462 em <i>Pichia pastoris</i>	29
3. OBJETIVOS	30

3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Local de estudo	31
4.2 Animais Utilizados e Manutenção	31
4.3 O imunógeno.....	32
4.4 Esquema de imunização	33
4.5 Dados meteorológicos	33
4.6 Delineamento experimental.....	33
4.7 Parâmetros de Produtividade na Fazenda	34
4.8 Estudo da Cinética Humoral.....	34
4.8.1 Coleta de Sangue para Sorologia	34
4.8.2 Teste de ELISA para medição da resposta imune Humoral.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Caracterização das propriedades	36
5.2 Dados climáticos	37
5.3 Cinética de anticorpos anti-peptídeo recombinante rSBm7462	39
5.4 Dinâmica populacional e protocolos de imunização	41
Fazenda Barreiro Bonito	41
Fazenda Blumenau.....	43
Fazenda Curral Novo	45
Fazenda Experimental Prof. Hamilton A. Navarro – ICA/UFMG.....	47
Fazenda Santana	49
Fazenda Nova Esperança	51
Fazenda Santa Ingraça	52
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO I	67

RESUMO

MURTA, Danillo Velloso Ferreira Murta, Doctor Scientiae, Universidade Federal de Viçosa, Agosto, 2015. **Estudo a campo da vacina recombinante rSBm 7462 anti Rhipicephalus microplus**. Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilória. Co-orientadores: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo.

Devido à sua capacidade em transmitir diversos agentes infecciosos, os carrapatos são importantes para a saúde pública e para produção animal. Dentre estes, se destaca o carrapato *Rhipicephalus microplus*, responsável por perdas econômicas nos países das regiões tropicais e subtropicais. Entre as medidas de controle deste ectoparasita, o controle imunológico tornou-se uma alternativa promissora, pois não gera populações de carrapatos resistentes e não há risco de resíduos em produtos de origem animal e contaminação ambiental e melhor bem estar animal. Objetivou-se neste estudo, testar a campo o efeito do peptídeo recombinante rSBm 7462 anti *Rhipicephalus microplus*. Avaliaram-se as condições climáticas no período de 2010 a 2014, e a dinâmica populacional do carrapato neste período, dividindo as em duas etapas, antes e após a imunização. O peptídeo recombinante foi aplicado em três doses, com intervalos de 30 dias no ano de 2012, e repetido nos anos seguintes de 2013 e 2014. O efeito do controle de carrapatos com uso do imunógeno sobre a dinâmica populacional, os parâmetros produtivos e reprodutivos dos rebanhos, assim como custo de produção, baseando-se no controle de carrapatos, apresentaram resultados satisfatórios.

ABSTRACT

MURTA, Danillo Velloso Ferreira Murta, Doctor Scientiae, Universidade Federal de Viçosa, August, 2015. **Study the field of recombinant vaccine rSBM 7462 anti Rhipicephalus microplus.** Adviser: Marlene Isabel Vargas Vilória. Co-adviser: Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo.

Due to its ability to transmit various infectious agents, ticks are important to public health and animal production. Among these, it stands out the tick *Rhipicephalus microplus*, responsible for economic losses in the countries of tropical and subtropical regions. Among the control measures of this ectoparasite, the immune control has become a promising alternative because it does not generate resistant tick populations and there is no risk of residues in animal products and environmental contamination and better animal welfare. The aim of this study, test the field the effect of recombinant peptide RSBM 7462 anti *Rhipicephalus microplus*. Evaluated the climate conditions in the period 2010-2014, and population dynamics of the tick will be shown, dividing in two stages, before and after immunization. The recombinant peptide was administered in three doses, 30 days in the year ranges from 2012, and repeated in the following years 2013 and 2014. The effect of tick control with use of the immunogen on population dynamics, productive and reproductive parameters of herds, as well as cost of production, based on the control of ticks, showed satisfactory results.

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos merecem importância tanto para a saúde pública como para a produção animal pela capacidade de transmitir agentes infecciosos. Dentre os artrópodes de maior importância na medicina veterinária, destaca-se o carrapato *Rhipicephalus microplus*, responsável por perdas produtivas e econômicas nos países das regiões tropicais e subtropicais. Ocasiona vários prejuízos ao produtor como custo de mão de obra, despesas com instalações, aquisição de carrapaticidas e de equipamentos.

Segundo os dados da pesquisa de produção pecuária municipal o rebanho brasileiro era de 211,279 milhões de cabeças (IBGE, 2012). E de acordo com os dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o rebanho brasileiro ocupa a segunda posição no ranking mundial, ficando somente atrás da Índia. Embora este país tenha significativa importância na produção de leite, com o abate de bovinos sendo proibido por lei na maioria dos estados. Na sequência, destacam-se os rebanhos da China, dos Estados Unidos da América e da União Europeia. O Brasil ocupa também a segunda posição mundial na produção de carne bovina, sendo os Estados Unidos o maior produtor (USDA, 2012).

Buscando uma forma alternativa para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*, foi desenvolvida a vacina sintética anti *Rhipicephalus microplus* (SBm7462[®]). Esta vacina contém determinantes imunogênicos da proteína intestinal. Quando usada em conjunto com saponina e testada sobre bovinos de várias raças, este imunógeno alcançou eficácia de 81,05%, tendo como parâmetros redução no número e do peso de fêmeas adultas, redução do peso médio dos ovos e diminuição da fertilidade (PATARROYO, et al. 2002).

O avanço das técnicas de biologia molecular providencia ferramentas para compreender muitas questões biológicas, sendo esses métodos aplicados em várias linhas de pesquisa na área de parasitologia veterinária (SANGSTER, 2001).

Para diminuir os empecilhos da síntese química de peptídeos, a produção recombinante do peptídeo rSBm7462[®] por fermentação em leveduras *Pichia pastoris* apresenta-se como uma estratégia promissora para garantir grandes volumes vacinais com baixo custo.

Desta forma, as vacinas recombinantes são consideradas alternativas que contribuem para a solução desses problemas, permitindo reduzir as perdas econômicas na qualidade do leite e da carne, a queda na produção dos animais, o impacto ambiental, a resistência dos

agentes devido a pressão de seleção por parte dos carrapatos, a rejeição de exportações pela presença de resíduos tóxicos, e o mais importante, a preocupação sobre a segurança alimentar.

Em concordância com isso, no presente estudo foram analisados os eventos de controle populacional de carrapatos *Rhipicephalus microplus*, assim como o efeito sobre o número de tratamentos químicos, índices zootécnicos e gastos com carrapaticidas, em bovinos depois de sucessivas imunizações a campo com a vacina recombinante rSBm 7462 anti *Rhipicephalus microplus*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A indústria pecuária

Atualmente o crescimento populacional atinge 7 bilhões de pessoas em todo o mundo e ao padrão de consumo que se eleva em alguns setores da sociedade, conforme a renda do consumidor, tem impulsionado a pecuária a um desenvolvimento acelerado capaz de fornecer alimento de origem confiável, garantindo segurança alimentar à população mundial que está cada vez mais exigente. É necessário aumentar a capacidade produtiva do rebanho nacional para que seja capaz de satisfazer a demanda consumidora. Para isso são necessárias melhorias nas condições de bem estar animal, sanidade e reprodução através de tecnologias.

O Brasil detém o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, em torno de 211.279 milhões de cabeças distribuído em todas as regiões (IBGE, 2012). Atualmente, o Brasil produz 9,4 milhões de toneladas de carne bovina, com 16,5% sendo negociados para dezenas de países em todo o mundo. Na última década, o país registrou crescimento de 400% no valor de suas exportações, atingindo o recorde histórico de US\$5,7 bilhões em faturamento e consolidando a posição de maior exportador mundial de carne bovina. Só no período de janeiro a julho de 2013 o Brasil movimentou uma cifra de US\$ 3,9 bilhões (GRISI et al., 2013), enquanto a produção de leite, colocou o Brasil na sexta posição mundial atrás da União Europeia, Índia, Estados Unidos, China e Rússia (DAIRY, 2011).

Embora ainda apresentem alguns obstáculos na produção animal, os parasitas são importantes causas de injúrias aos rebanhos e responsáveis por perdas da produtividade, além da transmissão de patógenos causadores de diversas enfermidades para os animais e também para o homem. Entre estes parasitas, o carrapato é o segundo vetor mais importantes de enfermidades em humanos depois dos mosquitos (DE LA FUENTE et al., 2007). Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), os carrapatos causam prejuízos que ultrapassam US\$3,9 bilhões de dólares anuais devido à infestação e transmissão de doenças. É estimado que cada teleógina seja responsável pela queda de 8,9 mL da produção diária de leite e de 1,0 g de peso corporal (GRISI et al., 2013).

Por isso, a aplicação dos avanços biotecnológicos para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e produção de vacinas conseguem prevenir e controlar enfermidades geradas por vírus, bactérias, fungos e parasitas, agentes etiológicos de prejuízos milionários que comprometem seriamente a economia do setor pecuário.

2.2 Perfil da pecuária leiteira no Brasil

A cadeia agroindustrial do leite sofreu profundas transformações a partir da década de 1990, as quais foram induzidas pela desregulamentação do mercado, política de abertura comercial, formalização do Mercosul, estabilidade macroeconômica, nova estrutura de produção e comercialização, e também pelo crescente poder e discernimento do mercado consumidor, cada vez mais segmentado e exigente em qualidade, preços e variedade de produtos (LEITE e GOMES, 2001; ZOCCAL, 2001). Como consequência destes fatores, surgiu o aumento da concorrência em todos os elos da cadeia produtiva do leite, que tem forçado a implementação de novas estratégias, visando obter ganhos de competitividade. Assim, nota-se um conflito entre os produtores, que vivem em um ambiente competitivo, a indústria de laticínios e os fornecedores de insumos, máquinas e equipamentos, além da oferta de produtos lácteos importados (SOUZA, 2000; ZOCCAL, 2001).

Dessa forma, planejamentos estratégicos e estruturais promovidos pela indústria láctea têm pressionado o segmento da produção primária por qualidade e custos mais baixos, o que implica na elevação do nível tecnológico dos sistemas de produção. Por ser o elo mais frágil da cadeia, o setor produtivo tem sofrido mais intensamente as consequências das novas exigências do mercado (ALENCAR et al., 2001).

No sistema agroindustrial do leite, situações de mercado típicas de concorrência imperfeita, conduzem os produtores rurais a disporem de poucos recursos para negociarem seus interesses no interior da cadeia produtiva do leite, inclusive à menor capacidade de negociação de preços. Com o propósito de se adaptar à nova realidade, os produtores têm procurado adotar práticas que efetivamente reduzam o custo de produção, o que, invariavelmente, requerem aumentos de produtividade e de escala (PINDYCK e RUBINFELD, 2002; REIS, 2002). Portanto, para produzir leite a baixo custo, mantendo-se a qualidade, requer a gestão eficiente do empreendimento, implicando na adoção de controles zootécnicos, sanitários, administrativos e econômicos.

A produção de leite está presente em todos os estados brasileiros. Na maioria deles apresenta grande expressão econômica, sendo que o Estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional, contribuindo com aproximadamente 30% da produção do país (IBGE, 2013). A atividade leiteira em Minas Gerais é praticada em todos os municípios, com predominância de pequenas propriedades (MARCATTI NETO et al., 2007).

Líder na produção de leite no Brasil, Minas Gerais concentra também cerca de 45% da produção de derivados e emprega cerca de 360.000 pessoas na atividade leiteira (NUNES, 1999). Esses dados destacam a importância econômica e social do complexo agroindustrial do

leite para o estado. No período de 2002 a 2011, o volume de leite produzido em Minas Gerais cresceu a uma taxa de 4% ao ano, passando de 6.177.356 mil para 8.756.114 mil litros. No rebanho mineiro predomina o mestiço, com predominância do sangue de raças zebuínas sobre o holandês (MARCATTI NETO, et al., 2007). Esses fatores são as causas da baixa produtividade do rebanho e da perda de rentabilidade da atividade leiteira. A produção leiteira caracteriza-se pelo grande número de produtores e pela diversidade em termos de tamanho e nível de tecnologia adotado.

Pesquisa realizada em propriedades na região sul de Minas Gerais, mostrou a produção média de 459,38 litros/dia, com média de 9,72 litros/animal/dia. Os custos fixos representaram 23,55% do custo final de produção da atividade leiteira e os custos variáveis representaram 76,45%. A maior participação dos custos fixos ficou com o fluxo de serviços de máquinas e equipamentos (5,77%), seguidos por benfeitorias (5,02%). Entre os custos variáveis, os gastos com alimentação representaram 45,83% e os serviços de mão-de obra atingiram 15,51% do custo final de produção da exploração leiteira. Entre os produtos veterinários, com 3,81% do custo final de produção da atividade leiteira, não foi possível identificar precisamente os principais itens que mais oneraram a produção de leite. Isto é devido à falta de controle gerencial dos produtores pesquisados, como a compra de antibióticos, bernicidas, carrapaticidas, material de inseminação, vacinas, vermífugos, etc.

Considerando que os produtores de leite estão em um segmento competitivo, ao contrário da indústria compradora que tem capacidade de impor os preços, os pecuaristas necessitam administrar os fatores produtivos que estão sob seu controle, que é a estratégia de reduzir os seus custos de produção. O aumento da eficiência produtiva é fator decisivo para a competitividade do setor primário, passando, sem dúvida, pelo gerenciamento de custos da organização de produção (REIS et. al., 2002).

A baixa produtividade da pecuária leiteira em Minas Gerais e os elevados custos de produção evidenciam a necessidade de se modernizar e profissionalizar a administração do empreendimento, com vistas à melhor alocação e combinação dos recursos produtivos. Além disso, é necessário que a tecnologia disponível seja plenamente compreendida e utilizada de forma eficiente, garantindo a alimentação e o manejo adequados do rebanho, assim como o uso da capacidade máxima instalada e a obtenção de uma melhor rentabilidade na atividade leiteira (FASSIO et. al., 2006).

2.3 Importância da infestação pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* em rebanhos bovinos

A infestação pelo carrapato (*Rhipicephalus microplus*) afeta a produtividade dos animais, sendo responsável por gerar perdas diretas e indiretas, como redução da produção de leite e do ganho de peso e transmissão de patógenos. Na Austrália, muitos estudos têm sido implementados ao longo dos últimos 50 anos para medir este efeito. O principal objetivo desses estudos é fornecer dados para definir os danos e perdas gerados pelos efeitos espoliativos dos carrapatos nas diferentes condições ambientais e graus de sangue das raças bovinas. A maioria dos estudos concentrou-se no peso corporal e doenças transmitidas por carrapatos considerando a mortalidade e danos diretos resultantes da infestação (JONSSON, 1996).

Rebanhos puros *Bos taurus taurus* apresentam maior sensibilidade às infestações por carrapatos, sendo que a substituição por rebanhos com diversos graus de sangue zebuino garantem menores níveis de infestações e, conseqüentemente, menores gastos com acaricidas. Programas estratégicos têm sido recomendados por agências governamentais para o controle de carrapatos, baseando-se em aplicações de acaricidas na primavera, quando a proporção de carrapatos na fase parasitária é alta. Isto resulta num forte efeito sobre o tamanho das gerações subsequentes (JONSSON & MATSCHOSS, 1998).

2.4 O carrapato *Rhipicephalus microplus*

Os carrapatos são artrópodes hematófagos pertencentes à Classe Arachnida, Ordem Ixodidae e Subordem Acari. Existem aproximadamente 870 espécies de carrapatos descritas no mundo inteiro, as quais são divididas em três famílias: Ixodidae (carrapatos duros), que incluem 685 espécies; Argasidae (carrapatos moles), contando 185 espécies; e a terceira família, a Nuttalliellidae, a qual consiste em espécies diferenciadas que apresentam características entre a Ixodidae e a Argasidae (ICTTD 2004). A família Ixodidae está caracterizada pela presença de placas quitinosas no seu corpo e são divididas em 14 gêneros (ICTTD 2004). Análises filogenéticas recentes usando métodos moleculares e caracterização morfológica localizaram as 5 espécies do gênero *Boophilus* dentro do gênero de *Rhipicephalus* (MURRELL et al. 2000, BEATI e KEIRANS 2001) passando de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1888) para a denominação atual *Rhipicephalus microplus* (LOVIS, 2012).

Na América Latina, *Rhipicephalus microplus* encontra-se amplamente distribuído pelo Brasil, norte da Argentina, Paraguai, Uruguai, leste da Bolívia, Colômbia e Venezuela. No

Brasil, destacam-se as regiões Centro-Oeste e Sudeste, locais com intensa atividade pecuária, que possuem além do hospedeiro, condições ideais de temperatura e umidade para o parasito (ESTRADA-PEÑA, 1999; ESTRADA-PEÑA et al., 2006).

O melhoramento animal na seleção de raças mais resistentes ao carrapato ainda é um processo polêmico. Há controvérsia sobre estimativas de valores de herdabilidade e questiona-se a correlação da característica de resistência aos carrapatos com a produtividade do animal (JONSSON et al., 2000; FRISCH et al., 2000). O que se sabe é que bovinos com maior grau de sangue zebuino (*Bos indicus*) possuem maior resistência a parasitas e, mesmo dentro desse grupo, há diferenças de raças. Os animais da raça Nelore, por exemplo, são mais resistentes que Gir ou Guzerá (VERÍSSIMO et al., 2004; JONSSON, 2006).

Os prejuízos vão desde a perda de peso, baixa conversão alimentar, até perdas na qualidade do couro como consequência de lesões da pele. Também favorece a presença de miíases, anemia e transmissão de agentes patogênicos que provocam graves enfermidades, podendo levar à morte dos animais. Estes prejuízos podem ser classificados como diretos e indiretos.

2.4.1 Efeitos diretos

São causados pela hematofagia intensa, realizada principalmente pelas fêmeas, podendo chegar a uma quantidade de 0,6 a 3 mL por teleógina (ARTHUR, 1960), levando a perdas na produção proporcionais à intensidade e frequência das infestações (CORDOVÉS, 1997). Além disso, pode gerar quadros de anemia e perda de nutrientes nos animais infestados. Durante a alimentação, nos locais de fixação, algumas vezes ocasiona reações inflamatórias que evoluem a cicatrizes irreversíveis, reduzindo a qualidade e o valor do couro; a irritação causa o desconforto dos animais, o que impede o bem estar e altera o comportamento.

De acordo com FURLONG et al. (1998), ocorre pequeno declínio na produção de leite em infestações crescentes sucessivas. Outros autores estimaram que na Austrália cada teleógina fosse responsável pela queda de produção diária de 8,9 mL de leite e de 1,0g de peso corporal (JONSSON et al., 1998). O processo de espoliação resulta também em perdas consideráveis na qualidade do couro, pois são produzidas cicatrizes, edemas e processos infecciosos que danificam e depreciam o couro.

Segundo SPRINGELL (1983), em um estudo conduzido para a FAO as perdas econômicas podem ser estratificadas, sendo 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, como a diminuição do valor do couro, veiculação de doenças e tratamento destas, além do descarte de animais.

Outro prejuízo que deve ser considerado é a inoculação de componentes bioativos, os quais podem levar à reação de hipersensibilidade (SAUER et al., 1995).

