

Tópicos Avançados em Entomologia Molecular

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular

INCT – EM – 2012.



1

## CAPÍTULO 17

# Pesquisa para uma Vacina contra o Carrapato.

---

**Itabajara da Silva Vaz Junior, Adriana Seixas e Aoi Masuda.**

Faculdade de Veterinária e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Porto Alegre, RS, Brasil.

Copyright: © 2012 [Itabajara da Silva Vaz Junior, Adriana Seixas e Aoi Masuda]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## Considerações Iniciais

Os carrapatos são parasitas obrigatórios de grande parte dos vertebrados terrestres. Há 830 espécies de carrapatos (Sonenshine, 1991) distribuídas em duas<sup>1</sup> famílias principais: Argasidae<sup>2</sup>, com 170 espécies, e Ixodidae<sup>3</sup>, com 660 espécies. Todas as espécies descritas alimentam-se de sangue e durante a alimentação transmitem uma grande variedade de agentes patogênicos.

Neste capítulo serão abordados os problemas que os carrapatos causam à pecuária bovina e serão analisadas as diversas formas que têm sido propostas para solucioná-los. No Brasil, o principal ectoparasita que causa grande prejuízo à pecuária é o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, anteriormente denominado como *Boophilus microplus*. Esta reclassificação foi feita em 2003 (Murrell e Barker, 2003) com base em análises moleculares e morfológicas, e incluiu este carrapato como pertencente ao gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*.

Para a compreensão do tema foram descritos o ciclo biológico do carrapato bovino, alguns dados sobre as causas dos danos que este parasitismo provoca, assim como, os prejuízos econômicos. Ênfase foi dada aos métodos de controle do ectoparasita que têm sido estudados, com maior enfoque no desenvolvimento de uma vacina para o controle do *R. microplus*. No final do capítulo foi apresentada uma tabela com páginas da INTERNET com informações sobre o assunto (Tabela I) e outra com alguns eventos importantes no estudo para uma vacina contra carrapato (Tabela II).

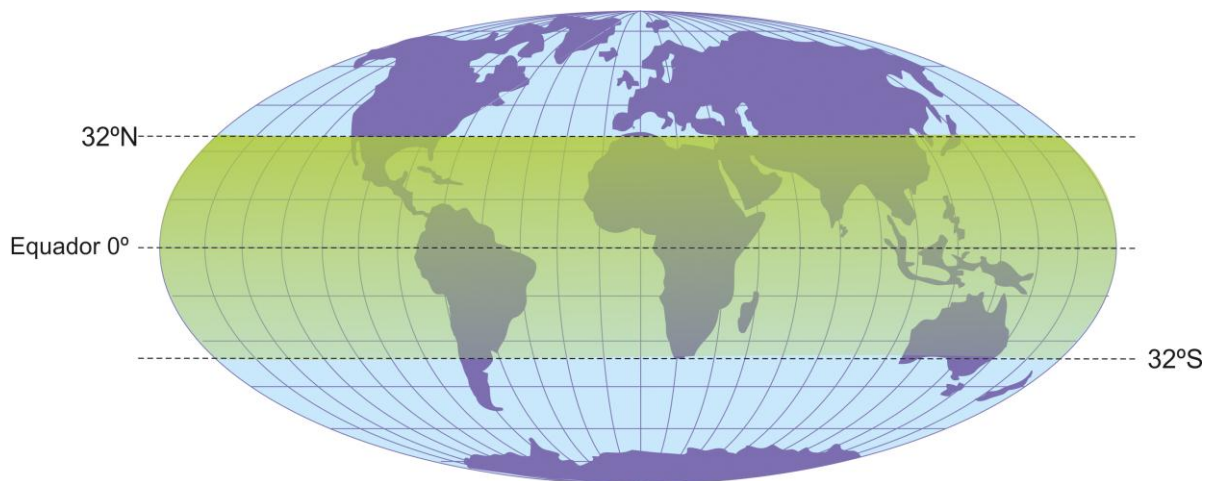
O carrapato *R. microplus* (Canestrini 1887; Acari: Ixodidae) é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, cujo principal hospedeiro é o bovino. Encontra-se amplamente distribuído nos grandes rebanhos bovinos da América, África, Ásia e Oceania, entre os paralelos 32°N e 32°S (Jonsson e cols., 2000), sendo um dos principais parasitas que afetam a pecuária destas áreas, tendo seu desenvolvimento favorecido pelas condições climáticas (Figura 1).

---

<sup>1</sup> Existe uma terceira família (Nuttalliellidae) que apresenta apenas uma espécie que vive na África.

<sup>2</sup>Família dos carrapatos moles (*soft ticks*) que não apresentam escudo.

<sup>3</sup>Família dos carrapatos duros (*hard ticks*) que apresentam escudo dorsal.