As perdas decorrentes das ações dos carrapatos estão relacionadas com o grau de infestação do parasita. Assim, as perdas são consideráveis quando se têm altas infestações. Em Cuba, as infestações mais frequentes são mais baixas que aquelas consideradas altas ou mesmo médias em países com baixos índices de infestação; embora se leve em conta conceitos como a instabilidade enzoótica à babesiose, a situação torna-se agravante. Na Austrália, um número acima de 20 carrapatos com tamanho superior a 4,5mm é considerado um limite econômico para se determinar tratamento contra os carrapatos (CORDOVÉS, et al., 1986). No Brasil, não se tem um limite econômico para a infestação por carrapatos. No México, calculou-se em 30kg de carne por animal/ano, as perdas por *Rhipicephalus microplus* (WOODMAM et al., 1983) enquanto na Austrália estima-se a perda econômica entre U\$S 4 a 5 por bovino (WHARTON, et al., 1980). No Brasil, HORN e ARTECHE (1985) estimaram em 800 milhões de dólares os prejuízos diretos e indiretos, já o Ministério da Agricultura, em trabalho realizado no biênio de 1983/1984, eleva esse valor à cifra de um bilhão de dólares anuais, sendo que 40% desse montante é relativo a perdas na produção leiteira. Os maiores prejuízos foram determinados nas regiões Sudeste (37%), Sul (24%) e Centro-Oeste (18%) (BRASÍLIA, 1985, citado por VERÍSSIMO, 1993).

2.4.2 Efeitos indiretos

Os danos indiretos relacionam-se à transmissão de agentes patogênicos, principalmente hematozoários. No Brasil, os mais importantes são *Babesia bovis* e *B. bigemina*, tendo participação, também, na epidemiologia de *Anaplasma marginale*. Os efeitos indiretos ocasionam prejuízos ao sistema de produção relacionado, aos tratamentos das afecções exacerbadas pela redução da imunidade do hospedeiro e aumento da mortalidade. Além disso, incrementa o custo de produção na aquisição de acaricidas e de equipamentos de suporte para aplicação dos mesmos, mão de obra, campanhas de educação e despesas com instalações ou infraestruturas para o controle das infestações (PATARROYO, 1994).

2.4.3 Perdas econômicas relacionadas à infestações por *Rhipicephalus microplus*

A importância do carrapato bovino é altamente relacionada com o impacto econômico que impõe às regiões onde ocorre. Nos Estados Unidos, essa percepção levou para o primeiro programa de erradicação do governo, que começou em 1906 (GRAHAM & HOURRIGAN, 1977). Após a erradicação dos carrapatos, verificou economia no sistema de produção em mais de US\$ 1 bilhão por ano, e a análise custo-benefício demonstrando US \$ 98,00 de retorno para cada US \$ 1,00 gasto em programa de controle (BRAM & GRAY, 1979).

Em 2002, Grisi e colaboradores avaliaram o impacto econômico causado pelo parasitismo em rebanhos bovinos no Brasil. O estudo foi considerado como uma importante fonte de dados à influência econômica causada por endo e ectoparasitas. O impacto econômico dos ectoparasitas em bovinos é majoritariamente associado a infestações pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*, mosca dos chifres (*Haematobia irritans*), bernes (*Dermatobia hominis*) e miíases (*Cochliomyia hominivorax*). Além disso, a importância da mosca de estábulo (*Stomoxys calcitrans*) tem aumentado nos últimos anos, devido a manifestações associadas com os resíduos pós-colheita da cana de açúcar (BARROS et al., 2010). As estimativas das potenciais perdas econômicas de cada parasita ou grupo são baseados em números de animais em situação de risco e em dados disponíveis sobre as perdas na produção de leite e ganho de peso de bovinos de corte.

No Brasil, o impacto econômico causado pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* foi estimado com base nas informações obtidas a partir de um levantamento epidemiológico de 3.117 dos 4.114 municípios existentes na época, além da literatura disponível e de informações solicitadas para os diversos setores governamentais e privados envolvidos. O decréscimo da produção de leite era o maior parâmetro contribuinte, correspondendo ao valor de 40%. Entre os estados, Minas Gerais foi o mais afetado, uma vez que foi responsável por 21% do total (HORN, 1983; HORN e ARTECHE, 1985).

As perdas na produção de leite causadas por carrapatos foram recentemente avaliadas por RODRIGUES e LEITE (2013), no estado de Minas Gerais, onde concentram-se 24,2% das vacas leiteiras do país. Os autores estimam que os carrapatos foram responsáveis para uma redução de 90,24 litros na produção de leite por vaca por lactação que, quando extrapolado para o rebanho leiteiro nacional, ascenderam 922.360 mil dólares americanos de perdas. As estimativas dos prejuízos causados por carrapatos em bovinos de corte basearam-se em JONSSON (2006), que relataram perdas diárias em rebanhos *Bos indicus* x *Bos taurus* e rebanho *B. Taurus* de 1,18 e 1,37 gramas por carrapato por animal, respectivamente.

2.4.4 Controle químico

O controle de carrapatos está centrado, atualmente, no uso de pesticidas das mais variadas bases químicas. O alvo desses compostos químicos, em geral, é o sistema nervoso do ectoparasito. Recentes pesquisas propõem o uso de ectoparasiticidas tendo como objetivo afetar os mecanismos reguladores do crescimento, neuropeptídeos e o sistema neuroendócrino (TAYLOR, 2001).

A grande maioria dos produtos químicos utilizados para o controle de carrapatos ao longo da história apresenta as mesmas restrições relacionadas à resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Entende-se por este processo, um efeito da seleção genética que alguns carrapatos de uma população sobrevivem após exposição continuada a uma família ou grupo químico carrapaticida, letais para a maioria dos indivíduos normais da espécie, chegando a um ponto em que toda a população é resistente (FURLONG, 1998). Este fato é determinado pelo estabelecimento e propagação do alelo resistente por pressão de seleção (FURLONG e MARTINS, 2000), devido ao aumento da população de indivíduos que sofreram alterações (mutações) tornando-os resistentes, que acasalam entre si, e a pressão de seleção aumenta a proporção da população de carrapatos que carregam os genes para estes fatores de resistência (ANDREOTTI, 2010).

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

A resistência metabólica e do sítio de ação são comuns no *Rhipicephalus microplus*. A primeira ocorre quando os artrópodes desenvolvem um aumento de expressão de genes envolvidos na atividade de enzimas metabólicas de xenobióticos/detoxificadoras, incrementando a habilidade celular para sequestrar moléculas tóxicas de um acaricida. A segunda caracteriza-se, principalmente, por uma mutação de nucleotídeo na região codificadora de um gene. Essa mutação pode conferir uma mudança de aminoácido e, conseqüentemente, uma alteração tridimensional na proteína formadora do receptor. A mudança estrutural pode alterar a habilidade da molécula do componente acaricida de se ligar ao sítio de ação, resultando em resistência (PEREIRA et al., 2008, GUERRERO et al. 2012).

PATARROYO et al. (1982) consideram como axiomático o fato que, uma vez tendo aparecido resistência comprovada a um acaricida de determinado grupo químico, ela é irreversível, e o emprego de uma mesma base química após determinado tempo não terá qualquer proveito para o controle do carrapato. Às vezes, a resistência está instalada em uma

população de carrapatos até mesmo antes de estes entrarem em contato com aquele produto, devido ao fato que já existem na população alguns indivíduos naturalmente resistentes, cerca de um a cada um milhão ou mais de indivíduos (ANDREOTTI, 2010).

A detecção precoce da resistência pelo do monitoramento pode ser uma ferramenta chave para evitar a seleção de carrapatos resistentes em situações de uso contínuo de acaricidas e mesmo princípio ativo. Isto depende de fatores que incluem a frequência das mutações na população original antes do tratamento, o modo de herança do alelo resistente (dominante, codominante ou recessiva) e a proporção da população de carrapatos total que não é exposta ao acaricida (refúgios). Além disso, para obter maior tempo de eficiência de um produto e evitar a resistência, devem se tomar critérios antes da aplicação, alternando acaricidas com diferentes bases químicas, aplicar as doses em concentrações recomendadas pelos fabricantes, e em alguns casos, utilizar princípios ativos combinados. Também é necessária a orientação dos criadores sobre os procedimentos para uso dos produtos, principalmente na dosagem e frequência do tratamento carrapaticida (FAO, 2004).

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

No final do século XIX, o uso de produtos arsenicais para o controle de carrapatos em bovinos tornou-se um método eficiente. Já no século XX, após de serem liberados comercialmente, produtos derivados arsênicos foram caracterizados por sua baixa eficácia, alta toxicidade aos animais e efeito residual. Populações de *Rhipicephalus microplus* e *B. decoloratus* desenvolveram resistência ao arsênico após 1935 e, com a falta de um acaricida alternativo, as infestações por *Rhipicephalus microplus* em várias partes do mundo tomaram enormes proporções. Além disso, o risco à saúde e as preocupações relacionadas a resíduos motivou o desenvolvimento de novos produtos, gerando os produtos organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas, piretróides, lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis, reguladores de crescimento e espinosinas.

Os primeiros compostos organoclorados (OC) introduzidos ao mercado em 1939 começaram a ser avaliados para controlar aos carrapatos resistentes ao arsênico (GRAF et al., 2004). Os OC foram os primeiros inseticidas orgânicos sintéticos comercializados, compreendendo três principais grupos: derivados clorados do difenil etano (DDT); os ciclodienos (aldrin, dieldrin e toxafeno); e os hexaclorociclohexanos (HCH) que inclui o lindano chamado erroneamente de benzeno hexaclorado (BHC).

O primeiro caso de resistência para os OCs foi observado no Brasil em 1952 (FREIRE, 1953) e, posteriormente, em áreas da Austrália e regiões sul e equatorial da África. Por apresentarem resistência cruzada a diferentes espécies de carrapatos, incluindo *Rhipicephalus microplus*, *B. decoloratus* e *R. appendiculatus*, além de gerar preocupações com relação à sua persistência no ambiente e acúmulo de resíduos na gordura corporal, carne e leite de animais, os OC foram substituídos por outras bases químicas a partir de 1962, (GEORGE et al., 2008).

O desenvolvimento dos organofosforados (OP) em torno de 1955 foi primariamente determinado para o controle de *Rhipicephalus microplus* resistente aos OC nas áreas tropicais e subtropicais. Os OP são o grupo mais antigo de carrapaticida ainda comercializado para bovinos. Embora alguns OP apresentem alta toxicidade para os mamíferos, são menos estáveis e persistentes que os OC; portanto, não se acumulam no meio ambiente e são menos lipofílicos. Apesar de não apresentarem poder residual quando aplicados sob a forma de pulverização sugerem um intervalo de tratamento de 21 dias. O primeiro caso de resistência a OP foi reportado em Austrália, em 1960. Posteriormente, em grande parte da África e em partes da América Latina, hoje a resistência cruzada está presente em praticamente todas as regiões de distribuição do carrapato *Rhipicephalus microplus* (LOVIS, 2012).

Os carbamatos estão bem relacionados aos OP, e os principais representantes deste grupo são os compostos carbaril e propoxur. São usados combinados com outros princípios ativos e pesquisas demonstram que podem ser cancerígenos.

Em 1975, o grupo das amidinas (diamínicos) foi instaurado no mercado para associar-se aos OP e, finalmente, substituí-los. Atualmente, ainda é um dos grupos mais utilizados, mesmo depois de mais de 30 anos de comercialização. A resistência às amidinas apareceu 4 a 10 anos depois do seu uso inicial em diferentes partes do mundo, iniciando na Austrália e, em seguida, México, América do Sul, África do Sul (LOVIS, 2012). Acredita-se que em algumas cepas deste carrapato a resistência é devida a um aumento da atividade esterásica e glutational-S-transferase (GST), podendo estar relacionada com a insensibilidade de um sítio de ligação de um receptor de octopamina (LI et al., 2004, ANDREOTTI, 2010).

Os piretróides sintéticos (SP) têm sido amplamente usados desde que entraram no mercado em meados de 1970. Existem no mercado, produtos originários de pelo menos três subgrupos dessa família (Deltametrina, Cipermetrina e Alfametrina). Caracterizam-se pela excelente eficácia, largo espectro, baixa toxicidade para mamíferos e altamente biodegradável. Em 1980, foram associadas com o grupo das amidinas em grande proporção, o que resultou no reaparecimento da resistência a esta classe de substâncias, reportada na América do Sul e Central (Brasil e México), África do Sul, Austrália (LOVIS, 2012). O tipo

de resistência para estes compostos incluem alteração do sítio de ação das esterases, tornando-os insensíveis por mutações do gene relacionado aos canais de sódio e à detoxificação metabólica. Porém, podem ser encontradas variações genéticas em diferentes populações para esses mecanismos (ANDREOTTI, 2010).

Em 1981 surgiram as lactonas macrocíclicas (ML) que produziram grande revolução no mercado mundial dos antiparasitários. Além de apresentarem maior poder residual que os piretróides, são também eficientes contra vermes e bernes, sendo por isso são chamados de “endectocidas”. São derivados de produtos obtidos com a fermentação do fungo *Streptomyces avermitilis* e estão divididas em duas categorias: Avermectinas (ivermectina, doramectina, abamectina, eprinomectina) e as milbemicinas (moxidectina e milbemicina oxima). Porém, devido ao poder residual não podem ser utilizados em animais em lactação e em gado de corte em período próximo do abate. Somente em 2001 foi reportada resistência cruzada por *Rhipicephalus microplus* no Brasil (MARTINS e FURLONG, 2001) e México (PEREZ-COGOLLO et al. 2010).

O fipronil era o único composto dos fenilpirazóis usado para o controle do carrapato em bovinos em meados de 1990. Este proporcionava máximo poder residual e persistia no ambiente 5 semanas, não podendo ser usado em animais em lactação e era aplicado de forma “pour on”. A resistência ao fipronil foi relatada em 2007 no Uruguai e no Brasil (CASTRO-JANER et al. 2010, CASTRO-JANER et al. 2010).

Os reguladores de crescimento são uma nova classe de acaricidas (1994) dividida em benzoilfeniluréis (Fluazuron) e os derivados de triazina e da pirimidina. Fluazuron atua bem contra o *Rhipicephalus microplus*, interferindo na produção de quitina, uma substância que possibilita o endurecimento da cutícula dos carrapatos. Completamente diferente de todos os carrapaticidas já citados, ele não permite que os carrapatos mudem de fase e cresçam, além de impedir que se reproduzam, controlando a população. No entanto, não pode ser usado em gado de leite pela alta capacidade lipofílica, acumulando-se nas gorduras teciduais e do leite. Até o ano de 2010, não foram observadas resistências no Brasil (LOVIS, 2012).

As espinosinas (spinosad) contêm uma mistura de dois metabólitos produzidos pela fermentação do actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* (MILLER et al. 2011). Altamente, efetivo contra larvas e ninfas do *Rhipicephalus microplus* está registrado em vários países e caracteriza-se por ser rapidamente biodegradado, de baixa resistência cruzada com outros químicos e risco mínimo para trabalhadores.

Tradicionalmente, os produtos químicos foram utilizados para controlar parasitas. No entanto, gera impacto sobre o bem estar e a saúde dos animais domésticos, incluindo animais

produtores de alimentos (OLIVEIRA PASIANI et al., 2012). O uso indiscriminado de pesticidas químicos para uso veterinário tem impulsionado populações de parasitas a tornar-se resistente a muitos deles (ANDREOTTI et al, 2011.; CASTRO JANER et al., 2012).

O mercado de carrapaticidas no Brasil movimentava cerca de US\$ 960 milhões por ano e constitui 34% do mercado de produtos veterinários (SINDAN, 2009). Considerando a velocidade com que aparece a resistência reportada para todos os acaricidas comerciais devido às mutações sofridas pelas diversas populações de carrapatos, desperta-se o interesse parte das empresas na criação de novos produtos para o controle deste parasita (LOVIS, 2012). A introdução de um novo produto no mercado torna-se um fator importante que interfere nos custos de produção. Nos Estados Unidos estima-se em 100 milhões de dólares o descobrimento e desenvolvimento de novas drogas com uma vida média de duração de 10 anos (GRAF et al, 2004).

2.4.5 Perfil de sensibilidade a carrapaticidas

O controle químico ainda é a forma mais usual de controle desse ectoparasito; porém, tem sido cada vez menos eficiente por causa da presença de populações resistentes aos diversos acaricidas disponíveis no mercado (Gomes et al. 2011). O uso incorreto e indiscriminado dos produtos pode acelerar a seleção de populações de carrapatos resistentes às diferentes substâncias químicas (Freitas et al. 2005).

Alves-Branco et al. (2000) relataram que os bovinos da subespécie *Bos taurus indicus*, ou animais zebuínos, são mais resistentes ao carrapato *Rhipicephalus microplus* quando comparados aos *Bos taurus taurus*, comumente denominados de europeus. Nota-se que quanto maior a proporção de genética europeia nos cruzamentos, maior será a susceptibilidade ao ácaro (Dossa et al. 1996).

Rebanhos mestiços girolando na região norte de Minas Gerais, apresentaram eficácias iguais ou superiores a 95% (CARNEIRO et al., 2015) e pertinentes com a legislação (Brasil 1990), foram a associação de cipermetrina, clorpirifós, citronelal e a amitraz, o que difere do observado em estudos no Estado do Rio Grande do Sul, nos quais se verificou eficácia máxima de 68% e 88% para amitraz e para a associação, respectivamente (Santos & Vogel 2012). Segundo Furlong et al. (2007), atualmente, o único grupo carrapaticida em que é possível a reversão da resistência é o das amidinas. Aproximadamente após 15 a 20 gerações de carrapatos sem a pressão de seleção com esses fármacos, existe a possibilidade de reutilização desse acaricida para o controle químico nas propriedades.

A eficácia alta dos acaricidas nos rebanhos do norte de Minas pode estar associada ao baixo desafio ao menor grau de infestação nos animais deste grau de sangue nessa região (CARNEIRO et al., 2015). Além disso, a associação de carrapaticidas pode estar relacionada com o mecanismo de ação que garante sinergismo que potencializa a eficácia carrapaticida (Furlong et al. 2007).

Estudos realizados em rebanhos no estado da Bahia revelou que a cipermetrina-diclorvos demonstrou níveis de eficácias aceitáveis frente às populações de *Rhipicephalus microplus*. No entanto, o amitraz apresentou eficácia média de apenas 30,95% e a deltametrina também apresentou baixa eficácia (Campos Júnior & Oliveira 2005).

Em rebanhos taurinos (holandês puro sangue) na região norte de Minas Gerais, a associação de cipermetrina, clorpirifós e citronelal apresentou eficácia acaricida de apenas 35,8%, o que indica que grande parte da população de *Rhipicephalus microplus* dessa propriedade estava resistente aos princípios ativos (CARNEIRO et al., 2015). A resistência dos carrapatos aos fármacos identificada em rebanho de bovinos taurinos pode estar relacionadas ao uso constante e indiscriminado de acaricidas devido às maiores infestações por carrapatos identificadas nestes rebanhos. Segundo Furlong et al. (2007), essa associação de carrapaticidas pode ser perigosa, porque pode favorecer a resistência a ambos os fármacos. A deltametrina não foi eficaz, pois permitiu eclodibilidade de 64,4% e eficácia de apenas 35,3% (CARNEIRO et al., 2015), o que está em acordo com Merlini & Yamamura (1998), que também constataram baixa eficácia para esse carrapaticida em estudo com animais Holandês no Estado do Paraná.