**Figura 1.** Regiões (em verde) de ocorrência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

### **Ciclo biológico do *Rhipicephalus microplus*.**

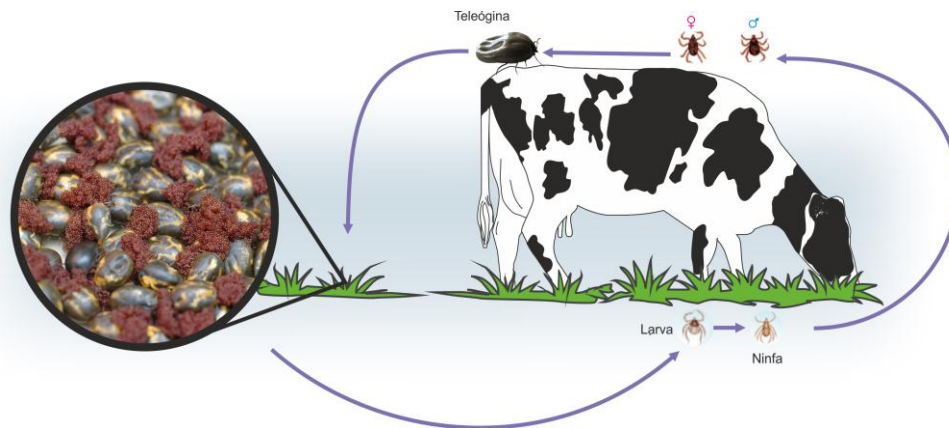
O *R. microplus* é uma espécie de carrapato Ixodidae com um único hospedeiro no seu ciclo e que normalmente parasita bovinos, sendo raramente encontrado em outros animais. No ciclo biológico do *R. microplus*, a teleógina (fêmea ingurgitada<sup>4</sup>) se desprende do hospedeiro e procura um esconderijo nas pastagens, onde põe de 2.500 a 3.000 ovos (Figura 2). Ao terminar a postura, a fêmea morre. Os ovos são pequenos, esféricos e de coloração castanha. Os ovos eclodem e dão origem às larvas, que sobem pelas gramíneas e arbustos e esperam a passagem dos hospedeiros para iniciar a fase parasitária. Uma larva de *R. microplus* pode sobreviver, dependendo da temperatura e umidade ambiental, até quatro meses sem encontrar um hospedeiro. Após fixar-se e alimentar-se no hospedeiro durante alguns dias, a larva sofre muda da cutícula passando para o estágio de ninfa, que por sua vez, se ingurgita, sofre ecdise e ocorre a diferenciação sexual para macho ou fêmea. Após a cópula, a fêmea se ingurgita, passando para a fase de fêmea parcialmente ingurgitada (ou partenógina) e, ao final da fase, como

---

<sup>4</sup>Fêmea repleta de sangue que apresenta um aumento corporal causado pela quantidade de sangue e fluídos do hospedeiro ingeridos durante o final da fase parasitária.

fêmea totalmente ingurgitada se desprende do hospedeiro. A duração da fase parasitária no bovino é de aproximadamente 21 dias, com um grande aumento de sua massa corpórea nas últimas 24 horas do ingurgitamento. No solo, após um período de descanso, que dura de um a dois dias, a fêmea inicia a postura. Os machos permanecem mais tempo no hospedeiro e podem fecundar outras fêmeas.

No Brasil, altas temperaturas e alta umidade relativa do ar durante o verão e primavera estão associadas com a diminuição da fase não parasitária. Deste modo, altos índices de produção e eclosão dos ovos e, conseqüentemente, uma maior abundância de larvas, são observados nesse período. No outono e inverno, o prolongamento da fase não parasitária e a diminuição da eficiência reprodutiva e da taxa de eclosão contribuem para uma menor presença de larvas. Entretanto, neste momento, baixas temperaturas são associadas a uma maior sobrevivência das larvas, resultando na manutenção das larvas nos campos. Como resultado, podemos detectar três a quatro gerações anuais de carrapato no Brasil.



**Figura 2. Ciclo biológico do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Em destaque fêmeas realizando postura.**

### Prejuízos causados pelo carrapato.

O *R. microplus* acarreta diversos danos econômicos (Johnston e cols., 1986), tornando-se o principal alvo de programas de controle e erradicação nos rebanhos da América do Sul (Nari, 1995). Um carrapato bovino suga, em média, de 2 a 3 ml de sangue do seu hospedeiro (Gonzales, 1995), o que se reflete em grandes perdas na produção de leite e carne (Sutherst e cols., 1983) e danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato (Seiferte cols., 1968). Além disso, este carrapato pode atuar como vetor de doenças, como a tristeza parasitária bovina, causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela rickétsia do gênero *Anaplasma* (McCosker, 1981). Além disso, existem diversos prejuízos relacionados à mão-de-obra necessária para o controle desse parasito, despesas com instalações, compra de equipamentos adequados para aplicação de carrapaticida nos rebanhos e aquisição de carrapaticidas (Cordovés, 1996). Estudos na Austrália calcularam uma perda anual de 4 milhões de dólares na criação de gado, 49% desta perda

devido aos custos com o controle do carrapato e 51% devido a perdas na produção de leite, carne e couro (Jonsson e cols., 2000).

O método de controle do carrapato que mais tem sido utilizado desde a década de 50 é o uso de acaricidas (Pruett, 1999). Apesar de ser, atualmente, o único método eficaz, é dispendioso, além de poder causar danos ao meio ambiente e à saúde pública, através da contaminação de rios e solos. Ao longo destas décadas, foram utilizados, sequencialmente, acaricidas baseados em compostos arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamato, formamidinas e piretróides. A troca dos princípios ativos tem sido uma necessidade devido ao surgimento de populações resistentes. Os três mais recentes grupos químicos de produtos contra o carrapato que se encontram disponíveis hoje no mercado são: as formamidinas, os piretróides e as avermectinas (Häuserman e cols., 1992). Diversos autores têm demonstrado a crescente resistência apresentada por carrapatos a compostos químicos presentes nos carrapaticidas (Crampton e cols., 1999a,b). A resistência aos organofosforados tem sido reportada desde 1963, quando foi descrito, na Austrália, um caso de resistência para dioxation, carbophenothion, diazinon e carbaryl (Seddon, 1967). O *R. microplus* pode apresentar resistência mais rapidamente que outros carrapatos, presumivelmente, pelo menor período de tempo entre as gerações (Kocan, 1995), o que demonstra a necessidade de desenvolver novas formas de controle desta espécie.

Portanto, devido aos problemas de resistência, ao alto custo dos produtos químicos e da mão-de-obra na aplicação dos produtos, bem como ao aparecimento de resíduos tóxicos na carne e no leite e à contaminação do ambiente, tem-se procurado novos métodos como formas alternativas de controle do carrapato (Nolan 1985, Pruett 1999). Atualmente, os controles biológico e imunológico já constituem parte de programas de controle integrado de ectoparasitas, que ainda exigem a utilização de produtos químicos para maior estabilidade operacional (Pruett, 1999).

### **Controle Biológico.**

O controle biológico inclui a seleção de raças menos sensíveis ao carrapato, cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das fases de vida livre do parasita (Sutherst e cols., 1982, Farias e cols., 1986), ação de predadores naturais, como a garça vaqueira *Egretta ibis* (Alves-Branco e cols., 1983) e formigas (Gonzales, 1995), manejo do rebanho (Wharton e Norris, 1980) e rotação de pastagens (Elder e cols., 1980).