Em rebanho no norte de Minas Gerais, com variável grau de sangue holandês e zebu, somente a supona e a associação com cipermetrina apresentaram eficácias pertinentes com a legislação (CARNEIRO et al., 2015), semelhante ao descrito por Furlong et al. (2007) que verificaram para associação com cipermetrina 99,8% de eficácia, para deltametrina 15,3% e 41,2% para amitraz no rebanho da Embrapa Gado de Leite no município de Juiz de Fora.

Em rebanhos girolando, na região norte de Minas Gerais, nos quais o controle do carrapato era feito em conjunto com o controle de mosca-do-chifre utilizando produtos pour on à base de cipermetrina sem frequência de aplicação definida. Verificaram-se menores índices de postura para amitraz, associação com cipermetrina, clorpirifós+citronelal, a supona promoveu a completa inibição da eclodibilidade (CARNEIRO et al., 2015). No entanto, essa prática ao longo do tempo pode aumentar a pressão de seleção sobre *Rhipicephalus microplus*, pois em tais produtos para o controle da mosca os princípios são utilizados em subdoses e com maior frequência (FARIAS et al., 2008).

Em rebanhos com maior contração de grau de sangue holandês, amitraz, deltametrina e associação com cipermetrina não apresentaram eficácia acaricida. O amitraz apresentou baixo índice de postura, entretanto ocorreu alta taxa de eclodibilidade, e por isso a eficácia foi de apenas 66,1%. Entretanto, a supona inibiu completamente a eclodibilidade e apresentou eficácia de 100% (CARNEIRO et al., 2015). Campos Júnior & Oliveira (2005) ao estudar em rebanhos leiteiros no município de Ilhéus (Bahia), também relataram que o amitraz e a deltametrina não proporcionaram eficácias pertinentes com a legislação na maioria das populações de carrapato testadas. Porém, a cipermetrina apresentou níveis aceitáveis de eficácia. A baixa eficácia do amitraz também foi verificada por Camillo et al. (2009) no Estado do Rio Grande do Sul, por Furlong et al. (2007) na cidade de Juiz de Fora, em Minas Gerais, e por Pereira (2006) no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo.

A alta eficácia da supona verificada por CARNEIRO et al. (2015) é semelhante às aquelas relatadas por Arantes et al. (1996), em Uberlândia, Minas Gerais, e por Silva et al. (2000), que verificaram alta eficácia para todas as amostras de *Rhipicephalus microplus* avaliadas provenientes de bovinos da bacia leiteira da micro região de Goiânia, Goiás.

Segundo CARNEIRO et al. (2015), propriedades nas quais utilizavam-se produtos homeopáticos para controle de carrapatos nos bovinos em diversos grau de sangue holandês e zebu apresentaram alto índice de postura, o que evidencia que o uso do produto de homeopatia não teria efeito sobre a inibição da postura das teleóginas, diferindo de pesquisas realizadas por Arenale & Coelho (2002), os quais relataram que o produto homeopático é um complemento no controle do carrapato.

A resistência a mais de uma classe de carrapaticida foi constatada em 83% dos carrapatos em rebanhos do norte de Minas Gerais, avaliados por CARNEIRO et al. (2015), o que é um valor alarmante para determinação do acaricida a ser utilizado nestes rebanhos.

2.4.6 Controle alternativo

Métodos alternativos para o controle do *Rhipicephalus microplus* são estudados em diversas linhas de pesquisas. Porém, os resultados ainda são pouco substanciais.

Seleção de bovinos com maior resistência aos carrapatos e a incorporação de raças *Bos indicus* no rebanho diminuem as infestações deste parasita sobre os bovinos. A resistência do zebu em comparação com os taurinos se deve ao convívio dos zebuínos há milhares de anos com os carrapatos, o que facilitou provavelmente uma seleção natural e o desenvolvimento de características como comprimento do pêlo, espessura e dureza da pele, e hábitos dos animais (RIEK, 1962), o que dificulta os carrapatos fixarem e manterem-se em contato com o animal.

Entretanto, existem raças com diferentes graus de resistência, mesmo dentro das europeias ou zebuínas (LEMOS, 1986).

O cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das larvas, como o capim gordura (*Melinis minutiflora*), ou de plantas que repelem, como a leguminosa *Stylosanthes* spp. (SUTHERST et al. 1982), ou aquelas que têm propriedades tóxicas para os carrapatos, como *Gynandropsis gynandra* e *Azadirachta indica*, esta última conhecida como o Neem (HERNÁNDEZ, 2005), têm sido forma alternativa associada ao controle de carrapatos.

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

O *Rhipicephalus microplus*, embora seja monoxênico, pode infestar uma grande variedade de hospedeiros como animais silvestres, cervídeos (*Odocoileus* spp, *Mazama* spp), suiformes (*Tayassu* spp., *Sus* spp.) e animais domésticos como caninos e aves, os quais são reservatórios potenciais de carrapatos que afetam o gado e podem alterar os resultados, por exemplo, quando se emprega descanso de pastos ou piquetes (HERNÁNDEZ, 2005).

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

O manejo integrado de métodos já citados, junto com o emprego de vacinas, pode resultar em controle eficiente e, inclusive, na erradicação do carrapato *Rhipicephalus*

microplus nas áreas afetadas, fornecendo ao invés do controle químico, métodos alternativos que resultam em ambiente livre de contaminantes que possam prejudicar a saúde humana e animal.

2.4.7 Controle imunológico

Na Medicina Veterinária, o uso de vacinas apresenta grande importância para o sistema de produção pecuária, animais de companhia, e em saúde pública, sendo fundamentais para o controle de enfermidades em praticamente todas as espécies domésticas (MARTINOD, 1999).

Nos últimos anos, tem ocorrido aumento nos estudos referentes ao isolamento e caracterização de proteínas imunógenas, assim como técnicas imunológicas e métodos de clonagem de genes para desenvolvimento de vacinas (DALTON e MULCAHY, 2001).

O desenvolvimento de vacinas contra carrapatos representa uma promissora alternativa de controle. A associação de medidas representa maior garantia de bons resultados no controle do carrapato (SANGSTER, 2001). O uso de vacinas com banhos estratégicos de acaricidas é um bom exemplo desse controle integrado que remete a bons índices para o produtor rural (WILLADSEN, 2006).

Antes de tudo a vacinação representa uma medida preventiva. As vantagens que esse processo oferece sobre os métodos convencionais de controle químicos, segundo WILLADSEN (1997), são várias: muitas vezes representam uma ação sustentável, são livres de resíduos, são mais específicas e com menores problemas de resistência quando comparadas aos fármacos, são mais seguras. A utilização e produção de vacinas, em muitos casos, representam as únicas medidas médicas de intervenção, e frequentemente oferecem maior custo-benefício que as terapias (FRANCIS, 2001).

Em 1989, WILLADSEN et al. isolaram e purificaram uma proteína que mimetizava as alterações biológicas no *Rhipicephalus microplus* induzidas pelas inoculações com extratos brutos de carrapato em bovinos. Essa glicoproteína foi denominada Bm86. No entanto, como forma de facilitar a obtenção do antígeno, realizaram-se pesquisas que possibilitaram a produção em massa da glicoproteína através da clonagem e expressão do gene que codifica a Bm86 em *Escherichia coli*, já que seriam necessárias 40.000 a 60.000 cópias para produzir 20 a 100µg de Bm86 (RAND, et. al., 1989). Notam-se pequenas diferenças estruturais na proteína recombinante, mas não existem diferenças na sua eficácia como imunógeno (COBON e WILLADSEN, 1990).

A primeira vacina sintética contra o *Rhipicephalus microplus*, foi denominada de 4912, que apresentou resultados pouco satisfatórios (OLIVEIRA, 1998). Com o avançar das pesquisas, a SBm7462[®] foi desenvolvida por PATARROYO et al. (2002), apresentando bons resultados e já representa uma tecnologia patenteada. A partir das análises de estudos por predição computacional, determinantes imunogênicos da SBm 7462[®] foram definidos a partir da sequência da Bm86. O imunógeno possui sequências que foram desenhadas no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/Bioagro/Departamento de Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, e sintetizadas no Instituto de Immunologia Del Hospital San Juan de Dios, em Bogotá, Colômbia. Esses peptídeos foram catalogados pelo livro de sequências como 4822 (aa. 398-411), 4824 (aa. 132-145) e 4823 (aa. 21-35). O peptídeo SBm7462[®] possui essas sequências nesta ordem e com duas cisteínas no C- e N-terminais. A partir de estudos controlados in vivo verificou-se que o imunógeno tem uma eficácia vacinal de 81,05% no que tange à redução do número de carrapatos, menor postura e menor taxa de sobrevivência das larvas (PATARROYO et al., 2002). Esses dados refletem melhores resultados do que a maioria dos testes com rBm86 em iguais condições.

COUTO PIMENTEL (2002) realizou o teste com o peptídeo sintético SBm7462[®] em condições extremamente diferentes das anteriores e na concentração de 2,0 mg com o adjuvante saponina. Foram utilizados neste trabalho 30 bovinos *Bos taurus taurus*, da raça Holandesa, mantidos em pastagens previamente infestadas com larvas de *Rhipicephalus microplus*. Nesse estudo foi alcançada uma eficácia final de 53,29% para o grupo vacinado.

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

Diferente das vacinas que se derivaram da proteína Bm86, as quais utilizavam a proteína íntegra (650 aminoácidos), a vacina sintética SBm7462[®] caracterizou-se como um peptídeo de 43 aminoácidos que contém três epítomos derivados da proteína Bm86. PATARROYO et al. (2002) demonstraram que a porção 4824 é a mais hidrofílica do peptídeo SBm7462, sendo responsável pela maior produção dos anticorpos IgG protetores dessa vacina. SOSSAI et al. (2005) por meio de estudos de polimorfismos de DNA determinou que a porção 4824 mostrava-se conservada entre populações de *Rhipicephalus microplus*

brasileiras, argentinas, colombianas, uruguaias e venezuelanas, o que deixou o imunógeno SBm7462[®] em situação de ser utilizado como imunógeno universal em populações de *Rhipicephalus microplus*.

Uma vacina só terá aceitabilidade no mercado se o preço for módico. A vacina sintética SBm7462[®], que combate *Rhipicephalus microplus* foi patenteada no Brasil, Estados Unidos da América, México, Austrália e na União Europeia. Porém, existem no mundo apenas cinco centros especializados na síntese química de peptídeos em escala industrial. Esse empecilho oneraria a produção e envio de grandes quantidades de peptídeo em curtos espaços de tempo, que certamente acarretariam em problemas de distribuição dessa vacina entre os inúmeros potenciais mercados consumidores.

Visando resolver as dificuldades que acarretam a produção de proteínas sintéticas em massa e propor uma alternativa à produção do peptídeo sintético Sbm7462[®], SOSSAI (2009) utilizou quatro genes que foram desenhados tendo como base a sequência de aminoácidos do peptídeo sintético SBm7462[®], otimizando-os para uso na levedura *Pichia pastoris* km71. O gene rBmseq2 desenhou-se com o intuito de amplificar a sequência original de 45 aminoácidos do peptídeo SBm7462[®].

Estudos feitos por SOUZA NEVES (2011) para sua dissertação de mestrado, usando o modelo bovino em “*stall test*” mostraram que o peptídeo recombinante rSBm7462 codificado pelo gene sintético seq 2 mostrou uma eficiência de 72,54%. Este resultado permite iniciar um estudo a campo deste imunógeno recombinante.

2.4.8 Novos candidatos para o controle do *Rhipicephalus microplus*

Recentemente, como outro exemplo específico de grande interesse para o desenvolvimento de vacinas contra o carrapato *Rhipicephalus microplus*, foram reportados novos antígenos com potencial de serem empregados no controle imunológico, incluem glutathione S-transferases; cisteíno, aspártico e metalo endopeptidases; inibidores de tripsina; ferritina 2; e alelos regionais da Bm86, o antígeno protetor primário nas vacinas TickGARD e Gavac (Tabela 1). Outros antígenos estão em etapas iniciais de pesquisas e os dados ainda não estão disponíveis até obter resultados promissores e os respectivos direitos de propriedade intelectual (GUERRERO et al. 2012).

Tabela 1. Resultados de ensaios em bovinos com novos antígenos vacinais contra *Rhipicephalus microplus*.

Antígeno	Eficácia (%)	País	Fonte
SBm7462	81	Brazil	PATARROYO et al. (2002)
Yolk pro-Cathepsin	25	Brazil	LEAL et al. (2006)
Ferritin2	64	México	HAJDUSEK et al. (2010)
Subolesin	51	México	ALMAZAN et al. (2010)
	81	México	ALMAZAN et al. (2012)
ARS Antigen 1	76	Brazil	GUERRERO et. al. (2012)
	73	Brazil	GUERRERO et. al. (2012)
ARS Antigen 2	63	Brazil	GUERRERO et. al. (2012)
ARS Antigen 1 + 2	71	Brazil	GUERRERO et. al. (2012)

2.4.8.1 Glutathione S-transferases (GSTs)

Pertencem a uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da molécula de glutathione a várias outras moléculas e possuem um papel fundamental na manutenção da homeostase celular desempenhando vários papéis fisiológicos nos mecanismos de detoxificação intracelular e excreção celular de compostos endo e xenobióticos. Esta classe de enzimas ajuda no sequestro e transporte de compostos hidrofóbicos endógenos protegendo as células contra toxicidade química e estresse em diferentes tecidos do *Rhipicephalus microplus* (glândula salivar, ovário). As atividades das GST foram caracterizadas em ovos, durante o desenvolvimento embrionário e larval, e em fêmeas semi ingurgitadas. Nestas últimas, relacionam-se com o papel da GST como enzima antioxidante durante o envelhecimento e durante o período de pré-postura além de conferir a resistência a vários acaricidas (AGIANIAN et al., 2003).

PARIZI (2011) demonstrou uma eficiência vacinal de 57% contra *Rhipicephalus microplus* em bovinos inoculados com GST recombinante proveniente do carrapato *Haemophysalis longicornis*. Em 2012, desenvolveu uma vacina com múltiplos antígenos contendo a VTDC e BYC, resultando em um aumento de peso dos animais e no desenvolvimento de resposta imune humoral (PARIZI, 2012).

2.4.8.2 Cisteíno endopeptidase degradadora de vitelina (VTDCE)

Atualmente, já foram descritas cinco enzimas responsáveis pela degradação da lipoglicofosfoproteína de origem materna, denominada vitelina (VT): VTDCE, BYC, THAP, BmCL1 e RmLCE (SEIXAS et al., 2003). A cisteíno endopeptidase degradadora de vitelina (VTDCE) está presente no ovário de teleóginas, na hemolinfa como reguladora à vitelina e nos ovos. Portanto, durante o desenvolvimento embrionário, o carrapato obtém energia e aminoácidos da reserva do vitelo até no estágio larval (SEIXAS, 2003).

Quando comparada com as outras duas enzimas envolvidas na degradação da vitelina durante a embriogênese, BYC e THAP, a VTDCE mostra a maior atividade na hidrólise da vitelina. Em um teste de vacinação de bovinos, a VTDCE reduziu o número e o peso das teleóginas assim como a postura e fertilidade dos ovos, sugerindo o potencial do uso da proteína como antígeno na inibição da atividade da VTDCE durante o transporte pela hemolinfa até chegar ao seu local de ação. Portanto, é um candidato para o desenvolvimento de vacinas no controle do *Rhipicephalus microplus* (SEIXAS, 2008).

2.4.8.3 Pró-catepsina de ovo de *Rhipicephalus microplus* (BYC)

A BYC (Boophilus Yolk pro-Cathepsin) igualmente á THAP (Tick Heme-binding Aspartic Protease) é precursora de uma aspártico proteinase, tendo assim sua atividade completamente inibida pela adição de um inibidor dessa classe de enzimas. Devido à participação na disponibilização de substratos energéticos para o desenvolvimento do embrião e no papel de degradação da hemoglobina (Hb) no repasto sanguíneo, foi testada como antígeno vacinal contra o *Rhipicephalus microplus*. Na vacinação de bovinos com BYC nas formas nativa e recombinante, dentre os parâmetros analisados nos animais imunizados, houve principalmente diminuição na fertilidade e eclosão dos ovos, e diminuição no número e peso de teleóginas, atestando o envolvimento da proteína durante a embriogênese (LEAL et al, 2006). Apesar de ter-se obtido a eficácia de 25%, é um alvo vacinal com potencial de compor uma vacina multiantigênica em que a proteção parcial de diferentes antígenos se somam, resultando em uma sinergia na proteção contra o carrapato (GUIZZO et al, 2010).

2.4.8.4 Tick Heme-binding Aspartic Protease (THAP)

É uma aspártico proteinase que degrada vitelina dos ovos do carrapato disponibilizando aminoácidos para as vias metabólicas energéticas da embriogênese. A vitelina atua também como um antioxidante e um reservatório de heme, ligando à sua estrutura o heme livre que excede o conteúdo necessário para a síntese das hemoproteínas envolvidas na formação do embrião. A taxa de degradação da vitelina pela THAP deve ser regulada através de um

mecanismo controlado para evitar os efeitos deletérios da toxicidade celular gerada pelo potencial dos radicais livres da molécula heme. A síntese da THAP ocorre no corpo gorduroso, ovário e intestino sendo secretada para a hemolinfa materna e concentrada nos oócitos após sua endocitose pelo ovário. A interferência na atividade da THAP poderia interferir na disponibilização da vitelina, alterando o desenvolvimento do embrião, e também causar a morte do parasita por citotoxicidade induzida por heme (GUIZZO et al, 2010).

2.4.8.5 RmLCE e BmCL1

A RmLCE (*Rhipicephalus microplus* Larval Cysteine Endopeptidase) é outra cisteíno endopeptidase com maior atividade de hidrólise da VT e Hb em larvas e fêmeas adultas que em ovos de *Rhipicephalus microplus*. A intervenção na atividade da RmLCE, além de poder reduzir a sobrevivência larval pela escassez de substratos energéticos disponíveis para o desenvolvimento dessa etapa até que encontre o hospedeiro vertebrado e realize sua primeira alimentação, poderia interferir também no repasto sanguíneo na formação das hemoproteínas que necessitam do heme obtido através da hidrólise do sangue do hospedeiro para serem sintetizadas (GUIZZO et al, 2010).

A denominada BmCL1 (*Boophilus microplus* Cathepsin – L1) recentemente foi demonstrada ser a mesma enzima RmLCE, quando foram analisadas enzimas degradadoras de VT e Hb através da sequência parcial de aminoácidos (ESTRELA et al, 2010). Administrando um inibidor de cisteíno proteinases em larvas e em intestino de partenógenas a degradação respectivamente de vitelina e hemoglobina é inibida (GUIZZO et al, 2010).

Neste contexto, é investigada a contribuição de aspártico e cisteíno endopeptidases para hidrólise do VT e Hb em diferentes estádios do carrapato *Rhipicephalus microplus* e, posteriormente, utilizar inibidores específicos dessas enzimas. Quando utilizada como antígeno, a BYC só induz uma proteção parcial (LEAL et al, 2006). Da mesma forma, a vacinação com VTDCE também não confere uma proteção desejável em bezerros (SEIXAS et al., 2008). Estes autores relatam que uma vacina multiantigênica (BYC, VTDCE e RmLCE/BmCL1) seria mais eficaz pela atividade sinérgica dos substratos (ESTRELA et al, 2010).

2.4.8.6 Inibidores da tripsina

Vários inibidores de tripsina têm sido identificados em ovos, larvas e estádios adultos do *Rhipicephalus microplus*, sugerindo o papel destes inibidores serine proteases nos processos de alimentação. Imunizações em bovinos com um inibidor de tripsina denominada BMTI (*Boophilus microplus* Trypsin Inhibitor), presente em larvas, geraram uma proteção

significativa na redução de 69,7% no número total de teleóginas e eficácia do 72,8% quando aplicada na forma nativa, mas quando foram vacinados com o peptídeo sintético a eficácia foi de 18,4% (ANDREOTTI, 2007).

Proteínas pertencentes à família Kunitz-BPTI são abundantes em glândulas salivares, intestino médio e ovários do carrapato, órgãos alvos para o desenvolvimento de vacinas no controle do parasita. Recentemente, ANDREOTTI (2012) obteve a expressão de um inibidor de tripsina na versão recombinante em *Pichia pastoris* denominada rRmLTI (recombinant *Rhipicephalus microplus* larvae Trypsin Inhibitor).

2.4.8.7 Ferritina 2

A ferritina 2 é uma proteína armazenadora e transportadora de ferro, controla a quantidade do ferro proveniente do sangue ingerido pelo carrapato na alimentação é específica para agir no intestino do carrapato (HAJDUSEK et al., 2009). Além disso, é expressa durante todos os estádios evolutivos do carrapato, sem qualquer ortólogo funcional em vertebrados. Através do silenciamento RNA de interferência da ferritina 2 foram apresentados impactos significativos nos processos metabólicos do carrapato: alimentação, ovoposição e eclosão das larvas. HAJDUSEK et al (2010) na imunização com FER2 relataram 64% de eficácia contra infestação de *Rhipicephalus microplus* e eficácia de 72% contra *R. annulatus*. Em bovinos, a eficácia do RmFER2 (recombinant *Rhipicephalus microplus* Ferritin 2) foi similar à obtida quando usado Bm86, 60% e 100% de eficácia contra *Rhipicephalus microplus* e *R. annulatus*. Estes resultados sugerem que FER2 pode ser um bom candidato a antígeno vacinal para o controle de mais de uma espécie de carrapatos.

2.4.8.8 Subolesina

O grupo de ALMAZAN et al, em 2012 demonstrou que a subolesina recombinante expressa em *E. coli* apresenta uma eficiência de 81 % contra o *Rhipicephalus microplus*. Embora não sejam conhecidos os mecanismos pelos quais essa molécula age, poderia ter um impacto mundial se fosse comercializada.

Os estudos com ferritina 2 e subolesina recombinantes podem evidenciar que o aperfeiçoamento nas etapas de expressão ou purificação resultaria em maior eficácia. Apesar da grande quantidade de antígenos reportados e estudados em bovinos para a criação de uma vacina contra a *Rhipicephalus microplus* os resultados geralmente evidenciam uma eficácia mais baixa que aquela proporcionada pelos antígenos baseados na proteína Bm86 (PARIZI et al., 2009). Significativamente, as pesquisas encaminhadas por PATARROYO et al (2002) demonstram resultados promissores quando os bovinos são vacinados com o peptídeo

SBm7462, derivado de determinantes antigênicos da Bm86, mostrando eficiência do 81%, e a consequente resposta de anticorpos.

2.4.8.9 Alelos regionais da Bm86

O sucesso de vacinas baseadas na proteína Bm86 contra o carrapato *Rhipicephalus microplus* têm demonstrado viabilidade também para outras espécies intimamente relacionados. Isto é observado em vários estudos utilizando a proteína Bm86 e seus homólogos como a Ba86, Bd86 no controle efetivo dos carrapatos *Rhipicephalus microplus*, *R. annulatus*, *R. decoloratus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum*, e *Hyalomma dromedarii*.

No entanto, tem sido caracterizado até o momento um número limitado de antígenos com epítomos de proteção cruzada. Como objeto de investigação mediante o conhecimento e comparação de sequências genéticas é possível identificar proteínas antigênicas amplamente conservadas entre gêneros de carrapatos, e que possam ter potencial para o desenvolvimento de vacinas mais sofisticadas.

A vacinação com uma ou mais dessas proteínas poderia conferir proteção cruzada para várias espécies e cepas de carrapatos e também incluir antígenos derivados de patógenos, ou seja, dos agentes etiológicos de doenças transmitidas por carrapatos (DTC) resultando na produção de vacinas multivalentes com grande importância na Medicina Veterinária (PARIZI, 2012).

2.4.9 Antígenos ocultos “concealed antigens”

As vacinas contra os carrapatos permitem a inclusão de múltiplos antígenos que poderiam ter como alvo uma grande categoria de espécies de carrapatos e poderia com isso, prevenir a transmissão de patógenos (FUENTE, 2006).

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

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

TAFUR (2011) através de um estudo histológico detalhado na dissecação de alças intestinais de teleóginas alimentadas em bovinos do grupo vacinal, demonstrou que ocorreram alterações como desnudamento da membrana basal, erosão celular, vacuolização celular e cromatólise. Por outro lado, na imunistoquímica evidenciou os vacúolos digestivos com intensa marcação ao soro procedente dos bezerros do grupo vacinal, demonstrando produção de anticorpos anti-proteína total in situ.

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

Segundo AGBEDE & KEMP (1986) e KEMP et al. (1986), os anticorpos se fixam na membrana das células digestivas, danificando-as. Os danos atinge quatro vias: redução do número de fêmeas ingurgitadas em bovinos vacinados, redução no peso das fêmeas ingurgitadas, postura dos ovos e, finalmente, 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 á próxima contaminação e dessa forma, diminuir o desafio na próxima geração (COBON, et al, 1995).

Diferentes antígenos ocultos dos carrapatos foram descritos. No entanto, os antígenos derivados do intestino tiveram maior preponderância no desenvolvimento de vacinas,

especialmente aquelas baseadas na proteína Bm86 que se tornou a proteína mais estudada e que apresentou melhores resultados como antígeno vacinal eficiente em alguns ensaios de vacinação do gado e em ensaios de campo (CANALES et al, 2009).

2.4.10 Vacinas comerciais vigentes

A glicoproteína Bm86 foi isolada e purificada em 1989 a partir da membrana de células intestinais de carrapatos *Rhipicephalus microplus* cepa australiana Yeerongpilly. Possui um peso estimado de 89 kDa e pI de 5,5. RAND et al. (1989) clonaram e sequenciaram o gene dessa proteína, caracterizando as sequências nucleotídicas e aminoacídicas, determinado que essa proteína era composta por 650 aminoácidos (aa).

Em 1994, foi lançada pela Hoeschst Animal Health (Austrália) a primeira vacina comercial contra carrapatos, denominada TickGard[®] e desenvolvida pela Organização de Pesquisa da Comunidade Científica e Industrial (CSIRO) em colaboração com o Biotech Australia Pty. Ltd. Através da clonagem do gene *bm86* isolado da amostra Yeerongpilly em *E. coli*, foi produzida a proteína Bm86 recombinante (SMITH et al., 1995). Esta vacina converteu-se rapidamente no tratamento com mais sucesso para o controle de carrapatos na Austrália, embora depois de várias reestruturações nas empresas que elaboravam esta vacina desapareceu do mercado e foi reincorporada em uma pequena parte do norte do país. Em trabalhos feitos com a mesma vacina em rebanhos leiteiros, JONSSON et al. (2000) obtiveram resultados com redução de 56% no número de carrapatos, 72% no desenvolvimento reprodutivo e um incremento no ganho de peso vivo do gado de 18.6 kg durante um período de 6 meses. Além disso, o uso de acaricidas diminuiu significativamente, não sendo necessário a sua aplicação.

Nesse mesmo ano, foi desenvolvida a vacina cubana GAVAC[®] pelo Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia e liberada pelo Heber Biotec S.A. (Havana, Cuba) através da recombinação do gene da glicoproteína Bm86 (estoque cubano da amostra Yeerongpilly) na levedura *Pichia pastoris*. Em experimentos a campo, foi mostrado que este imunógeno não apenas afetou a redução do número de carrapatos, mas também a redução do peso das teleóginas ingurgitadas, a diminuição da postura e a viabilidade dos ovos (RODRIGUEZ et al. 1994). Em análises de resultados de outros testes feitos a campo, com número maior de animais, em um período de oito anos (1995-2003) o número de tratamentos com acaricidas foi reduzido em 87%, além da diminuição da incidência e mortalidade do gado devido à babesiose (RODRIGUEZ VALLE et al., 2004).

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

2.4.11 Peptídeo SBm7462

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

Este peptídeo é formado por 43 aminoácidos e massa ou peso molecular de 5,5 KDa, correspondente a 6,6% da proteína Bm86. Análises genéticas mostraram que os epítomos imunogênicos dessa molécula estão conservados nas diferentes populações do carrapato *Rhipicephalus microplus* das regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (SOSSAI et al., 2005; PECONICK et al., 2008).

A capacidade imunogênica do peptídeo SBm7462[®] foi demonstrada na redução do número de teleóginas, da taxa de ovoposição, da relação peso das larvas/peso dos ovos, do peso dos ovos, das teleóginas e da fertilidade dos ovos. Em bovinos se geraram anticorpos protetores (IgG) com eficácia vacinal variando de 53 a 81% nos estudos realizados na espécie alvo, dependendo de como o experimento foi delineado (COUTO-PIMENTEL, 2002; PATARROYO et al., 2002).

A partir deste estudo, o peptídeo SBm7462[®] foi eleito como o imunógeno a ser utilizado na primeira vacina sintética comercial contra o carrapato *Rhipicephalus microplus*. Esse peptídeo foi patenteado no México, EUA, Austrália e Comunidade europeia.

PATARROYO et al. (2009) avaliando da resposta imune induzida em bovinos pelo SBm7462[®], demonstraram que este peptídeo estimulou a produção de imunoglobulinas antígeno-específicas, com predominância estatisticamente diferente do isotipo IgG1 sobre o isotipo IgG2. Portanto, se considerou que o peptídeo sintético SBm7462[®] induzia eficientemente uma resposta imune antígeno-específica que envolvia mecanismos imunes tanto celulares quanto humorais. A resposta imune induzida pelo SBm7462[®] nos tecidos linfóides, caracterizava-se pela formação típica de estruturas que conferiam especificidade e

memória quinze dias após a primeira imunização, com a indução de apoptose em células linfocíticas residentes em linfonodos.

2.4.12 Produção do peptídeo recombinante 7462 em *Pichia pastoris*

Visando resolver as dificuldades da síntese química de proteínas em massa, SOSSAI (2009) construiu quatro genes sintéticos com base na sequência de aminoácidos dos epítomos do peptídeo SBm7462[®] (4822, 4824 e 4823). Esses genes foram otimizados para a expressão proteica na levedura *Pichia pastoris* cepa Km71.

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).

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

Estudos posteriores demonstraram que dos quatro genes testados, o rBmseq4 teve maior capacidade de induzir imunidade. Mediante a observação de linfonodos de bovinos vacinados na dosagem de 2,0 mg foi evidente uma resposta imune T-dependente e uma resposta celular caracterizada pela formação de centros germinativos (CGs) com zonas claras e escuras bem diferenciadas, além da hiperplasia dos cordões medulares (CMs) confirmando desta maneira alta afinidade e memória imunológica (TAFUR, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar o estudo a campo da vacina recombinante rSBm 7462 anti *Rhipicephalus microplus*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a dinâmica populacional do *Rhipicephalus microplus*;
- Avaliar a viabilidade econômica da vacina recombinante rSBm 7462 anti *Rhipicephalus microplus* no sistema de produção de leite no norte de Minas Gerais;
- Computar a redução de gastos com carrapaticidas e das perdas indiretas na produção de leite em rebanhos leiteiros imunizados com a vacina recombinante;
- Monitorar os índices de produtividade de leite, ganho de peso e “performans” reprodutiva; e
- Mensurar a produção de anticorpos (IgG) anti-peptídeo em animais imunizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de estudo

O experimento foi realizado em 07 propriedades (tabela 2) rurais do norte de Minas Gerais, distanciadas por raio de até 150 km de Montes Claros (Latitud: -16.737, Longitud: -43.8647), cujo sistema de produção baseia-se na pecuária leiteira, sendo que o grau de tecnificação, produtividade e grau de sangue do rebanho é variável entre elas. Em todas as propriedades selecionadas para o trabalho foram consideradas aquelas que em há problemas com a infestação e controle de carrapatos nos bovinos.

Os dados obtidos após a elaboração de um questionário (Anexo 1) permitiu realizar um levantamento de cada propriedade. Após a seleção das duas propriedades do grupo controle, nas quais se manteve o manejo sanitário de controle de ectoparasitas na forma tradicional, enquanto no grupo experimental o manejo sanitário de controle de ectoparasitas foi realizado pela equipe do projeto, sendo responsáveis pelas tomadas de decisões.

Tabela 2. Descrição das propriedades rurais e grupos pertencentes no experimento:

Propriedade	Grupo
01. Barreiro Bonito	Experimental - GE1
02. Blumenau	Experimental - GE2
03. Curral Novo	Experimental - GE3
04. UFMG	Experimental - GE4
05. Santana	Experimental - GE5
06. Nova Esperança	Controle - GC1
07. Santa Ingraça	Controle - GC2

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 Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV), estando registrado e aprovado no Comitê de Ética da instituição, sob o número do registro do projeto 72/2014.

O número total de animais trabalhados foi aproximadamente 1000 bovinos, compreendendo diversas categorias tais como bezerros lactentes, novilhas, touros, vacas seca e em lactação, sendo que o número de animais por categoria e por propriedade foi variável

durante o período experimental, de acordo com fluxo de manejo das propriedades. A idade dos animais foi de acordo à disponibilidade de cada propriedade, posto que a vacina possa ser usada em animais a partir das quatro semanas de idade. Os bovinos utilizados no experimento foram *Bos taurus* e seus cruzamentos com *Bos indicus*, desta forma o grau de sangue dos rebanhos estudados variou desde ½ sangue Holandês-zebu até animais puro sangue.

Os animais foram criados no sistema tradicional em cada fazenda, não interferindo no manejo, podendo ser encontrados sistema intensivo (confinados), semi-intensivo ou extensivo. Durante o período de estudo, os animais receberão água ad libitum, suplementação alimentar com sal mineral, pastejo de *Braquiaria brizantha* cv Marandu ou *Panicum maximum* (tanzânia, mombaça), cana de açúcar, silagem de milho ou sorgo e concentrado, conforme a época do ano e categoria animal de cada propriedade.

O médico veterinário responsável pela coordenação das atividades foi Danilo Velloso Ferreira Murta, CRMV-MG 10039, com auxílio do médico veterinário Felipe Drumond de Souza Pires.

4.3 O imunógeno

Fundamentando-se na metodologia de vacinologia reversa, foram desenhados genes sintéticos para produção de peptídeos imunodefinidos derivados da proteína intestinal Bm86 do carrapato *Rhipicephalus microplus*. O gene rBmseq4 de 171pb foi desenhado com o intuito de codificar a sequência original de 45 aa do peptídeo sintético SBm7462®, o gene foi otimizado e sintetizado, na Alemanha pela companhia Entelechon e posteriormente clonado no vetor de expressão extracelular pPIC9 (Invitrogen USA) na levedura *Pichia pastoris* cepa km71. Os produtos expressos desse gene foram recuperados do meio extracelular por ultrafiltração após a fermentação.

Foi utilizado o adjuvante saponina na dose de 1,5mg (0.80mg) por animal diluído em água milli Q estéril.

Tabela 3. Formulação da vacina recombinante rSBm 7462 utilizada:

Componente	Concentração
Peptídeo recombinante rSBm 7462.	2mg (1mg)
Saponina	1,5mg (0.80mg)
Água destilada pH 6,0 (q.s.p.)	2.00ml

4.4 Esquema de imunização

Inicialmente foram selecionadas duas propriedades como grupo controle, sendo uma de sistema de produção extensiva e rebanho girolando com grau de sangue $\frac{1}{2}$ HZ e outra propriedade com sistema de produção intensivo confinado ou pastejo rotacionado, caracterizada por rebanho holandês puro.

A imunização iniciou-se no ano de 2012, sendo imunizados todos os bovinos das propriedades dos grupos experimentais, em um total de três (3) imunizações, no primeiro ano de experimento. O reforço vacinal foi realizado de acordo com a dinâmica populacional de carrapatos avaliados em cada rebanho, determinando o calendário a seguir em cada propriedade. No segundo, ano foi realizado reforço vacinal também com duas (2) inoculações. Em algumas propriedades realizou-se uma terceira aplicação ao final do experimento e naqueles animais que não estavam no rebanho desde o início do período experimental, introduzidos por compra ou nascimento, foram imunizados para adequar ao programa de cada propriedade.

4.5 Dados meteorológicos

Os dados climáticos foram analisados segundo informações cedidas pela central meteorológica instalada no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), localizada na cidade de Montes Claros.

4.6 Delineamento experimental

As atividades experimentais tiveram início em julho de 2010 e pode-se organizar a pesquisa nos seguintes passos:

1º passo: Selecionou-se as propriedades de perfis de produção variáveis, todas assistidas por médicos veterinários e com controle zootécnico e econômico relativamente estabelecido.

2º passo: Elaborou-se um questionário (Anexo 1) para levantamento de informações iniciais das propriedades e tabulação dos dados obtidos no questionário.

3º passo: Realizou-se uma reunião junto aos produtores para esclarecimento dos trabalhos realizados, assim como sua duração, benefícios e obrigações do doutorando e da equipe nas propriedades.

4º passo: Seleção das propriedades do grupo controle (total de duas) e do grupo experimental.

5º passo: Coleta de dados climáticos de temperatura, umidade e precipitação na região Norte de Minas Gerais realizados pela estação meteorológica instalada no ICA/UFMG, a partir de novembro de 2010

6º passo: Foi realizada a contagem mensal de carrapatos, para conhecer a real dinâmica populacional de carrapatos *Rhipicephalus microplus* na região norte de Minas Gerais e definir as datas para imunização.

7º passo: Oito dias antes da primeira inoculação os animais em teste, tanto os tratados como os controles, foram tratados com um carrapaticida tipo “knock-out”. Utilizou-se uma dose do carrapaticida Acatak (1ml/10kg), de forma a zerar a infestação de carrapatos dentro de algumas semanas em todos os animais e possibilitar o acompanhamento do número de carrapatos ao longo do experimento.

8º passo: Inoculação via subcutânea da vacina recombinante rSBm 7462 nos animais das propriedades experimentais conforme planejamento de imunização.

9º passo: Mensalmente foram contadas as teleóginas em 30 animais em cada propriedade, após escolha aleatória e em diversos lotes. Somente, fêmeas de *Rhipicephalus microplus* maiores de 3,5 milímetros foram computadas.

10º passo: Foram coletado soro sanguíneo para pesquisa de anticorpos. O sangue foi coletado através da punção da veia jugular utilizando frascos do tipo “vacuntainer” de 10ml sem anticoagulante.

4.7 Parâmetros de Produtividade na Fazenda

Em cada propriedade foram monitorados os índices de produtividade de leite e performance reprodutivo. A produção de leite e o “performans” reprodutivo foram avaliados utilizando dados de softwares de controles de cada rebanho.

4.8 Estudo da Cinética Humoral

4.8.1 Coleta de Sangue para Sorologia

A coleta de sangue dos animais foi feita 30 dias após cada imunização, 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 “vacuntainer” de 10ml sem anticoagulante. O sangue coletado 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 aliqüotado e estocado à -20°C em tubos de 2 ml devidamente identificados. Em seguida foi enviado congelado para o Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/Departamento de Veterinária/BIAGRO/UFV.