Espécies parasitas também podem contribuir para a manutenção de baixos níveis populacionais de carrapato. Bactérias, como *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* são naturalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato. Existem relatos de uma diminuição de até 47% na quantidade de ovos postos quando fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* são imersas em suspensão de *C. lapagei* (Brum, 1988). A utilização de fungos no controle do carrapato tem sido muito estudada nos últimos anos. Estudos *in vitro* e ensaios a campo tem demonstrado que isolados de fungos patogênicos causam mortalidade em muitas espécies de carrapato, bem como reduzem gerações subsequentes devido a efeitos na eficácia reprodutiva da fêmea infectada (Fernandes e Bittencourt, 2008). Um exemplo é o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, que é altamente patogênico para o carrapato *I. scapularis* (Zhioua e cols., 1997). Demonstrou-se que os fungos *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* induzem uma taxa de mortalidade de aproximadamente 30% em *R. appendiculatus* adultos

alimentados em coelhos, enquanto que *M. anisopliae* induz uma mortalidade de 37% em *Amblyomma variegatum* adultos. Também foi mostrado que estes fungos não perdem sua capacidade de infecção sobre o carrapato quando são incubados com acaricida por mais de cinco dias, mantendo o crescimento e suas características morfológicas normais (Kaaya e cols., 1996). Experimentos *in vitro* com 12 isolados de *M. anisopliae* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* mostram que, dependendo da concentração de esporos na suspensão utilizada, alguns isolados de *M. anisopliae* podem causar morte de até 100% dos carrapatos infectados (Frazzon e cols., 2000). Já foram identificados isolados de *M. anisopliae*, ocorrentes no Brasil, infectantes naturais de *R. microplus* (Da-Costa e cols., 2002). Apesar dos resultados promissores com carrapatos, os pesticidas biológicos baseados em fungos, denominados mico-inseticidas ou mico-acaricidas, os quais têm se tornado cada vez mais populares para o controle de pestes de plantas, ainda não estão disponíveis comercialmente para uso contra ectoparasitas animais (Polar e cols., 2008). Isto ainda depende da identificação de novas linhagens e de avanços nas estratégias de produção, formulação e aplicação, os quais resultem no desenvolvimento de novos produtos que possam superar vários desafios ainda existentes (Samish e cols., 2004, Polar e cols., 2008). Outros organismos parasitos, tais como nematódeos, têm sido também avaliados como ferramentas no controle biológico de carrapatos, já que têm se mostrado eficientes no controle de insetos (Samish e Glazer, 2001; Samish e cols., 2004).

Outra estratégia envolvendo o controle biológico do carrapato é a utilização de compostos naturais com atividade pesticida. Davey e cols., (2001) testaram em bovinos diferentes concentrações de “spinosad”, um acaricida natural de *Sacharopolyspora spinosa* (actinomiceto), advindo da mistura de dois metabólitos deste organismo, espinosina A e D, obtidos por fermentação. Os resultados mostram uma queda drástica no número de fêmeas ingurgitadas, na massa de ovos e no índice de fecundidade. Guglielmone e cols., (2000) mostraram que, em bovinos banhados em moxidectina, um composto endectocida<sup>5</sup> que também atua como anti-helmíntico, a infestação por carrapatos foi reduzida em quase 95%. Extratos de plantas com propriedades acaricidas e repelentes são outras alternativas para o controle dos carrapatos. Gramíneas capazes de repelir, capturar e até mesmo matar os carrapatos têm sido descritas. Certas espécies de gramíneas como as do gênero *Stylosanthes* produzem fluidos viscosos que são venenosos para os carrapatos (Kaaya e cols., 2000). É possível que no futuro estes acaricidas naturais venham a assumir, o papel dos acaricidas químicos no controle integrado com vacinas.

### **Desenvolvimento de Vacinas.**

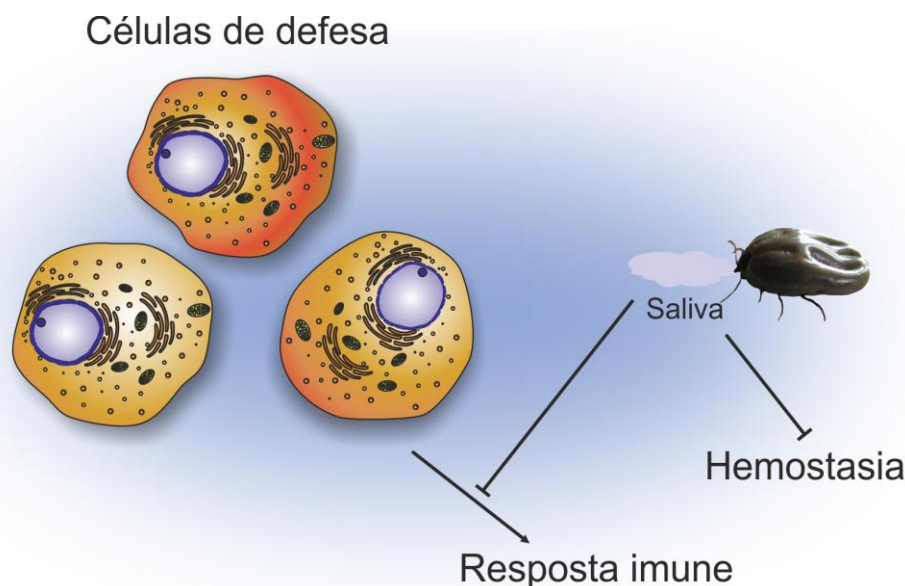
O controle de ectoparasitas através de vacinação tem sido estudado nas últimas cinco décadas e torna-se cada vez mais importante como alternativa ao uso de pesticidas, tóxicos para o homem e o ambiente. Aliado a isso, o rápido desenvolvimento da biotecnologia tem permitido o desenvolvimento de novas vacinas. Para o desenvolvimento de uma vacina é necessário, além da identificação de proteínas capazes de induzir uma resposta imune protetora, o conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica do animal. Bovinos infestados naturalmente com carrapatos desenvolvem linfócitos T e B de memória, que permitem uma

---

<sup>5</sup> Produto químico utilizado no controle de ecto (externos) e endoparasitas (internos).

resposta mais eficiente em futuras infestações (Wikel, 1996). A importância dos linfócitos T na indução e manutenção de uma resposta eficaz foi bem definida, apesar de não estar totalmente esclarecida a importância de cada tipo de resposta (celular ou humoral) para a proteção contra o carrapato (Wikel e Bergman, 1997).