4.8.2 Teste de ELISA para medição da resposta imune Humoral

A cinética de anticorpos anti- rSBm7462 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. Utilizou-se o soro de animais criados a campo no Norte de Minas Gerais e para cada amostra foram feitas duplicatas.

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 quatro vezes com solução Tampão de Lavagem (9,0g de NaCl; 0,5µl 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 de 37°C. Lavou-se as placas quatro vezes e, posteriormente, adicionou-se os soros dos animais do experimento diluídos 2:198 em solução Tampão de Incubação (87,5 ml de PBS pH 7,6; 12,5 ml de caseína 2% em PBS pH 7,6; 50µl de Tween 20) totalizando 200µl/well e deixou-se incubar por duas horas à 37°C.

As placas foram lavadas seis vezes com solução Tampão de Lavagem e procedeu-se à incubação, por duas horas à temperatura de 37°C, 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 200µl/well. Lavou-se as placas seis vezes com Tampão de Lavagem e adicionou-se a solução reveladora no volume de 200µl/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 2,5µl 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. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das propriedades

A seleção das propriedades baseou-se no perfil dos sistemas de produção, dimensões das propriedades, características do rebanho, produtividade e número de animais, variáveis notáveis à pecuária leiteira variável no Estado de Minas Gerais, realidade descrita por outros autores (MARCATTI NETO et. al., 2007). As propriedades em análise apresentavam um histórico de problemas de infestações naturais de *Rhipicephalus microplus*, descrita pelo produtor ou pelo Médico Veterinário responsável. Como consequência destas infestações, verificaram-se relatos de insucessos em seus históricos de tratamentos com acaricidas, com possível desenvolvimento de resistência.

Por meio do questionário aplicado, pode-se reconhecer o perfil das propriedades. Este foi realizado em novembro de 2010, com 16 produtores interessados em participar do experimento, selecionando-se sete ao final. Verificaram-se que as propriedades apresentavam assistência técnica permanente, controle zootécnico e grau de tecnificação de médio a alto. Os rebanhos predominavam por apresentar de 80 a 200 animais, sendo 50 a 100 vacas em lactação, com produção diária entre 400 e 1500 litros de leite.

Confirmou-se que em todas as propriedades do estudo havia relatos de problemas sanitários devido à infestação de ectoparasitas principalmente o carrapato *Rhipicephalus microplus*. O principal método de controle era o uso de produtos químicos nos períodos de maior infestação (dezembro a abril), sendo considerado eficiente pelos produtores; porém, notam-se variações com o uso de algumas bases químicas. A utilização de um teste de sensibilidade é pouco implementado, com relatos da utilização de subdosagens dos diversos produtos. As propriedades em estudo apresentavam relatos de casos de infestações parasitárias do carrapato *Rhipicephalus microplus* e ocorrência de quadros clínicos e óbito diagnosticados pela infecção por *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*, agentes responsáveis pelo complexo Tristeza Parasitaria Bovina. O controle imunológico do carrapato foi revelado ser de conhecimento de 30% dos produtores questionados e, em sua totalidade, demonstraram interesse em utilizar tal tecnologia caso estivesse disponível no mercado.

5.2 Dados climáticos

Os dados climáticos avaliados (precipitação e temperatura média na região Norte de Minas Gerais) foram obtidos da Estação Climática do ICA/UFMG. As variáveis apresentam influência na população de carrapatos e eclosão dos ovos do parasita (Figura 1 e 2).

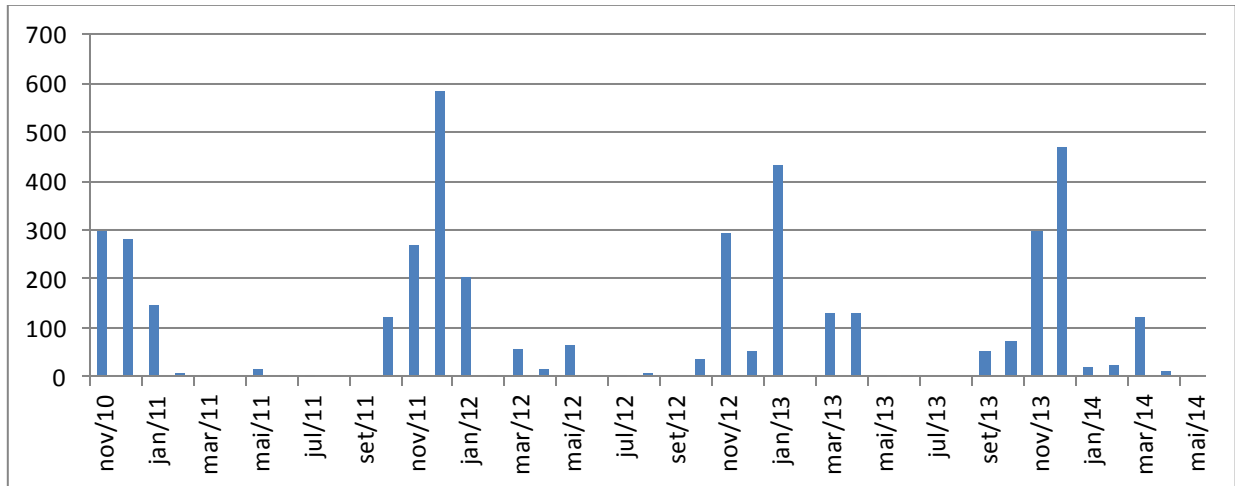


Figura 1. Índice pluviométrico médio na cidade de Montes Claros, região Norte de Minas Gerais, no período de novembro/2010 a maio/2014.

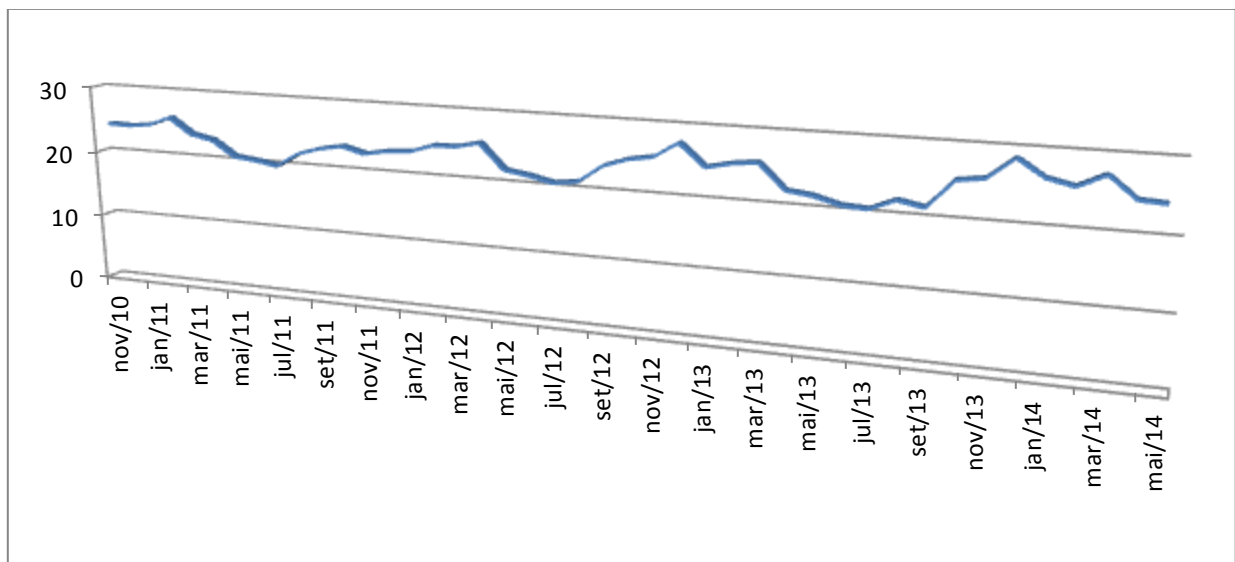


Figura 2. Temperaturas médias na cidade de Montes Claros, região Norte de Minas Gerais, do período de novembro/2010 a maio/2014.

Verifica-se que o período de maior frequência pluviométrica se repetiu entre 2010 e 2014, concentrando-se de novembro a março, com períodos de estiagem entre as estações

chuvosa. A temperatura média diária variou entre 20 a 28°C; no entanto, nos períodos de outono/inverno observou-se uma maior amplitude térmica diária.

Conhecendo-se as condições climáticas de temperatura e índices pluviométricos, que garantem umidade relativa acima de 70% nos períodos entre novembro a março, o que conseqüentemente a biologia dos carrapatos é favorecida, podendo observar picos de infestação nos animais. Alterações climáticas, como variação térmica no outono/inverno e redução pluviométrica, podem justificar redução populacional dos carrapatos.

O ciclo de vida do *Rhipicephalus microplus* apresenta duas fases distintas e complementares. A primeira fase é vida livre ou não parasitária, que tem início com o desprendimento da teleógina do hospedeiro e sua queda no solo; a segunda fase de vida é parasitária, que começa quando a larva se fixa no hospedeiro. Três dias após a queda no solo, a teleógina inicia a postura (SONENSHINE, 1993). Na ocorrência de baixas temperaturas, a larva é a mais vulnerável. Porém, havendo alta umidade relativa, as larvas podem sobreviver até oito meses (HITCHCOCK, 1955).

Nas regiões próximas ao paralelo 32° N e 32° S, ditas marginais, o principal fator do ecossistema que interfere e, às vezes, anula completamente a população de carrapatos é a distribuição geográfica associada diretamente aos fatores climáticos. O principal componente desse fator é a temperatura (GONZÁLES, 2002).

Em estudo sobre a fase de vida livre de *Rhipicephalus microplus*, HITCHCOCK (1955), verificou que ovos mantidos em temperaturas superiores a 21°C e com umidade relativa alta apresentaram pico de eclosão; porém, em temperaturas inferiores a 15°C, embora haja desenvolvimento embrionário e as larvas permaneçam viáveis, estas são incapazes de eclodir.

De acordo com GARRIS et al. (1990) e DAVEY et al. (1991), a manutenção da umidade em índices anuais médios superiores a 75% propicia que a temperatura seja definida como o fator climático determinante do maior ou menor grau de sucesso de desenvolvimento e sobrevivência da fase não parasitária.

PANDA et al. (1992) estudando a fase de vida livre do *Rhipicephalus microplus*, observaram que umidade relativa e pluviosidade têm importante influência durante essa fase. A produção de ovos foi máxima e a porcentagem de eclosão foi alta durante a estação quente e úmida; Umidade relativa baixa afetou significativamente o desenvolvimento embrionário dos ovos, a porcentagem de eclosão e a sobrevivência da larva.

O conhecimento do efeito do ambiente sobre os carrapatos favorece o controle eficaz do parasito. Desta forma, é possível diminuir as infestações e o custo a elas associadas através

do uso otimizado e direcionado de acaricidas, em conjunção com outras medidas, como manejo dos rebanhos e das pastagens.

5.3 Cinética de anticorpos anti-peptídeo recombinante rSBm7462

A técnica de ELISA para mensuração da resposta imune humoral (IgG) aos peptídeos recombinantes utilizados neste experimento, garantiu boa sensibilidade e especificidade da técnica, aliada ao baixo custo e praticidade, o que a torna eficaz em identificar os anticorpos anti-rSBm7462. Esta técnica de diagnóstico também realizada por outros autores com antígenos derivados de carrapatos, como formas recombinantes de Bm86 (WILLADSEN e MCKENNA, 1991; SOSSAI, 2009, TAFUR, 2014) e peptídeos sintéticos baseados na estrutura de Bm86 (SHARP et al., 1990; OLIVEIRA, et al 1998; PATARROYO et al., 2002), 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), e extratos purificados de Bm86 (WILLADSEN et al., 1989),

Os resultados obtidos nos testes de ELISA encontram-se Nas figuras 2 e 3. Verificou-se que a titulação de anticorpo foi crescente após quatro semanas da primeira imunização até a 12ª semana. Resultados semelhantes porem observados por NEVES (2011), que demonstrou que a técnica de ELISA foi eficaz em identificar os anticorpos anti-rBmseq1 e rBmseq4 produzidos nos bovinos imunizados. O nível de anticorpos específicos anti-IgG aumentou a partir da quarta semana - 28 dias - após a primeira inoculação ocorrendo aumento do título de anticorpos após cada inoculação, o que demonstrou resposta imune secundária via células de memória produzidas a partir da primo-vacinação.

Após a terceira inoculação, 8ª semana, verificou-se uma resposta secundária característica, assemelhando ao observado por NEVES (2011), que relatou maiores níveis de IgG obtidos na resposta secundária, sendo mais evidente após a terceira inoculação, com pico maior e atingido mais rapidamente na décima semana do estudo e com uma manutenção desses anticorpos em níveis estatisticamente diferentes até a 14ª semana quando comparados os grupos vacinados aos grupos controle. O maior pico de produção de IgGs específicas após a terceira inoculação concorda com os achados de OLIVEIRA (1998), PORTELA (2000), COUTO-PIMENTEL (2002), SOSSAI (2009) e PATARROYO et al. (2009).

A resposta humoral observada em bovinos imunizados criados a campo neste estudo, acompanha os eventos celulares nos linfonodos dos animais, com hiperplasia das regiões

paracorticais e formação de centros germinativos notável diferenciação da zona clara e zona escura quinze dias após a primeira imunização com o imunógeno rSBm7462 (MARTINEZ-RODRIGUEZ, 2014), e assemelham-se aos relatos de Patarroyo et al. (2009) ao utilizarem o peptídeo sintético SBm7462® sete dias após a primeira imunização. Na imunistoquímica para a detecção de antígeno rSBm7462, as células PAP marcadas positivamente após a imunização de bovinos criados a campo, indicaram que o antígeno rSBm7462 é reconhecido por células dendríticas-like e interage com células linfocíticas (MARTINEZ-RODRIGUEZ, 2014), também descrito em estudos de TAFUR et al. (2013) e observados por PATARROYO et al. (2009), quando utilizaram o peptídeo sintético SBm7462.

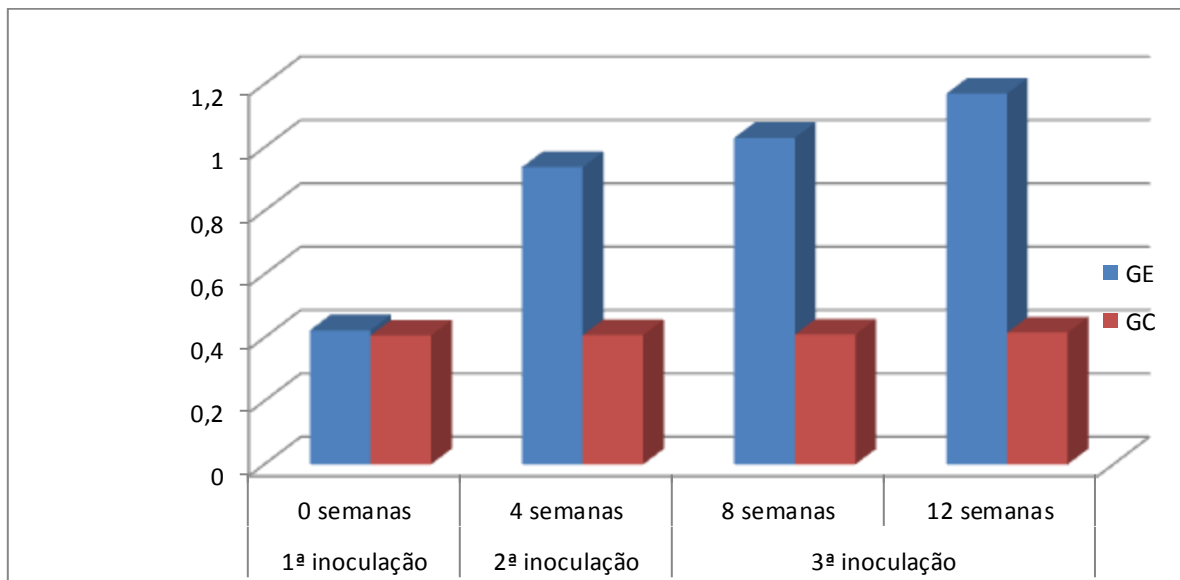


Figura 3: Cinética humoral (IgG) no dia da primeira inoculação e 30 dias após cada imunização na (4ª, 8ª e 12ª semanas) na Fazenda Experimental da UFMG.

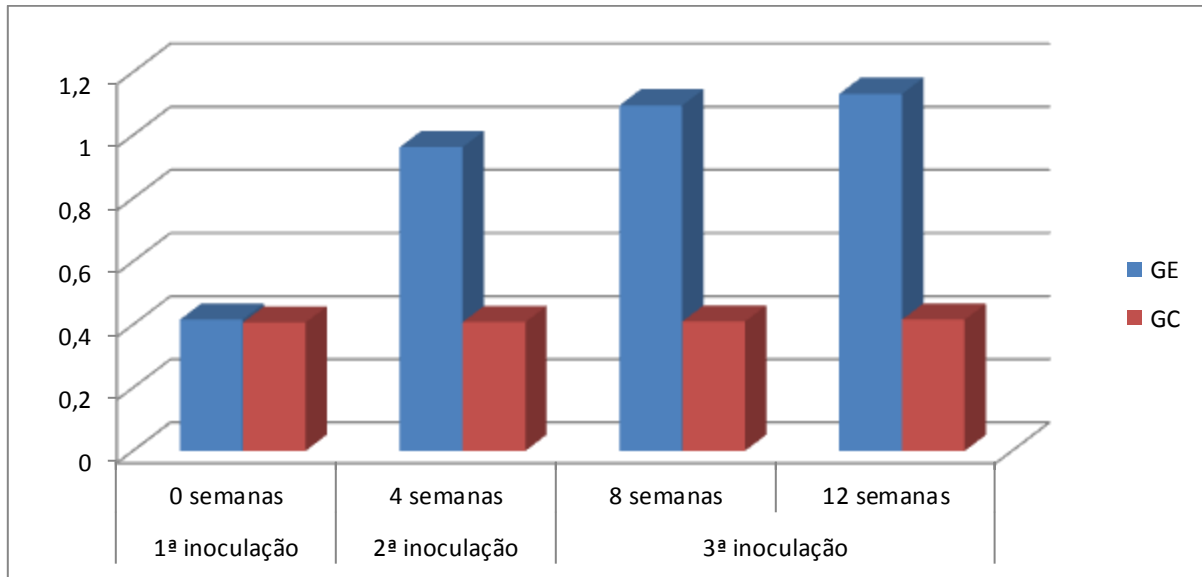


Figura 4: Cinética humoral (IgG) no dia da primeira inoculação 30 dias após cada imunização (4ª, 8ª e 12ª semanas) na Fazenda Experimental Blumenau.

5.4 Dinâmica populacional e protocolos de imunização

Mensalmente, foram coletadas as teleóginas em 30 animais escolhidos aleatoriamente, em cada propriedade. Somente fêmeas de *Rhipicephalus microplus* maiores de 3,5 mm foram computadas, uma vez que teleóginas a partir deste tamanho já apresentam capacidade reprodutiva. Quando a contagem de teleóginas alcançava o número superior ou igual a 40 fêmeas adultas por animal em mais de um terço dos animais contados, todo o rebanho era tratado com o mesmo tipo de acaricida.

Os resultados referentes às características obtidas a partir do questionário, dinâmica populacional, dados zootécnicos e de custo de cada propriedade estão descritos a seguir.

Fazenda Barreiro Bonito

Propriedade localizada no município de Engenheiro Navarro a 120 km de Montes Claros, caracterizada por apresentar um rebanho de 160 animais com grau de sangue 3/4 e 7/8 holandês zebu. Os animais são criados em sistema de semi confinamento a pasto, associado à suplementação. No início do período experimental, em 2012, o rebanho produzia 800 litros/dia, com média de 17,8 kg/vaca/dia e, com 56% das vacas em lactação, e intervalo entre partos de 416 dias. Após o período de imunização do rebanho, em 2014, nas mesmas condições de criação, eram produzidos 1230 litros/dia, com produção média de 22 kg de leite/vaca/dia, com 68% das vacas em lactação, e intervalo entre partos de 394 dias. Verificou-se que após o programa vacinal ocorreu aumento na produção de leite por vaca

(23,6%), assim como na produção do rebanho (53,7%), explicado pela redução da população de carrapatos e incremento dos índices de desempenho reprodutivo.

O controle parasitário de carrapatos anteriormente era realizado com uso de homeopatia por seis meses durante o ano, com custo mensal de R\$ 400,00 e controle químico com pulverização (Cipermetrina) cada 30 dias. O custo médio do produto por tratamento era de R\$ 3,00 por animal, totalizando um custo mensal de R\$ 480,00, durante os cinco meses que compreendem o período chuvoso.

Após o período vacinal, em 2014 suspendeu-se o tratamento homeopático e reduziu-se para dois tratamentos químicos, no período chuvoso, em sendo que apenas 30% do rebanho necessitavam de controle químico, tendo um custo anual de R\$ 360,00.

A implantação do programa vacinal revelou grande impacto no aspecto financeiro de controle de carrapatos, sendo que as despesas anuais eram de aproximadamente R\$ 4800,00 reduzindo para R\$ 360,00 após a implantação do programa vacinal, revelando eficiência de 93,7% no perfil econômico nesta propriedade.

A infestação por *Rhipicephalus microplus* foi avaliada pela dinâmica populacional do carrapato presente no rebanho bovino (Figura 5). O protocolo vacinal está demonstrado na tabela 4. Verifica-se que antes da utilização do imunógeno a população de teleóginas atingia picos nos meses de maiores índices pluviométricos, com valores aproximados de 80 e 90 carrapatos por animal, em média, nos anos de 2011 e 2012, respectivamente. Após o início do programa vacinal experimental, nota-se a redução populacional de carrapatos para infestações com pico em torno de 20 teleóginas por animal nos anos de 2013 e 2014. Esta redução populacional com a utilização do imunógeno revela eficiência de 78% no controle de carrapatos nesta propriedade.

Tabela 4. Protocolo de imunização com vacina rSBm7462 anti *Rhipicephalus microplus*

Aplicação	Data
1ª dose	24/02/2012
2ª dose	01/04/2012
3ª dose	05/06/2012
1ª dose - reforço anual	5/10/2013
2ª dose – reforço anual	03/11/13

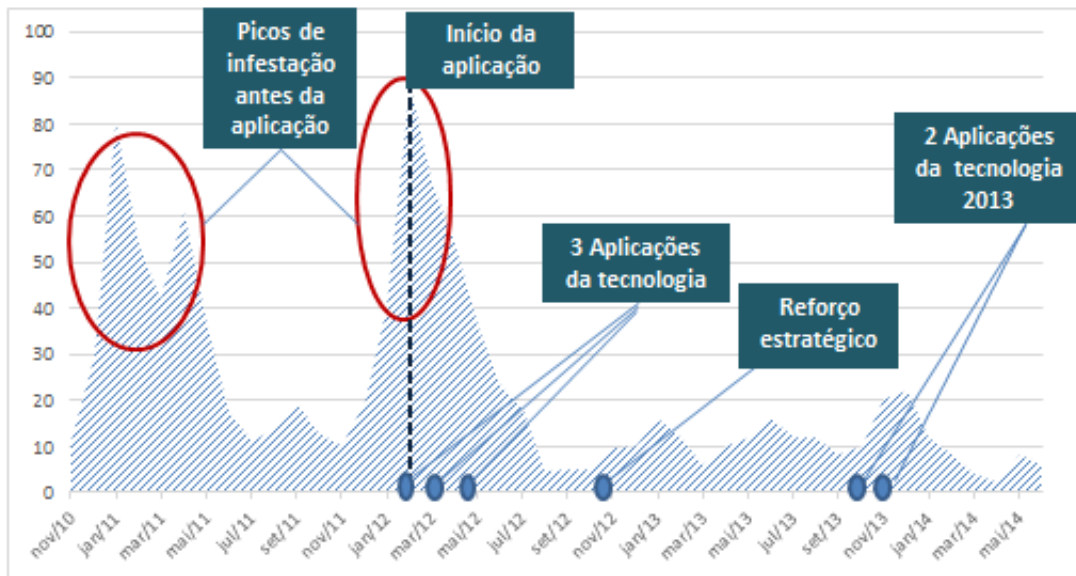


Figura 5. Dinâmica populacional do *Rhipicephalus microplus* sobre rebanho bovino na região norte de Minas Gerais.

Fazenda Blumenau

A propriedade Blumenau, localizada a 15 km de Montes Claros é composta por um rebanho de 90 animais em grau de sangue de 15/16 holandês-zebu, criados em sistema semi confinado no período seco e pastejo com suplementação nutricional no período chuvoso. Inicialmente (fevereiro de 2012) o rebanho apresentava a produção média de 15,3 kg/vaca/dia e produção diária em média de 600 litros de leite. O rebanho de vacas em lactação representa 44% e intervalo de partos de 407 dias, além de uma taxa de mortalidade de 7% de bezerro do nascimento a um ano de idade, na qual inclui doenças metabólicas, infecciosas e parasitárias.

Após o período experimental verificou-se redução para dois tratamentos químicos anuais em 2013 e 1 tratamento químico em 2014, em uma porção do rebanho que apresentou maior infestação, reduzindo o custo com carrapaticidas. A produção média atingiu os 16,7kg/vaca/dia e o percentual de vacas em lactação atingiu 50%, em período correspondente em 2014, atingido uma produção diária de 880 litros de leite. Verificou-se que após a vacinação ocorreu aumento na produção de leite por vaca (9%), assim como a produção do rebanho (46,6%). Sendo explicado pela redução da população de carrapatos e incremento dos índices de performance reprodutiva, tais como natalidade de 44% para 50%, aumento de 13,6% e intervalo de partos de 407 dias reduzidos para 385 dias. Neste período também não foi relatado casos clínicos de tristeza parasitária bovina.

O controle químico de carrapatos era utilizado, em 2011 e 2012, com uso de Cipermetrina via pour on, a cada 30 dias, durante o período de dezembro a abril, com custo mensal de R\$ 200,00 e custo anual de R\$ 1000,00, reduzindo para dois tratamentos anuais no ano de 2013 e um tratamento anual em 2014, representando um custo R\$ 400,00 e R\$ 200,00 e eficiência de 60% e 80%, respectivamente para o período de 2013 e 2014.

A infestação por *Rhipicephalus microplus* foi avaliada pela dinâmica populacional do carrapato presente no rebanho bovino (figura 5) e o protocolo vacinal nesta propriedade esta demonstrado na tabela 5. Verificou-se que no período de outubro de 2012 houve grande infestação nos bovinos por formas imaturas do *Rhipicephalus microplus* e em alguns animais notou-se a presença de teleóginas pouco desenvolvidas, amareladas e pouco ingurgitadas. Em seguida procedeu-se um reforço vacinal como forma de evitar pico de teleóginas e reduzir o número populacional de futuras gerações.

Os valores aproximando de 80 carrapatos por animal em media nos anos de 2011 e 2012, respectivamente. Após o início do programa vacinal experimental nota-se a redução populacional de carrapatos para infestações com pico em torno de 17 teleóginas por animal nos anos de 2013 e 2014, esta redução populacional com a utilização o imunógeno revela uma eficiência de 78,7% no controle de carrapatos nesta propriedade.

Tabela 5. Protocolo de imunização com vacina rSBm7462 anti *Rhipicephalus microplus*

Aplicação	Data
1ª dose	25/02/12
2ª dose	28/03/12
3ª dose	21/04/12
4ª dose – reforço estratégico	21/11/12
1ª dose - reforço anual	02/10/13
2ª dose – reforço anual	02/11/13

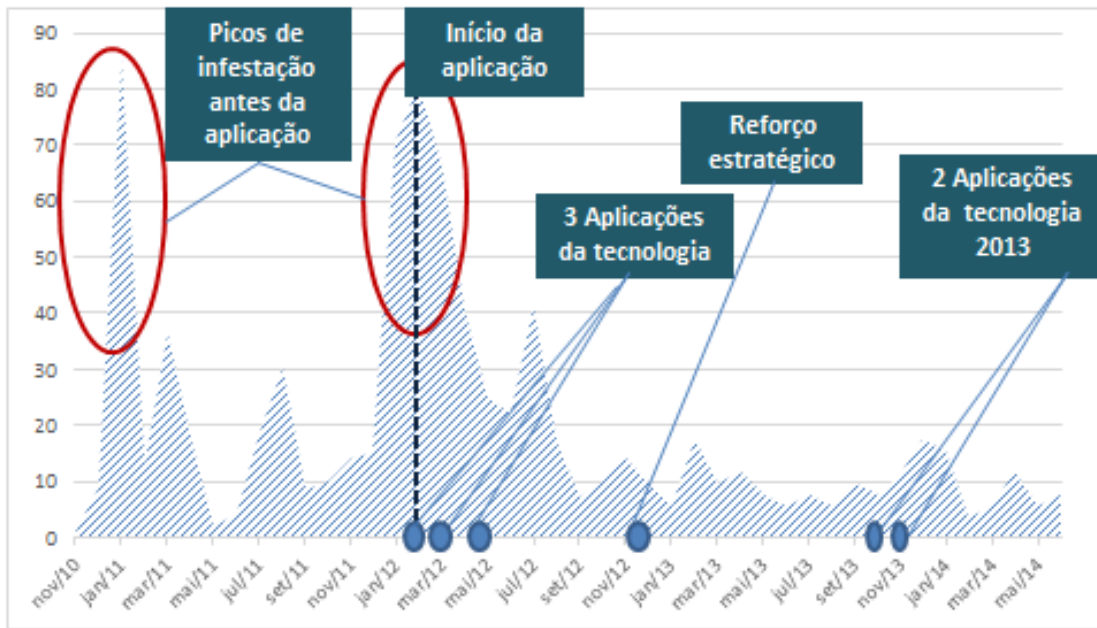


Figura 6. Dinâmica populacional do *Rhipicephalus microplus* sobre rebanho bovino na região norte de Minas Gerais.

Fazenda Curral Novo

Localizada no município de Bocaiuva, a 60 km Montes Claros, com criação de rebanho holandês PO e sistema tecnificado de pastejo irrigado durante o período seco e confinamento durante o período chuvoso. No início do experimento rebanho era 170 animais, e 62 vacas em lactação, tendo uma produção média de 1000 litros de leite por dia, com média de 16,13 kg de leite/dia. O percentual de vacas em lactação em de 60% e intervalo de partos de 484 dias.

Após iniciar o programa vacinal no rebanho observou-se em 2014 a produção de leite do rebanho atingiu o valor de 1350 litros de leite dia, aumento de 35% em relação ao período anterior no qual na realizava o controle imunológico, sendo que a produção média por vaca por dia atingia 18,4 litros (aumento de 12,8%). Os índices reprodutivos atingiram a taxa de natalidade de 72%, o que representa aumento de 20% referente ao ano de 2011, e intervalo de partos de 422, com redução de 62 dias neste período.

Devido ao rebanho ser holandês puro foi relatado grande preocupação com o controle de carrapatos, sendo mais intenso no período de dezembro a abril, com uso de produto a base de Flumethrin (Baycol^R Pour on) a cada 17 dias. O volume utilizado entre 12 a 14 litros ao mês, considerando o preço de mercado do produto a R\$ 50,00, o gasto com produtos nesta propriedade era por volta de R\$ 600,00 a R\$ 700,00, não computando outros gastos como mão de obra, o que representa um valor anual de R\$ 8400,00 para controle de carrapatos.

Após o início do período experimental reduziu a intensidade de tratamentos químicos, sendo que no ano de 2013 realizaram-se dois tratamentos químicos no mesmo período, em aproximadamente 25% do rebanho (45 animais) que eram mantidos em condições de maior desafio sob pastejo irrigado, comutando um gasto anual de R\$ 370,00. Durante o mesmo período de 2014 o controle químico foi realizado três tratamentos, com uso produto químico não registrado e apresentando um custo de R\$ 470,00. A eficiência econômica no controle de carrapatos após a implantação do uso do imunógeno foi uma redução no custo de 96% e 94,4% referente ao ano de 2013 e 2014, respectivamente.

A infestação por *Rhipicephalus microplus* foi avaliada pela dinâmica populacional do carrapato presente no rebanho bovino (figura 6) e o protocolo vacinal nesta propriedade esta demonstrado na tabela 6. Observa-se picos de infestação nos bovinos com valores aproximando de 80 carrapatos por animal em media nos anos de 2011 e e 120 teleóginas em 2012. Após o início do programa vacinal experimental nota-se a redução populacional de carrapatos para infestações com pico em torno de 30 teleóginas por animal nos anos de 2013 e 2014, esta redução populacional com a utilização o imunógeno revela uma eficiência de 75% no controle de carrapatos nesta propriedade.

Tabela 6. Protocolo de imunização com vacina rSBm7462 anti *Rhipicephalus microplus*

Aplicação	Data
1ª dose	25/02/12
2ª dose	28/03/12
3ª dose	21/04/12
4ª dose – reforço estratégico	21/11/12
1ª dose - reforço anual	02/10/13
2ª dose – reforço anual	02/11/13

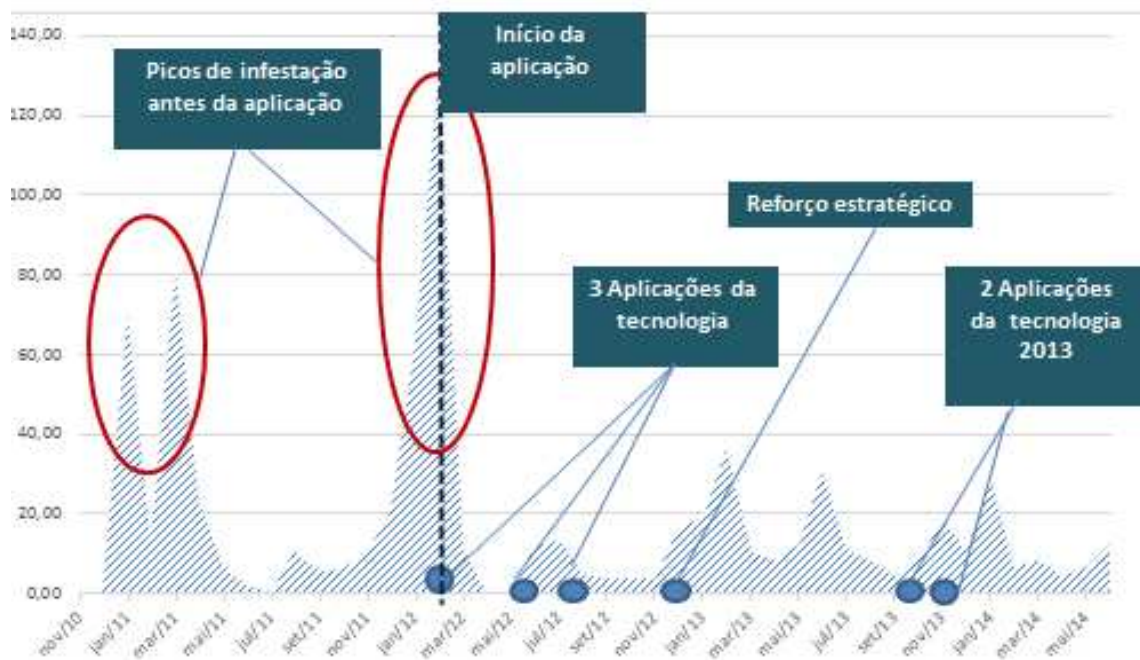


Figura 7. Dinâmica populacional do *Rhipicephalus microplus* sobre rebanho bovino na região norte de Minas Gerais.

Fazenda Experimental Prof. Hamilton A. Navarro – ICA/UFMG

A fazenda escola do ICA/UFMG apresenta um rebanho de 130 animais holandês PO criados em sistema de confinamento em período de seca e semi confinamento no período chuvoso. No ano de 2012 o rebanho apresentou um intervalo de partos de 484 dias, a idade média de prenhez das novinhas de 28,7 meses e idade ao primeiro parto de 38 meses com média de produção de 15 kg/vaca/dia, número de vacas em lactação de 70 animais e produção diária do rebanho de 1050 litros de leite . Atualmente, após o programa vacinal este rebanho apresenta intervalo de partos de 468 dias (redução de 16 dias), idade de prenhez de 24,5 meses (redução de 4,2 meses), idade ao primeiro parto de 33,7 meses (redução de 4,3 meses) e produção média de 16,3 kg/vaca/dia (aumento de 8,6%), apresentando 82 animais em lactação (aumento de 17,1%) e aumento da produção em 27,3% (1336 litros/dia).

Previamente ao experimento este rebanho recebia entre 8 a 10 tratamentos químicos ao ano, com pulverização a base de Cipermetrina a cada 30 dias. Após vacinação no ano de 2013 realizou-se dois tratamento químicos, enquanto no ano 2014 não foi necessário realização de tratamento químico nos animais. Verificou-se que 15 dias após a primeira imunização ocorreu um pico de infestação de teleóginas em um grupo de animais. Os animais após a segunda dose vacinal apresentaram teleóginas amareladas de pequeno diâmetro e notou-se a morte do parasita ainda sobre o animal. Não foram computados valores monetários devido ao fato dos

produtos serem doados por um laboratório em parceria à Universidade Federal de Minas Gerais (campus ICA/UFMG)

A infestação por *Rhipicephalus microplus* foi avaliada pela dinâmica populacional do carrapato presente no rebanho bovino (figura 7) e o protocolo vacinal nesta propriedade esta demonstrado na tabela 7. Verifica-se maior infestação de carrapatos no rebanho nos períodos de novembro a março nos anos de 2011 e 2012, com picos de 40 e 60 teleóginas por animal. Após o início do programa vacinal experimental nota-se a redução populacional de carrapatos para infestações com pico em torno de 20 teleóginas por animal nos anos de 2013 e 2014, esta redução populacional com a utilização o imunógeno revela uma eficiência de 66,6% no controle de carrapatos nesta propriedade.

Em julho de 2014 nota-se que aqueles animais jovens os quais não haviam recebido a dose vacinal de reforço apresentaram infestação de carrapatos, porém estes reduziram rapidamente sem requerer tratamentos químicos.

Tabela 7. Protocolo de imunização com vacina rSBm7462 anti *Rhipicephalus microplus*

Aplicação	Data
1ª dose	23/02/12
2ª dose	26/03/12
3ª dose	20/04/12
4ª dose – reforço estratégico	13/02/13
1ª dose - reforço anual	03/10/13
2ª dose – reforço anual	04/11/13



Figura 8. Dinâmica populacional do *Rhipicephalus microplus* sobre rebanho bovino na região norte de Minas Gerais.