Diferenças em vários aspectos da resposta imune, tanto inata como adaptativa, ocorrem entre espécies de bovinos susceptíveis ou resistentes a carrapatos (Kashino e cols., 2005). A saliva dos carrapatos apresenta a capacidade de suprimir a produção de interleucinas pelos macrófagos bovinos assim como a proliferação das células mononucleares, no entanto, em ambos os casos a supressão é menos intensa em espécies resistentes. Figura 3 mostrar a ação da saliva do carrapato (Turni e cols., 2002). Adicionalmente, a hipersensibilidade cutânea apresentada por bovinos resistentes é mais lenta quando comparada com animais suscetíveis (Bechara e cols., 2000). A resposta humoral e o desenvolvimento natural de resistência podem ser modulados pelo nível de infestação do hospedeiro e conseqüentemente pela quantidade de antígenos salivares injetados no hospedeiro durante a alimentação (Cruz e cols., 2008).



**Figura 3. Moléculas Biologicamente Ativas da Saliva do Carrapato.** A saliva contém diversas moléculas que interferem na fisiologia do hospedeiro, por exemplo inibem mecanismos da resposta imunológica e cascata de coagulação do hospedeiro.

#### A Bm86.

A teoria dos "antígenos ocultos", desenvolvida por Willadsen e Kemp (1988), propõe que uma proteína do carrapato que em uma infestação natural não fosse exposta ao sistema imunológico do bovino (como por exemplo, proteínas do intestino ou outros órgãos internos) seria um bom antígeno para a produção de uma vacina. A teoria é baseada no fato de que os carrapatos não teriam desenvolvido nenhum mecanismo de evasão da resposta imunológica do hospedeiro contra este alvo, desde que, durante a evolução, nunca teriam sido expostos a uma resposta

imune a esta agressão por parte do sistema imune do hospedeiro. Baseado neste pressuposto, Willadsen e cols., (1988) procuraram e identificaram uma proteína (Bm86) com essa característica, o que levou a um grande avanço no desenvolvimento de vacinas contra *R. microplus*. A Bm86, uma proteína de intestino, induz resposta imunológica em bovinos imunizados e é a base de duas vacinas comerciais lançadas no mercado: a vacina TickGard, desenvolvida na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO (Jonsson e cols., 2000), e a vacina Gavac, desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba (de-la-Fuente e cols., 1999). As duas vacinas são produzidas em sistemas heterólogos: a proteína empregada na formulação f da TickGard é obtida em *E. coli* e da Gavac, em *Pichia pastoris*. Embora essas vacinas estejam comercialmente disponíveis, elas não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas (Willadsen e cols., 1996, Jonsson e cols., 2000). O grupo australiano descreveu e avaliou um segundo antígeno oculto, denominado Bm91, que quando associado à Bm86 e aumentou a eficácia da vacinação (Riding e cols., 1994, Willadsen e cols., 1996). Resultados parcialmente efetivos com diferentes antígenos geraram confiança sobre a viabilidade técnica do desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato.

Visando melhorar os resultados obtidos com a proteína Bm86, foram desenvolvidos três peptídeos sintéticos derivados dessa glicoproteína de intestino (Patarroyo e cols., 2002). A partir de análise computacional da Bm86 e da avaliação de algumas propriedades da proteína, como potencial hidrofóbico e hidrofílico, foram definidos três possíveis determinantes imunogênicos, cada qual com 14-15 aminoácidos. Bovinos da raça Jersey foram divididos em grupos e imunizados com os peptídeos sintéticos associados à saponina, usada como adjuvante. Vinte e um dias após a última dose, cada animal foi infestado com 1.500 larvas de *R. microplus*. Pelo teste de ELISA, foi determinado que os bovinos produziram anticorpos contra os peptídeos e que os anticorpos reconheceram a proteína Bm86 *in situ*, especialmente no interior dos vacúolos digestivos. Os resultados da infestação experimental demonstraram uma eficácia entre 36 a 81% (Patarroyo e cols., 2002).

Foi sugerido que a variação de eficácia da vacina, observada entre diferentes regiões do mundo seja decorrente de variações na sequência da Bm86 entre diferentes cepas (Garcia-Garcia e cols., 2000). Análises de populações de carrapatos da Argentina mostraram polimorfismos no gene da Bm86 que fazem os carrapatos resistentes a vacinação. Este polimorfismo decorre de uma mutação de ponto que cria um códon de terminação. A consequência desta mutação é a produção de uma proteína solúvel, em vez de proteína de membrana detectada em carrapatos encontrados na Austrália e Cuba. Para contornar essa resistência, uma nova vacina recombinante foi produzida baseada no gene da Bm95 (equivalente ao da Bm86). Esta vacina mostrou-se eficaz para proteger os bovinos de infestações, tanto pelos carrapatos da Argentina, como pelos de Cuba (Garcia-Garcia e cols., 2000).

Em Cuba, foram analisados os efeitos da vacinação de mais de meio milhão de bovinos com a Gavac (Bm86) durante oito anos. Os resultados mostraram que o uso da vacina permitiu reduzir em 87% a necessidade de acaricidas e também causou uma redução de 96% nos casos de babesiose (Valle e cols., 2004).

Com o objetivo de compreender o motivo da variação, em diversos experimentos e observações a campo, da proteção obtida pela vacina da Bm86, foi analisada a sequência parcial dos genes da Bm86 (Bm95) de 30 isolados de carrapato de várias localidades da América do Sul. Os dados obtidos mostraram uma variação de até



6% na sequência de aminoácidos entre os isolados estudados e a Bm86 “padrão” (Sossai e cols., 2005). Comparação entre isolados do sul do Texas e as cepas usadas para obtenção dos antígenos vacinais, australiana e cubana, mostraram 89,8% e 90,0% de identidade respectivamente (Freeman e cols., 2010). Estes resultados sugerem que a variabilidade na sequência do gene da Bm86 pode ser responsável pela variação no grau de proteção induzida pelas vacinas com a Bm86.

Embora os antígenos ocultos sejam a base das vacinas comerciais e tenham sido estudados em outros ectoparasitas, como *Lucilia cuprina* e *Pediculus humanus* (Trimnelle e cols., 2002), experimentos com antígenos naturalmente expostos ao sistema imunológico do hospedeiro associados a antígenos ocultos, demonstram o potencial da associação de diferentes alvos em uma mesma vacina (Trimnell e cols., 2002).

Portanto, a identificação de novas moléculas e suas funções bioquímicas representa um campo fértil para o conhecimento dos mecanismos de interação parasita-hospedeiro e para obtenção de novos antígenos com potencial protetor. Além dos antígenos que compõem as vacinas comercialmente disponíveis descritas acima, outras proteínas que também conferem algum grau de imunoproteção têm sido descritas.

## A BYC.

Uma glicolipoproteína de massa molecular 50.000 Da, denominada BYC (*Boophilus* Yolk pro-Cathepsin), foi detectada em ovos embrionados de *R. microplus*, onde parece atuar sobre a degradação da vitelina, a principal proteína de reserva dos ovos do carrapato (Logullo e cols., 1998). A BYC é sintetizada no corpo gorduroso, secretada para a hemolinfa e captada pelo ovócito em crescimento; representa entre 5 e 8 % das proteínas do ovo, sendo ativada por proteólise limitada durante a embriogênese (Logullo e cols., 1998). Bovinos imunizados com BYC produziram imunoglobulinas que apareceram circulantes na hemolinfa de carrapatos que parasitaram estes animais. As imunoglobulinas bovinas circulantes na hemolinfa do ectoparasita mantiveram sua atividade biológica (medida pela capacidade de ligação ao antígeno correspondente). Este resultado indicou que os anticorpos podem atravessar o epitélio intestinal do carrapato, e, possivelmente, reagir com antígenos localizados em tecidos ou órgãos internos (Da-Silva-Vaz e cols., 1996). Por outro lado, inoculação de teleóginas com anticorpos monoclonais anti-BYC (BrBm5) reduziu tanto o peso dos ovos quanto a taxa de sobrevivência das teleóginas durante o período de postura, de forma dose-dependente: inoculação de 10 $\mu$ g e 50 $\mu$ g de anti-BYC resultou em queda de peso dos ovos entre 2,5% e 52% e em redução da sobrevivência entre 5,4% e 60%, respectivamente (Da-Silva-Vaz e cols., 1998).

Quando bovinos imunizados com BYC foram desafiados com larvas infestantes de *R. microplus* houve redução no número de teleóginas, na capacidade de postura e na fertilidade dos ovos, com eficácia variando entre 14% e 36%, em dois experimentos independentes. Os níveis de anticorpos declinaram gradualmente após a infestação e responderam positivamente a um reforço (100  $\mu$ g), aplicado 11 meses após a infestação, indicando a existência de memória imunológica para esse antígeno (Da-Silva-Vaz e cols., 1998).

Posteriormente, o gene que codifica BYC foi clonado e expresso em *E. coli*, tendo sido mostrado que a proteína BYC recombinante é imunogênica para bovinos (25% de proteção contra *R. microplus*; Leal e cols., 2006). Este é um dado relevante,

pois a BYC nativa é altamente glicosilada, e suspeitava-se que sua imunogenicidade advinha destas modificações. A proteína produzida em *E. coli* não sofre modificações pós-traducionais mas, apesar disto, os anticorpos produzidos contra a proteína recombinante reconhecem a BYC nativa, o que justifica o uso desta proteína recombinante em uma vacina contra o carrapato (Leal e cols., 2006, revisado em Seixas e cols., 2011).

### Outros Antígenos.

Inibidores de tripsina (BmTIs) foram detectados em concentrações variáveis nas diferentes fases de desenvolvimento do *R. microplus*, indicando um possível papel na interação parasita-hospedeiro. Esses BmTIs, purificados de larvas, tiveram sua atividade inibitória para tripsina comprovada e foram usados como antígeno para imunização de bovinos (Andreotti e cols., 2002). Dezesesseis bovinos nelore, com seis meses de idade, receberam três doses de 100µg de BmTIs associado a adjuvante de Freund e foram desafiados com 20.000 larvas de *R. microplus*. Os níveis de IgG anti-BmTIs, monitorados por ELISA, tiveram seu pico 40 dias após a primeira imunização (título 8.000) e apresentaram diminuição após a infestação, atingindo 50% do título máximo três meses após o desafio. A ausência de anticorpos anti-BmTIs nos bovinos do grupo controle, sugere que esses antígenos não sejam reconhecidos na infestação natural. Os bovinos imunizados, quando comparados aos bovinos controles, apresentaram redução de 67,9% no número total de carrapatos, de 69,5% no peso total das fêmeas ingurgitadas e de 71,3% no peso total dos ovos resultantes das fêmeas infestantes. A eficácia total, da vacinação com BmTIs foi de 72,8% (Andreotti e cols., 2002). O cálculo da eficácia total é usado para análise de vacinas anti-carrapato, e tenta estimar o resultante da interação entre os índices acima, ou seja, é o resultado do efeito de ter menos carrapatos ingurgitados, as fêmeas colocarem menos ovos e estes originarem menos larvas.