Fazenda Santana

A propriedade composta por rebanho de 120 animais $\frac{3}{4}$ e $\frac{7}{8}$ holandês zebu, localizada no município de Capitão Enéas a 90 km de Montes Claros. No início dos estudos em 2011 a produção média de 14 kg/vaca/dia, produção do rebanho de 1092 litros por dia, taxa de natalidade de 65% e intervalo de partos de 487 dias. Após o uso da biotecnologia observou-se em 2014 que o rebanho apresentou uma produção diária de 1402 litros de leite (aumento de 28,3%), produção por animal por dia de 16,3 litros (aumento de 16,4%), taxa de natalidade 72% (aumento de 10,76%), intervalo de parto de 462 dias (redução de 25 dias).

Inicialmente em 2011 e 2012 eram realizados tratamentos químicos a cada 20 dias a base de ivermectina e custo mensal de R\$ 300,00, no período de dezembro a abril, representando um valor anual de R\$ 1500,00. Após a instalação do programa de controle vacinal contra *Rhipicephalus microplus* reduziu para dois tratamentos químicos nos anos de 2013 e 2014, representando um valor anual de R\$ 600,00 e uma redução de 60% no custo de carrapaticidas para o tratamento químico.

A infestação por *Rhipicephalus microplus* foi avaliada pela dinâmica populacional do carrapato presente no rebanho bovino (figura 8) e o protocolo vacinal nesta propriedade está demonstrado na tabela 8. Verifica-se maior infestação de carrapatos no rebanho nos períodos de janeiro a março nos anos de 2011 e 2012, com picos de 130 e 120 teleóginas por animal.

Após o início do programa vacinal experimental nota-se a redução populacional de carrapatos para infestações com pico em torno de 18 teleóginas por animal nos anos de 2013 e 2014, esta redução populacional com a utilização o imunógeno revela uma eficiência de 86% no controle de carrapatos nesta propriedade.

Tabela 8. Protocolo de imunização com vacina rSBm7462 anti *Rhipicephalus microplus*

Aplicação	Data
1ª dose	27/04/12
2ª dose	10/06/12
3ª dose	12/07/12
1ª dose - reforço anual	10/10/13
2ª dose – reforço anual	12/11/13



Figura 9. Dinâmica populacional do *Rhipicephalus microplus* sobre rebanho bovino na região norte de Minas Gerais.

Fazenda Nova Esperança

Localizada no município de Juramento a 50 km de Montes Claros é composta por um rebanho de 200 animais, ½ sangue holandês zebu. Criados a pasto e suplementados na época de seca. A produção do rebanho em 2011 era de 630 litros/dia, produção média por animal por dia de 12,7 litros, taxa de natalidade de 50% e intervalo de partos de 507 dias. Em 2014, mantendo-se as mesmas condições iniciais a produção do rebanho atingiu 650 litros/dia (aumento de 3%), a produção média por animal de 13,1 litros (aumento de 3%), taxa de natalidade de 51% (aumento de 2%) e intervalo de partos de 497 dias (redução de 10 dias). A eficiência de performance produtiva e reprodutiva foi inferior ao relatado nos grupos experimentais.

O tratamento contra o carrapato *Rhipicephalus microplus* é realizado a base de pulverização dos animais com cipermetrina uma vez ao mês de dezembro a abril e um custo de R\$ 100,00 ao mês, representando um total de R\$ 500,00 por ano durante o período de 2011 a 2014. Nesta propriedade não teve intervenção do controle do carrapato com o uso da vacina sendo selecionada com grupo controle.

A infestação por *Rhipicephalus microplus* foi avaliada pela dinâmica populacional do carrapato presente no rebanho bovino (figura 9). Verifica-se maior infestação de carrapatos no rebanho nos períodos de janeiro a março nos anos de 2011 a 2014, com picos de 30 e 40 teleóginas por animal. Nota-se que os picos foram constantes neste rebanho no decorrer dos anos, pois não teve a intervenção com controle imunológico e a população infestante manteve-se, podendo identificar baixa infestação devido ao tipo de rebanho com maior grau de sangue zebuino.

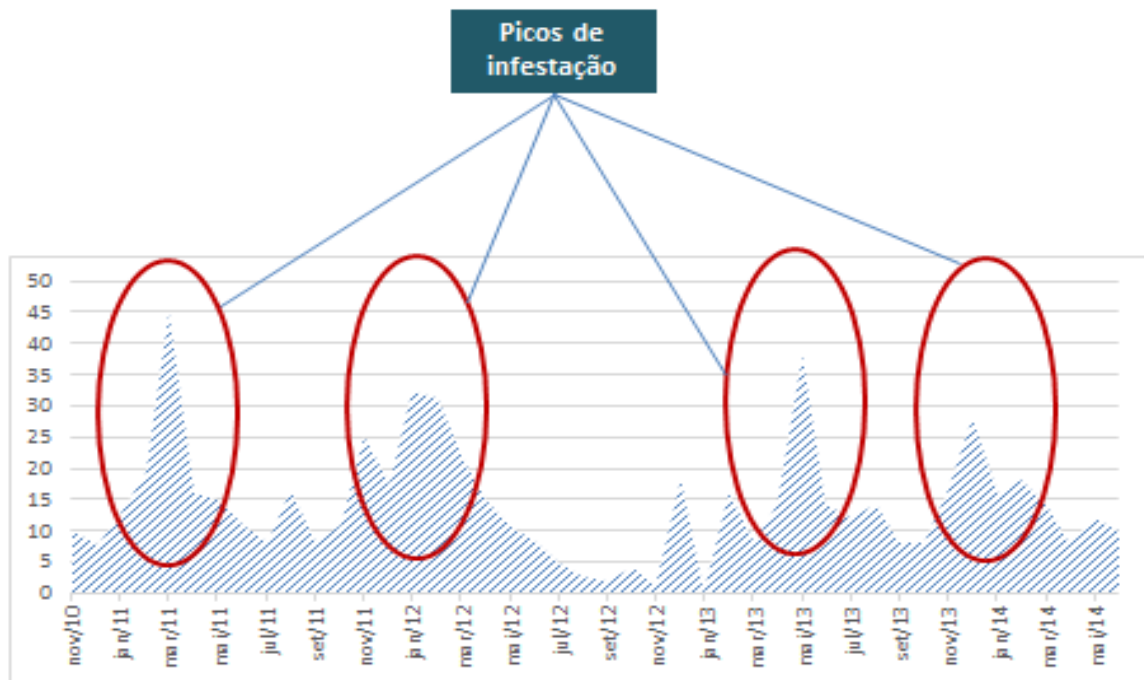


Figura 10. Dinâmica populacional do *Rhipicephalus microplus* sobre rebanho bovino na região norte de Minas Gerais.

Fazenda Santa Ingraça

Propriedade com rebanho girolando 15/16 holandeses zebu, 100 animais criados em sistema de confinamento. A produção do rebanho em 2011 era de 1079 litros/dia, produção média por animal por dia de 17,6 litros, taxa de natalidade de 62% e intervalo de partos de 482 dias. No entanto a partir de maio de 2013 estes animais eram manejados em piquetes irrigados e em 2014, os valores produtivos e reprodutivos tiveram uma pequena redução em função do sistema de criação, no entanto ainda mais lucrativo. A produção média por animal de 17 litros (redução de 3,4%), produção total do rebanho por dia 1037 litros/dia (redução de 3,9%), a taxa de natalidade de 57% (redução de 8%) e intervalo de partos de 502 dias (aumento de 20 dias). A eficiência de performance produtiva e reprodutiva foi inferior ao relatado nos grupos experimentais.

Os tratamentos de ectoparasitas eram a base de ivermectina 1% injetável durante os períodos de Dezembro a Abril, com custo mensal de R\$ 90,00 e custo anual de R\$ 450,00.

A infestação por *Rhipicephalus microplus* foi avaliada pela dinâmica populacional do carrapato presente no rebanho bovino (figura 9). Verificou-se que os picos foram constantes neste rebanho no decorrer dos anos (2011 a 2014), pois não teve a intervenção com controle imunológico e a população infestante média por animal foi de 35 teóginas. Apesar do grau de sangue do rebanho ser mais vulnerável a infestação por carrapatos, devido ao sistema de

manejo confinado estes animais apresentaram baixa densidade populacional de *Rhipicephalus microplus*. No entanto após o período de maio de 2013 quando iniciou-se o manejo de pastejo em piquete irrigado verificou-se maior infestação por carrapatos.

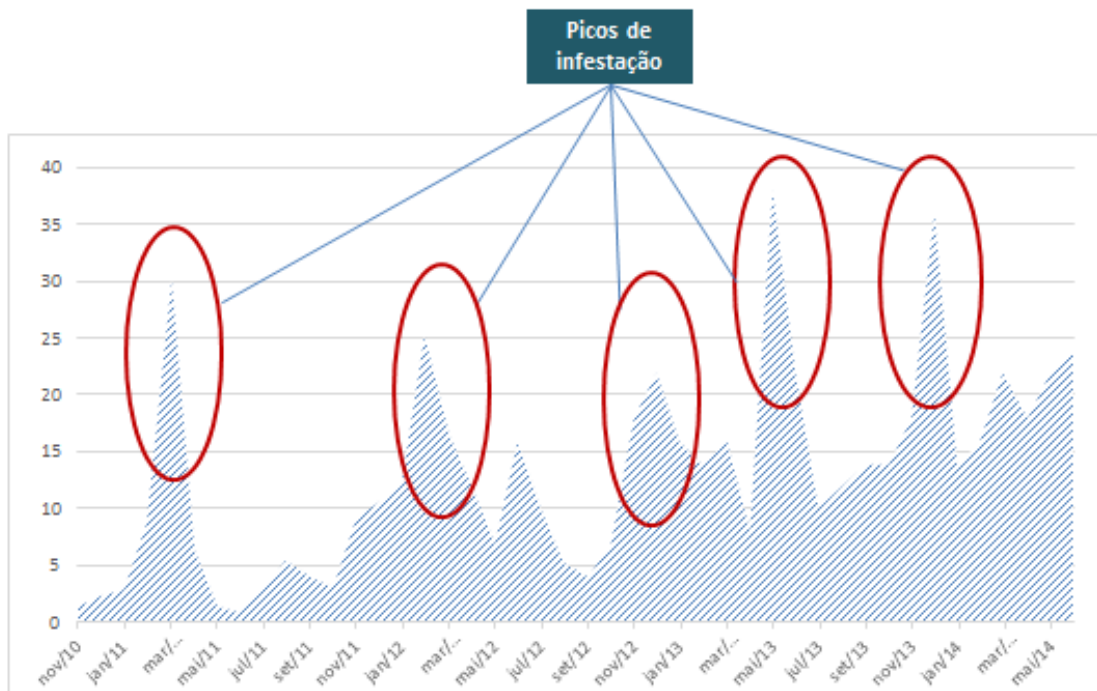


Figura 11. Dinâmica populacional do *Rhipicephalus microplus* sobre rebanho bovino na região norte de Minas Gerais.

A população de *Rhipicephalus microplus* apresentou picos nos meses de maior precipitação e alta temperatura, nos quais há maiores taxas de umidade relativa do ar, acima de 70%. Os fatores abióticos, principalmente temperatura e umidade são de grande importância no ciclo biológico, efetivamente na fase não parasitária dos carrapatos. Estudos demonstram efeito acentuado da temperatura e umidade na fase não parasitária do carrapato referente aos períodos de pré postura, postura e incubação dos ovos (HITCHCOCK, 1955; GLORIA et. al.,1993; BASTOS et al. 1996).

Em situações de baixa temperatura e umidade ocorre redução do metabolismo e aumento do período de pré postura e redução da eclosão dos ovos, desta forma as carrapatos apresentam alto peso residual (peso ao fim da postura) e índices reprodutivos muito baixos. Portanto, as condições climáticas influenciam no ciclo biológico dos carrapatos sendo determinantes da dinâmica populacional e parâmetros fundamentais e determinantes para o controle do parasita (HITCHCOCK, 1955; GLORIA et. al.,1993; BASTOS et al. 1996).

Pode classificar as propriedades de acordo com o grau sanguíneo dos animais, sendo que animais holandeses puro apresentaram picos mais elevados de infestação por carrapatos, quando comparados com outros graus sanguíneos. Os animais mestiços 7/8 e 15/16 holandês zebu, caracterizaram-se por aumento da população de carrapatos, principalmente período de maior índice pluviométrico, temperaturas elevadas e o acesso dos animais às pastagens em sistemas de pastejo rotacionado irrigado. Os animais mestiços 1/2 holandês zebu, apresentaram menor infestação durante o período. Tais características de maior sensibilidade à infestação de *Rhipicephalus microplus* a rebanho com maior teor de sangue taurino também foi relatado por outros autores (JONSSON, 1996; JONSSON, 2006).

Rebanhos puros *Bos taurus taurus* apresentam maior sensibilidade as infestações por carrapatos, sendo a substituição por rebanhos com diversos graus de sangue zebrinos garante menores níveis de infestação e conseqüentemente menores os gastos com acaricidas (JONSSON & MATSCHOSS, 1998).

O rebanho imunizado neste estudo apresentou redução do custo de produção, gastos com acaricidas e mão de obra, devido a redução do numero de tratamentos e a quantidade de animais os quais realizou tais aplicações, em função do estabelecimento de um programa de vacinação. A dinâmica populacional do *R.(B.) microplus* foi variável, sendo que o uso de oito e dez tratamentos químicos ao ano foi reduzido para dois e três vezes ao ano, quando associados com controle imunológico, enquanto mantém constante comparando-o com grupos das propriedades controle.

O controle imunológico foi iniciado no período de maior infestação com o objetivo de reduzir a população das futuras gerações do carrapato e conseqüentemente as infestações sobre os bovinos. A vacinação representa uma medida preventiva que oferece vantagens sobre os métodos convencionais de controle químicos, pois representam uma ação sustentável, são livres de resíduos, são mais específicas, mais seguras e com menores problemas de resistência quando comparadas aos fármacos. A utilização de vacinas representa maior custo-benefício do que as terapias e o uso do imunógeno reduz a população de carrapatos interferindo, a ovoposição e a fertilidade dos ovos, o que permite a diminuição do uso de carrapaticidas nos rebanhos. (COUTO-PIMENTEL, 2001; PATARROYO et. al., 2002) Nesse estudo foi alcançada uma redução de 70 a 80% no uso de tratamento químico, em animais desafiados a campo.

O crescimento da população bovina e de sua produtividade é associado ao melhoramento das pastagens, à seleção das raças bovinas, exclusivamente para uma maior produtividade, omitindo-se a questão da resistência aos parasitos. Todos esses fatores, aliados

ao uso inadequado de drogas carrapaticidas têm favorecido os carrapatos, que causam prejuízos cada vez maiores à pecuária nacional. Assim, pode-se associar o uso do imunógeno como uma ferramenta promissora no controle de carrapatos e até o momento não se evidenciou resistência induzida por pressão de seleção do ectoparasita submetidos ao controle imunológico com o peptídeo.

O cálculo dos índices zootécnicos e reprodutivos apresentaram diferenças antes a imunização e após o protocolo vacinal. Verifica-se a evolução dos parâmetros reprodutivos, tais como intervalo de partos, taxa de prenhes, taxa de nascimento, idade ao primeiro cio em novilhas, idade ao primeiro parto em novilhas. A produtividade de leite também foi computada como superior nos rebanhos imunizados, como produção diária por vaca e produtividade do rebanho. Apesar de não ocorrer alterações nos rebanhos das propriedades controle, não se pode atribuir exclusivamente a efeito do imunógeno estes ganhos zootécnicos e produtivos. Podendo também estar relacionado com alterações nutricionais, genéticas e de manejo, no entanto a assistência técnica associada ao manejo de controle do *Rhipicephalus microplus* garante maior eficácia com os cuidados ao manejo sanitário dos rebanhos.

Há preocupações relacionadas com a presença de resíduos químicos tóxicos na carne e no leite dos animais tratados com acaricidas, e acúmulo das moléculas no meio-ambiente contaminando o solo e águas no meio ambiente, o que representa um sério problema à saúde animal e humano. No Brasil, em 2011, as exportações de carne bovina acumularam prejuízo de US\$ 104 milhões decorrente da rejeição de cargas por parte dos Estados Unidos, com consequente suspensão devido à presença de resíduos de medicamentos antiparasitários à base de ivermectina acima dos limites tolerados pelas autoridades norte americanas (ABIEC, 2013). O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento–PNCRC/MAPA correlacionou com os riscos aos quais o setor produtivo bovino do país é exposto bem como a segurança alimentar (MARTINS et al, 2010).

Na região tropical, a presença de ectoparasita, em especial os carrapatos *Rhipicephalus microplus* são responsáveis gerar perdas produtivas e econômicas nos sistemas de produção pecuária. O uso de agentes químicos de efeito carrapaticida apresenta o entrave de produção de resíduos (carne e leite) e desenvolvimento de resistência, o que reduz sua eficiência e aplicabilidade desses produtos. Desta forma, as vacinas recombinantes são consideradas alternativas que contribuem para a solução desses problemas, permitindo reduzir as perdas

econômicas na qualidade do leite e da carne, impacto ambiental e resistência dos agentes devido à pressão de seleção.

Não existe no país um programa oficial de controle do carrapato atualmente em vigor e, por esta razão, os critérios para a gestão de infestações são definidos exclusivamente pelos produtores. Neste cenário, é um motivo de preocupação permanente entre produtores, indústrias, agências governamentais e técnicas. Devido ao comprometimento do futuro do controle químico são estimuladas pesquisas para o desenvolvimento de tecnologias alternativas.

6. CONCLUSÕES

A contagem mensal das teleóginas infestantes nos bovinos possibilitou conhecer a real dinâmica populacional do carrapato *Rhipicephalus microplus* em cada propriedade. Desta forma, quando comparado aos efeitos das variáveis climáticas na região norte de Minas Gerais, pode-se orientar o melhor momento para o controle químico e imunológico do ectoparasita. As propriedades apresentaram níveis de infestações variáveis, o que afirma a necessidade de elaboração de um programa de controle imunológico, integrado ao controle químico, sempre sob a orientação técnica adequada.

O teste teve a duração de 43 meses com avaliação da dinâmica populacional, e durante 24 meses realizou-se o controle imunológico, sendo o período necessário a cobrir dois ciclos completos da biologia do *Rhipicephalus microplus*. Assim, a vacina mostrou a sua capacidade de diminuição da população de parasitas, e conseqüentemente a diminuição do uso de controle químico, aumentando a rentabilidade do sistema de produção e melhoria dos índices zootécnicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, E.; GRANDI, D. S.; ANDRADE, D. M.; ANDRADE, M. P. de. Complexos agroindustriais, cooperativas e gestão. *Organizações Rurais e Agroindustriais*, Lavras, v. 3, n. 2, p. 30-44, jul./dez. 2001.
- ALVES-BRANCO F.P.J., PINHEIRO A.C. & SAPPER M.F.M. 2000. Controle dos principais ectoparasitos e endoparasitos em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. *Série documentos, Embrapa Pecuária Sul*. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/227046>> Acesso em 23 abr. 2014.
- ANDREOTTI R, SOARES MA, BARROS JC, ROBERT JM, PÉREZ DE LEÓN A. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(2): 127-33. PMID:21722487. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000200007>
- ARANTES G.J., MARQUES A.O. & HONER M.R. 1996. The cattle tick, *Boophilus microplus*, in the municipality of Uberlândia, MG: analysis of its resistance to commercial acaricides. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 4:89-93.
- ARENALES M.C. & COELHO E.N. 2002. Controle complementar de carrapatos (*Boophilus microplus*) em gado leiteiro (*Bos taurus*) - holandês (puro e cruzado) com a administração do produto homeopático - fator c&mcc, na fazenda da "Epamig". I Conferência Virtual Global sobre Produção Orgânica de Bovinos de Corte. (Conferências).
- BARROS ATM, KOLLER WW, CATTO JB, SOARES CO. Surtos por *Stomoxys calcitrans* em gado de corte no Mato Grosso do Sul. *Pesq Vet Bras* 2010a; 30(11): 945-52. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010001100008>
- CAMILLO G., VOGEL F.F., SANGIONI L.A., CADORE G.C. & FERRARI R. 2009. Eficiência in vitro de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 39:490-495.
- CAMPOS JÚNIOR D.A. & OLIVEIRA P.R. 2005. Avaliação in vitro da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. *Ciência Rural* 35:386-392. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782005000600025> Acesso em 23 abr. 2012.