O potencial imunogênico da vitelina, principal proteína de reserva do ovo, foi avaliado em experimentos de imunização, usando ovinos como modelo experimental (Tellam e cols., 2002). Os ovinos têm sido utilizados como modelo para a identificação e a avaliação de uma série de novos antígenos. No referido estudo, foram avaliadas duas glicoproteínas derivadas do complexo vitelina, uma de 87kDa (VIT87) e outra de 80kDa (GP80), purificadas a partir de ovos e larvas, respectivamente. VIT 87 e GP80 foram idênticas em no mínimo 11 resíduos de aminoácidos na extremidade amino-terminal, demonstrando serem altamente relacionadas, porém não idênticas (Tellam e cols., 2002). Ovinos imunizados com duas doses de 500µg de VIT87 ou de 80µg de GP80 foram desafiados com 10 fêmeas e 10 machos de carrapatos adultos e monitorados quanto ao número de fêmeas fixadas, número de fêmeas ingurgitadas, percentual de fêmeas danificadas, peso das fêmeas recuperadas e taxa de produção de ovos. A eficácia global da imunização, medida pela redução no número de larvas após um ciclo completo, foi de 68% com VIT87 e de 66% com GP80. No mesmo estudo, os autores relataram a avaliação de GP80 expressa em *E. coli*. Entretanto, os resultados obtidos em ovinos imunizados com a proteína recombinante não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Esse resultado pode estar relacionado à ausência de glicosilação ou à conformação incorreta da proteína recombinante obtida em *E. coli* (Tellam e cols., 2002). Tendo em vista que os antígenos estudados até o momento são glicoproteínas, a ausência de glicosilação das proteínas heterólogas obtidas em sistema procarioto é um problema potencial no desenvolvimento de vacinas

recombinantes contra *R. microplus*. Porém, essa dificuldade pode ser contornada pela utilização de um sistema de expressão eucarioto.

A produção de anticorpos monoclonais tem sido uma valiosa ferramenta na caracterização de antígenos envolvidos na resposta protetora contra parasitas (Vanamerongen e cols., 1989). Além de auxiliar no estudo da fisiologia do carrapato, a identificação e caracterização de proteínas-alvo através de anticorpos monoclonais auxiliam na avaliação do potencial vacinante de novos antígenos. Um anticorpo monoclonal (denominado BrBm2), produzido a partir de extrato de intestino de *R. microplus*, reduziu em até 70% a capacidade de oviposição e aumentou a mortalidade de teleóginas, quando inoculadas na hemocele (Toro-Ortiz e cols., 1997). Esses efeitos foram dependentes da concentração de anticorpos inoculada. Outros monoclonais (BrBm1, BrBm3 e BrBm4) foram produzidos a partir da imunização de camundongos com extrato de embrião. O BrBm1 reage com antígenos presentes em diferentes tecidos e afetou a postura em aproximadamente 50%, enquanto BrBm3 e BrBm4 reconhecem a proteína vitelina e não afetaram a eficiência reprodutiva (Toro-Ortiz e cols., 1997).

Apesar do *R. microplus* ser um dos carrapatos mais estudados, procura-se antígenos em outras espécies, objetivando tanto o desenvolvimento de vacinas espécie específicas, como de uma vacina multi-espécie, ou universal.

Uma estratégia utilizada para a identificação de antígenos é o uso de imunização com clones derivados de bibliotecas de cDNA<sup>6</sup> em vetores de expressão. O método consiste na imunização de animais com grupos aleatórios de cDNAs clonados em vetores de expressão de eucariotos. Quando os animais são vacinados com os plasmídeos, os cDNAs do parasita são transcritos e traduzidos, o que resulta em expressão de antígenos do carrapato nas células do vertebrado que é, em consequência, imunizado contra as proteínas expressas. Em seguida, os animais são infestados com larvas para se observar o efeito protetor da imunização. O grupo de cDNAs que induziu uma resposta imunológica protetora é subdividido em novos grupos que são usados para imunizar novos animais. Com sucessivas rodadas de imunização e desafios é possível restringir o número de clones testados até identificar um ou mais genes importantes para a proteção imunológica. Utilizando 4.000 clones derivados de uma biblioteca com cDNAs de *Ixodes scapularis* foi possível identificar três clones que codificam proteínas com capacidade de induzir uma resposta imune protetora estudar sobre (Almazan e cols., 2003). Quando foram realizadas imunizações com as proteínas recombinantes foi possível observar, principalmente para uma delas, capacidade imunoprotetora não só contra infestação por *I. scapularis*, mas também por *Dermacentor variabilis* e *Amblyomma americanum* (Almazán e cols., 2003, 2005a,b).

Trimnell e cols., (2002) observaram que a imunização de cobaias com uma proteína recombinante de cemento<sup>7</sup> de *Rhipicephalus appendiculatus* induz proteção parcial contra uma futura infestação. A mesma proteína foi usada para proteger cobaias contra infestação por *R. sanguineus* e coelhos e camundongos contra infestação por *I. ricinus* (Trimnell e cols., 2005). Apesar dos índices de proteção não

---

<sup>6</sup> DNA complementar é um DNA de fita simples, complementar a uma molécula de RNA, e obtido por transcrição reversa *in vitro*.

<sup>7</sup> Estrutura formada por secreção da glândula salivar e que coagula em volta das peças bucais, auxiliando a fixação do carrapato ao hospedeiro.

serem altos, os trabalhos mostram a possibilidade da formulação de vacinas multi-espécie. Adicionalmente, uma proteína do cemento (64TRP) de *R. appendiculatus* mostrou-se capaz de interferir na transmissão do vírus da encefalite transmitida por *I. ricinus*, demonstrando a possibilidade de uso de vacina anti-carrapato para auxiliar na prevenção de doenças transmitidas por estes parasitas. Aparentemente a transmissão do patógeno foi prejudicada por uma resposta imune inflamatória cutânea no local da picada do carrapato (Labuda e cols., 2006).

Com o objetivo de caracterizar proteínas associadas à digestão do carrapato, foram clonados e expressos em *E. coli* dois genes de serpinas (inibidores de serino-proteases) do carrapato *Haemaphysalis longicornis*. As duas serpinas (HLS-1 e HLS-2) apresentaram atividade anti-coagulante e, quando inoculadas em coelhos, induziram proteção parcial (ao redor de 40% de mortalidade dos carrapatos) contra uma infestação pelo carrapato (Sugino e cols., 2003, Imamura e cols., 2005). O uso de serpinas como antígeno vacinal vem sendo explorado para diferentes espécies de carrapato como *R. microplus*, *I. ricinus*, *R. appendiculatus* (revisado em Mulenga e cols., 2001; Jittapalapong e cols., 2010, Prevot e cols., 2007; Imamura e cols., 2008).

### **Outras Proteínas Caracterizadas.**

Além dos antígenos já avaliados imunologicamente e descritos anteriormente, várias moléculas envolvidas na fisiologia do carrapato e em sua interação com o hospedeiro têm sido descritas por diversos grupos de pesquisa. Braz e cols., (1999) demonstraram que *R. microplus* não sintetiza heme, obtendo da hemoglobina do hospedeiro o heme necessário para o seu desenvolvimento. Como consequência disso, o carrapato bovino desenvolveu, ao longo de sua evolução, mecanismos para obtenção e reciclagem de heme. A existência destes mecanismos foi comprovada pela purificação e caracterização de uma aspártico-proteinase ligadora de heme (Sorgine e cols., 2000; Pohl e cols., 2008). Esta proteína, denominada THAP (Tick Heme-Binding Aspartic Proteinase) foi o primeiro relato de uma proteinase capaz de ligar heme e ter sua atividade regulada por esta molécula. Aparentemente, o substrato natural dessa proteína é a vitelina, que no caso do carrapato, também é uma hemoproteína. A THAP apresenta um único sítio de ligação de heme, distinto do sítio catalítico, e que reconhece os resíduos laterais de ácido propiônico do anel porfirínico. A adição de heme ao meio de incubação inibe a hidrólise da vitelina pela THAP, demonstrando que a enzima é regulada pela disponibilidade de heme. Essa regulação é um provável mecanismo de controle do “stress” oxidativo gerado pela degradação de heme (Sorgine e cols., 2000). Experimentos *in vitro* demonstraram que cada molécula de vitelina é capaz de ligar até 31 moléculas de heme, reforçando a teoria de controle do stress oxidativo. No mesmo estudo, os autores apresentaram evidências de que a vitelina é o principal reservatório de heme e que, além de fornecer heme para o desenvolvimento embrionário durante sua degradação, a vitelina liga-se a qualquer molécula de heme livre que exceda a quantidade necessária para o desenvolvimento embrionário (Logullo e cols., 2002).

Glutathione S-transferases (GSTs) constituem uma família multi-funcional de enzimas presentes em animais e vegetais. Suas funções incluem transporte intracelular, participação em processos digestivos, síntese de prostaglandinas e,

principalmente, detoxificação de substâncias endógenas e exógenas e proteção contra o estresse oxidativo (Lee e cols., 2002, Rosa-de-Lima e cols., 2002). Altos níveis de expressão de GST têm sido relacionados à resistência aos inseticidas em vários organismos (Rufingier e cols., 1999). GST também está associada a reações alérgicas mediadas por IgE (O'Neill e cols., 1994). Em *R. microplus* a GST foi isolada de larvas (He e cols., 1999) e de glândula salivar de teleóginas (Rosa-de-Lima e cols., 2002). Uma GST de *R. microplus* (BmGST), clonada a partir de uma biblioteca de cDNA de glândula salivar de partenóquina, foi expressa em *E. coli* e apresentou atividade enzimática contra o substrato CDNB. Ensaio de RT-PCR com tecidos de *R. microplus* indicaram que BmGST é sintetizada nas glândulas salivares e no intestino de partenóginas e teleóginas (Rosa-de-Lima e cols., 2002; de Freitas e cols.; 2008). O papel da GST na defesa contra danos oxidativos foi caracterizado em ovos e larvas desta espécie, sendo a atividade enzimática de GST correlacionada com a presença de moléculas consideradas parâmetro cinético de estresse oxidativo, como catalase e glutatona (Freitas e cols., 2007). Recentemente foi demonstrado o papel da GST na detoxificação de ácaros expostos a permetrina e ivermectina, demonstrando participação desta enzima na resistência a acaricidas (Mounsey e cols., 2010). A GST recombinante do carrapato *Hemaphysalis longicornis* foi utilizada para imunizar bovinos sendo capaz de induzir imunogenicidade cruzada que resultou em uma proteção de 57% contra uma infestação experimental por *R. microplus* (Parizi e cols., 2011).

Uma cisteíno-endopeptidase degradadora de vitelina (VTDCE) foi purificada e caracterizada a partir de ovos de *R. microplus* (Seixas e cols., 2003). Essa enzima é naturalmente associada à vitelina, sendo ativada por acidificação. Ensaio enzimáticos revelaram atividade de VTDCE frente a vários substratos sintéticos, além de hemoglobina, albumina, gelatina e vitelina (seu provável substrato natural). Essa atividade foi demonstrada em larvas não alimentadas, ovários e ovos de fêmeas ingurgitadas, sugerindo um importante papel na embriogênese do carrapato bovino (Seixas e cols., 2003). A associação da VTDCE com vitelina e o controle de sua atividade por um inibidor presente na hemolinfa foram demonstrados (Seixas e cols., 2010). A imunização de bovinos com VTDCE foi capaz de induzir proteção parcial (21%) contra infestação por *R. microplus* (Seixas e cols., 2008). Assim como a BYC, o envolvimento na embriogênese e a capacidade imunogênica da VTDCE fazem dessas enzimas antígenos em potencial para o desenvolvimento de uma vacina multiantigênica anti-carrapatos.

Anteriormente, uma cisteíno-endopeptidase recombinante, diferente da VTDCE, já havia sido obtida de uma biblioteca de cDNA de larva de *R. microplus* utilizando *primers* projetados a partir de seqüências encontradas no sítio ativo de cisteíno-proteínases (Renard e cols., 2000). A expressão do clone em *E. coli* permitiu a obtenção da proteína recombinante (BmCL1), capaz de hidrolisar diferentes substratos sintéticos assim como hemoglobina, gelatina e vitelina, com atividade ótima em pH ácido. Análise por RT-PCR demonstrou que o gene é expresso no estágio larval do carrapato (Renard e cols., 2000). A proteína recombinante também foi utilizada para obtenção de anticorpo policlonal, que permitiu a localização desta proteína em larvas, partenóginas e teleóginas, através de Western-blots. Em experimento de imunolocalização, a enzima foi detectada em células secretórias do intestino. Baseados nesses achados, os autores sugerem que a BmCL1 pode estar envolvida na degradação de hemoglobina no intestino de *R. microplus* (Renard e cols., 2002). A proteína nativa foi purificada e caracterizada como envolvida na digestão de vitelina para sobrevivência da larva até o encontro

com o hospedeiro (Estrela e cols.; 2007; 2010). A participação desta enzima na nutrição continuada do carrapato, desde o estágio larval até o estágio adulto hematófago, faz da BmCl1 um interessante alvo para controle deste parasita.