- CARNEIRO, J. C. ; COSTA, E. G. L. ; VASCONCELOS, V. O. ; OLIVEIRA, N. J. F.; DUARTE, E. R. . Diagnóstico do controle e eficácia de acaricidas para o carrapato bovino no Semiárido do Norte de Minas Gerais.. *Acta Scientiae Veterinariae* (UFRGS. Impresso), v. 43, p. 1-10, 2015.
- CASTRO JANER E, SATO SCHUMAKER TT, MARCONDES KLAFKE G, RIFRAN L, GONZÁLEZ P, NIELL C, ET AL. Garrapata: resistencia a Fipronil e Ivermectina en rodeos vacunos de Uruguay y Brasil. Montevideo: INIA; 2012. 69 p. (Serie FTPA, n. 35).
- CHOU, P, Y & FASMAN, G. D. 1978. Empirical Predictions of Protein Conformation. *Annual Review of Biochemistry*. 47: 251 -276.
- CORDOVÉS, C.O. 1996. Carrapato: controle ou erradicação. Alegrete: Gralha,130p
- COUTO-PIMENTEL, J. C. 2002. A vacina sintetica SBm7462 no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em animais estabulados e a campo. Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV, 87p.
- DALTON, J.P., MULCAHY, G. 2001. Parasite vaccine – a reality? *Veterinary Parasitology*. 98: 149 – 167.
- DAVEY, R. B.; COOKSEY, L. M.; DESPINS, J. L. Survival of larvae of *Boophilus annulatus*, *Boophilus microplus* and *Boophilus hybrids* (Acari:Ixodidae) in different temperature and humidity regimes in the laboratory. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v. 40, n. 3-4, p. 305-313, 1991.
- DOSSA S.C., KAAYA G.P., ESSUMAN S., ODULAJA A. & ASSOKU R.G.K. 1996. Acquisition of resistance to the tick *Amblyomma variegatum* in Boran cattle, *Bos indicus* and the effects of *Trypanosoma congolense* and *Babesia bigemina* on host resistance. *Vet. Parasitol.* 62:317-330.
- FARIAS N.A., RUAS J.L. & SANTOS T.R. B. 2008. Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato *Boophilus microplus*, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural* 38:1700-1704. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n6/a32v38n6.pdf>> Acesso em 27 mai. 2013.
- FASSIO, L.H.; REIS R.P.; GERALDO, L.G. Desempenho Técnico e Econômico da Atividade Leiteira Em Minas Gerais, *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1154-1161, nov./dez., 2006.

- FERREZINI J., SCHIAVONE D., BRITO L. G., OLIVEIRA M.C.S. & CHAGAS A.C.S. 2007. Diagnóstico da resistência de *Rhipicephalus Boophilus microplus* a carrapaticidas no rebanho bovino da Embrapa Pecuária Sudeste. Anais Simpósio de Iniciação Científica da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, p.27. (Resumo)
- FRAGOSO, H., ORTIZ, M. RODRIGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. 1995. Evaluation of the efficacy of the recombinant vaccine (GavacTM) in cattle artificially infested with *Boophilus microplus* (Can). Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick. Habana: Elpos Scientiae, 280 p.
- FREITAS D.R., PHOL P.C. & VAZ JÚNIOR I.S. 2005. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. Acta Scient. Vet. 33:109-117.
- FURLONG, J. 1998. Carrapatos dos bovinos: conheça bem para controlar melhor. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 21p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 46).
- FURLONG J., MARTINS J.R. & PRATA M.C.A. 2007. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? Hora Vet.159, p. 1-7.
- GARRIS, G. I.; POPHAM, T. W.; ZIMMERMAN, R. H. *Boophilus microplus* (Acari:Ixodida e): oviposition, egg viability and larval longevity in grass and wooded environments on Puerto Rico. Environ. Entomol., Lanham, v. 19, n. 1, p. 66-75, 1990.
- GLORIA, M.A.; DAEMON, E. FACCINI, J.L.H; GRISI, L. Influência de diferentes temperaturas sobre a biologia da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (Can., 1887) (Acari: Ixodidae). Ver. Bras. Parasitol. Vet., 2, 2, 85-91 (1993).
- GOMES A., KOLLER W.W. & BARROS A.T.M. 2011. Suscetibilidade de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. Ciência Rural 41:1447-1452.
- GONZALES, J. C.O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): revisão histórica e conceitual. Hora Vet., Porto Alegre, v. 21, n. 125, p. 23-28, 2002.
- GRISI, L., MASSARD, C. L., MOYA-BORJA, G. E., PEREIRA, J. B. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. A hora veterinária, 21 (125): 8-10.

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

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção de leite. Disponível em <www.sidra.ibge.gov.br> Acesso no dia 10 de maio de 2013.

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.

JONSSON NN. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol* 2006; 137(1-2): 1-10. PMID:16472920. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.010](http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.010)

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

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

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.

KYTE, J & DOOLITTLE, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology.* 157(1):105-132.

LEITE, J. L. B.; GOMES, A. T. Perspectivas futuras dos sistemas de produção de leite no Brasil. In: GOMES, A. T.; LEITE, J. L. B.; CARNEIRO, A. V. (Eds.). **O agronegócio do leite no Brasil**. Juiz de Fora: Embrapa/CNPGL, 2001. p. 207-240.

MARCATTI NETO, A.; GONÇALVES FILHO, A.F.; GODOY, M. et al. Diagnóstico da pecuária leiteira do município de Barroso. Belo Horizonte: EPAMIG, 2007. 24p

MARTINS, A. R., ROCHA, R. S., PORTZ A. J. MOITA S. R., FEIJÓ L. D., DANTAS R. M. 2010. Uso da ivermectina na bovinocultura de corte do Brasil e o seus impactos econômicos. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes - ABIEC. Disponível em <<http://www.abiec.org.br>>. Acesso em: 29 Set. de 2010.

MASSARD, C. L., FONSECA, A. H., BITTENCOURT, V. R. E. P., SILVA, K. M. M. 1995. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm86 "GAVAC" contra o carrapato *B. microplus* no Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 17 (4):167-173.

MERLINI L.S. & YAMAMURA M. 1998. Estudo in vitro da resistência de *Boophilus microplus* a carrapaticidas na pecuária leiteira do Norte do estado do Paraná. *Semina, Ciênc. Agrárias* 9:38-44. Disponível em <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewArticle/5013>> Acesso em 20 mar. 2014.

NUNES, C. L. de M.; GERALDINE, D. G.; NORONHA, J. F. de et al. Lucratividade da atividade leiteira em Goiás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ADMINISTRAÇÃO RURAL, 3. Belo Horizonte, 1999. **Anais...** Belo Horizonte: ABAR, 1999. p. 336-47.

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.

OLIVEIRA PASIANI J, TORRES P, RONIERY SILVA J, DINIZ BZ, CALDAS ED. Knowledge, attitudes, practices and biomonitoring of farmers and residents exposed to pesticides in Brazil. *Int J Environ Res Public Health* 2012; 9(9): 3051-68. PMID:23202670 PMCID:PMC3499853. [http:// dx.doi.org/10.3390/ijerph9093051](http://dx.doi.org/10.3390/ijerph9093051)

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.

PANDA, D. N. et al. Studies on the development and survival periods of the non-parasitic stages of *Boophilus microplus* (Canestrini), in the climatic conditions of Ranchi (India). *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v. 44, n. 3-4, p. 275-283, 1992

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

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

PATARROYO, J.H; VARGAS, M.I; GÓNZALEZ, C.Z; GUZMAN, F; MARTISNS-FILHO, O.A; AFONSO, L.C.C; VALENTE, F.L; PECONICK, A.P; MARCIANO, A.P; PATARROYO, A.M; SOSSAI,S. 2009. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462[®] against *R. (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, V. 166 P. 333-339.

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.

PENICHER, M., RODRIGUEZ, M., CASTELLANO, O., MANDADO, S., ROJAS, Y., RUBIERA, R., SANCHEZ, P., LEONART, R., DE LA FUENTE, J. 1994. Detection of Bm86 antigen in different strains of *B. microplus* and effectiveness of immunization with recombinant Bm86. *Parasite Immunology*, 16: 493–500.

PINDYCK, R. S.; RUBINFELD, D. L. **Microeconomia**. 5. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2002. 711 p. REIS, R. P. **Fundamentos de economia aplicada**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002. 95 p.

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

PRODUÇÃO DE LEITE: ANÁLISE DOS DADOS NO BRASIL, ESTADO DE MINAS GERAIS, ZONA DA MATA E MICRORREGIÃO DE VIÇOSA. Mirian Fabiana da Silva; Angélica Cáritas da Silva. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)*, v .3, n.2., p.74-83, Dezembro, 2013

PRODUTOR PARMALAT. Preços: concorrência deve segurar alta. São Paulo, v.1, n.0, p. 38-42, dez. 1996.

- RAND, K. N., MOORE, T., SRISKANTHA, A., SPRING, K., TELLAM, R., WILLADSEN, P., COBON, S. 1989. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *B. microplus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86(24): 9657-9661.
- RODRIGUES DS, LEITE RC. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013; 65(5): 1570-2. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352013000500039>
- RODRIGUEZ, M., RUBIERA, R., PENICHER, M., MONTESINOS, R., CRAMATA, J., FALCON, V., SÁNCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOVES, C., VALDES, M., LLEONART, R., HERRERA, L., DE LA FUENTE, J. 1994. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *Mamm. Cell Genet. Divis.. J. Biotecnol.*, 33(2): 135 – 141.
- SALES-JUNIOR, P. A., GUZMAN, F., VARGAS, M. I., SOSSAI, S., PATARROYO, A. M., GONZALES, C. Z. L., PATARROYO, J. H. 2005. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm7462. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 107: 281-290.
- SANGSTER, N., C. Managing parasiticidae resistance. *Veterinary Parasitology*. 98: 89-109. 200.
- SANTOS F.C.C. & VOGEL F.S.F. 2012. Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente ao amitraz e cipermetrina em rebanhos bovinos no Rio Grande do Sul de 2005 a 2011. *Revta Port. Ciênc. Vet.* 111:121-124. Disponível em <http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf6_2012/121-124.pdf> Acesso em 23 abr. 2014.
- SANTOS T.R.B., FARIAS N.A.R., CUNHA FILHO N.A. & Vaz Júnior I.S. 2008. Uso de acaricidas em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de duas regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul. *Acta Scient. Vet.* 36:25-30.
- SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS DE MINAS GERAIS, 1996.
- 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.

SMITH RD, EVANS DE, MARTINS JR, CERESÉR VH, CORREA BL, PETRACCIA C, ET AL. Babesiosis (*Babesia bovis*) stability in unstable environments. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 916: 510-20. PMID:11193666. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05330.x>

SONENSHINE, D. E. *Biologia of ticks*. New York: Oxford University Press, 1993. 316 p. HITCHCOCK, L. F. Studies of the non-parasitic stages on the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). *Aust. J. Zool.*, Melbourne, v. 3, n. 3, p. 295-311, 1955.

SOSSAI, S. 2009. Expressão de quatro peptídeos recombinantes derivados do peptídeo sintético sbm7462 em *Pichia pastoris* e avaliação da resposta imunológica induzida em camundongos. Tese de Doutorado, Viçosa: UFV, 137p

SOUZA, D. P. H. de. **Análise da estrutura de custo e preço de sobrevivência dos principais sistemas de produção de leite**. 2000. 85 f. Dissertação (Mestrado em Economia Rural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

SPAGNOL F.H., PARANHOS E.B. & ALBUQUERQUE G.R. 2010. Avaliação in vitro da ação de acaricidas sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus canestrini*, 1887 (Acari: Ixodidae) de bovinos leiteiros no município de Itamaraju, Bahia, Brasil. *Ciência Anim. Bras.* Disponível em <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/8149/7946>> Acesso em 27 mai. 2014.

TAFUR, G. A. 2008. Respuesta inmune celular en ganglios linfáticos de ratones balb/c, producida por el péptido sintético SBm 7462®, anti R. (*Boophilus*) *microplus*, expresado en *Pichia pastoris*. Monografía (graduação), Universidad del Tolima, Ibagué, 47p.

TAFUR, G. A. 2011. Imunização de bovinos com dois peptídeos recombinantes derivados do peptídeo sbm7462®: Resposta imune de linfonodos e alterações histológicas do intestino do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). 2011. 93 f. dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa

WANG, H., NUTTALL P.A. 1999. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and molecular life sciences* , 56:286-95.

WILLADSEN, P., RIDING, G. A., MCKENNA, R. V., KEMP, D. H., TELLAM, R. L., NIELSEN, J. N., LAHNSTEIN, J., COBON, G. S., GOUGH, J. M. 1989. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *B. microplus*. *J. Immunol.*, 143(4): 1346-1351.

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

WOODHAN, C.B., GONZALES, O.A., LOPEZ, L.A. et al. Progress in the eradication of *Boophilus* ticks in Mexico 1960-80. *World Animal Review*, 48:18-24.

ZOCCAL, R. Leite em números. In: GOMES, A. T.; LEITE, J. L. B.; CARNEIRO, A. V. (Eds.). **O agronegócio do leite no Brasil**. Juiz de Fora: Embrapa/CNPGL, 2001. p. 241-262.

ANEXO I

QUESTIONÁRIO PARA PRODUTORES

Produtor:

Fazenda:

Município:

Rota e referencia da propriedade:

- 1) Tipo de exploração da atividade pecuária?
() Corte () Leite? () Intensiva () Extensiva () Semi-Intensiva
- 2) Qual o tamanho do rebanho?
() 1 – 20; () 21 – 50; () 51 – 70; () maior que 70.
- 3) Quantas vacas em lactação e quantas vacas secas?
- 4) Qual o grau de sangue do rebanho.-
() Puro; () Mestiço; (qual grau de sangue?); () SRD
- 5) Qual a produção de leite diária?
- 6) Qual o manejo nutricional adotado (volumoso e suplementação)?
- 7) Mantém assistência técnica especializada na propriedade (veterinário, agrônomo, zootecnista ou técnico em agropecuária)?
- 8) Faz controle zootécnico? Que tipo?
- 9) Faz uso da Inseminação Artificial?() Sim; () Não Qual finalidade?
- 10) Existe controle financeiro na propriedade?
- 11) Qual valor pago pelo produto (litro de leite ou arroba)?
- 12) Quais os gastos com vacinas e medicamentos?
- 13) Quanto você gasta anualmente com carrapaticidas?
- 14) Faz controle sanitário? () Sim; () Não
() Brucelose; () Tuberculose; () Neospora caninum () IBR; () BVDV;
() Leptospira; () Tristeza Parasitária; () Mastite; () Carrapatos
- 15) Quem faz as análises laboratoriais?
- 16) Qual a principal problema sanitário de sua propriedade?
- 17) Como faz o controle?
- 18) Há problemas com infestações de carrapatos? () Sim; () Não
- 19) Acredita que estes ectoparasitas podem ser responsáveis por perdas econômicas na propriedade?

- 20) Na sua opinião, qual a importância do carrapato na quantificação de seus prejuízos?
- 21) Já foi orientado quanto ao controle de carrapatos na propriedade?
 Sim; Não
- 22) Já ouviu falar sobre controle estratégico de carrapatos? Qual a fonte?
- 23) Como você faz o controle? Banhos por aspersão; Pour on; Injetável.
- 24) Quais são os animais tratados? Bezerros; Novilhas; Vacas em lactação;
 Vacas secas.
- 25) Qual o critério utilizado para determinação do momento exato para tratamento?
 Presença de carrapatos adultos; Presença de larvas; Número de carrapatos totais; Não tem critério algum
- 26) Com que frequência você faz as intervenções?
 Semanal; Quinzenal; Cada 20 dias; Mensal; Quando necessário Não faz
- 27) O controle é eficiente? Sim; Não.
- 28) Como você escolhe o produto? Promoção comercial; Indicação de veterinário;
 Indicação do vizinho; Indicação do vendedor;
 Carrapatograma; Não tem critério algum.
- 29) Quais os produtos comerciais mais utilizados nos últimos anos para controle de carrapatos?
- 30) Faz rodízio de drogas? Sim; Não.
 E das formas de aplicação? Sim; Não
- 31) Já ouviu falar sobre resistência à carrapaticidas? Sim; Não.
 Sabe o que leva à resistência? (especifique?).
- 32) Com um pulverizador de 20 litros de carrapaticida você banha quantos animais?
 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; mais que 10.
- 33) Já perdeu algum animal devido à infestação com carrapatos? Sim; Não. Quantos?
- 34) Já houve problemas de intoxicações em animais e/ou humanos em sua propriedade, decorrente do uso de carrapaticidas?
- 35) Com que frequência você faz o teste de sensibilidade à carrapaticidas?
 Mensal; trimestral; Semestral; Anual; Nunca fez.
- 36) Já usou alguma outra forma de controle? Sim; Não. Qual?
 Homeopatia; Raças resistentes; Controle biológico; Rotação de pastagens;
 Benzedeira; Outra(especifique?).
- 37) Já usou homeopatia? Esta resolveu seu problema? Sim ou Não? Se não porque?

- 38)** Já teve problemas com Tristeza Parasitária Bovina (TPB)? ()Sim; ()Não.
Como faz o controle e/ou tratamento (especifique?).
- 39)** Já ouviu falar sobre controle imunológicos de carrapatos? ()Sim; ()Não.
- 40)** Sabe como funciona uma vacina contra carrapatos? ()Sim; ()Não.
- 41)** Você acredita nesta tecnologia? ()Sim; ()Não. Porquê?
- 42)** Caso o produto estivesse disponível no mercado você utilizaria no seu rebanho?
()Sim; ()Não.
- 43)** Você estaria disposto a pagar por esta tecnologia?
- 44)** Você estaria disposto a participar de um programa de controle de carrapatos através do uso de vacinas por um período mínimo de 1,5 anos?
()Sim; ()Não. Por que?
- 45)** Caso sim, você estaria disposto a seguir todas as recomendações técnicas repassadas pelo veterinário responsável pelo estudo? (escolha da droga; forma de aplicação; intervalo de aplicação, etc.).
- 46)** Caso não, o que lhe faria tomar esta decisão?
()Não acreditar na tecnologia;
()Não aceitar orientações de terceiro;
()Apenas carrapaticidas podem controlar os carrapatos.
- 47)** Alguma observação que gostaria de fazer?