Uma calreticulina (CRT), proteína que se liga a cálcio e que é encontrada em um grande número de espécies e em todas as células nucleadas de mamíferos (Michalak e cols., 1992), foi identificada e caracterizada em *R. microplus* (Ferreira e cols., 2002b). Suas possíveis funções incluem estocagem de cálcio, mediação da função de integrinas, ligação de C1q, lectina extracelular, chaperonina, além de inibir a expressão gênica regulada por esteróides (Coppolino e Dedhar, 1998). A calreticulina humana é descrita como capaz de inibir a via clássica do sistema complemento pela sua ligação direta a C1q (Kovacs e cols., 1998). Em carrapatos a CRT está presente na saliva. A secreção desta proteína durante a alimentação deve estar relacionada com a modulação da interação parasita hospedeiro. No carrapato *A. americanum* foi demonstrada a secreção de calreticulina pela saliva, sendo sugerido que atue modulando o sistema imune e/ou hemostase do hospedeiro (Jaworski e cols., 1995 a, b). Também foi citado que neste carrapato a calreticulina pode ser utilizada como biomarcador<sup>8</sup>, para diagnosticar que pessoas ou animais foram picados por carrapatos, e que níveis de anticorpos contra esta proteína podem estar diretamente relacionados a índices de ingurgitamento (Sanderse cols., 1998, 1999). Duas CRTs recombinantes clonadas a partir de glândula salivar dos carrapatos *R. microplus* (Ferreira e cols., 2002b) e *H. logicornis* (Parizi e cols., 2009) foram comparadas quanto a capacidade imunogênica através da imunização de bovinos e camundongos. As proteínas de ambas as espécies mostraram-se imunogênicas apresentando reatividade cruzada entre elas, apesar de apresentarem epítomos diferentes (Parizi e cols., 2009).

O cDNA de uma paramiosina de *R. microplus* (BmPRM), codificando uma proteína de 102 kDa, foi isolado, caracterizado e expresso em *E. coli* (Ferreira e cols., 2002a). A função da paramiosina em músculo de invertebrados não é totalmente conhecida. A paramiosina de *Schistosoma* tem sido testada como imunógeno em experimentos de vacinação. Experimentos de transferência passiva de anticorpos anti-paramiosina, demonstrando atividade protetora, têm estimulado a investigação da paramiosina como componente de uma vacina para esquistossomose (Gobert 1998a,b). Já foi também verificado que a paramiosina inibe ativação de complemento *in vitro*, o que sugere que esta molécula pode atuar como imunomoduladora da resposta do hospedeiro (Laclette e cols., 1992). Anticorpos anti-BmPRM foram utilizados em Western-blots e confirmaram a presença de paramiosina em todos os tecidos e estágios de desenvolvimento do carrapato. A rBmPRM ligou-se a IgG e ao colágeno. Essas características sugerem o envolvimento dessa proteína na modulação da resposta imunológica do hospedeiro (Ferreira e cols., 2002a).

Atividade anti-fúngica e anti-bacteriana foi detectada na hemolinfa e no intestino de *R. microplus* (Fogaça e cols., 1999). Essa atividade foi associada a um peptídeo com massa molecular de 3,2 kDa, purificado de conteúdo intestinal da fêmea ingurgitada do carrapato. O seqüenciamento de aminoácidos revelou que o peptídeo é idêntico a um fragmento da  $\alpha$ -hemoglobina bovina e foi ativo, em concentrações micromolares, contra bactérias gram-positivas e fungos (Fogaça e

---

<sup>8</sup> Toda substância ou alteração bioquímica que permite avaliar a exposição a um agente biológico, físico ou químico, com risco à saúde.

cols., 1999). Os resultados indicam que esse peptídeo é resultado do processamento enzimático da hemoglobina bovina e que pode se constituir em um mecanismo de defesa do carrapato contra microrganismos (Fogaça e cols., 1999). Posteriormente dois outros peptídeos antimicrobianos (PAMs) presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas foram caracterizados, sendo uma defensina similar as defensinas de insetos (4,2 kDa, purificada dos hemócitos) e outro, um PAM rico em cisteínas denominado microplusina (10 kDa, purificado da hemolinfa; Fogaça e cols.; 2004). A microplusina foi o primeiro PAM pertencente à família dos PAMs ricos em cisteína, caracterizada por métodos biofísicos e bioquímicos, que apresenta regiões ricas em histidina nas porções N e C terminais (Silva e cols., 2009; Rezende e cols., 2009).

Assim como a hemolinfa total de *R. microplus*, esses peptídeos não apresentaram atividade sobre bactérias gram-negativas, apenas contra gram-positivas, sugerindo que organismos gram-negativos sejam potenciais alvos para controle de infestações por este carrapato (Fogaça e cols., 2004). BmCL1 e BmAP, duas aspartico proteinases presentes no intestino de fêmeas de *R. microplus* parecem estar envolvidas na geração de peptídeos antimicrobianos a partir de degradação das cadeias alfa e beta da hemoglobina (Cruz e cols., 2010). Os peptídeos gerados por estas enzimas foram classificados como hemocidinas e devem estar envolvidos com o controle da microbiota e de patógenos intestinais do carrapato (Cruz e cols., 2010).

A saliva do *R. microplus*, diferente do que é comum para a grande maioria dos hematófagos, possui dois anticoagulantes que agem inibindo trombina: BmAP (Horn e cols., 2000) e microfilina (Ciprandi e cols., 2006). Um desses inibidores purificados de saliva, BmAP (*Boophilus microplus Anticoagulant Protein*), é uma proteína de 60 kDa, enquanto o segundo, microfilina, é um peptídeo de apenas 1,7 kDa. Ambos inibem a agregação plaquetária induzida por trombina, mas interagem com a enzima de maneira diferente. O BmAP liga-se ao sítio ativo e ao exosítio I e a microfilina, por sua vez, liga-se apenas ao exosítio I, inibindo a atividade da trombina sobre fibrinogênio e sobre substrato peptídico sintético longo, mas não sobre substratos sintéticos de cadeia curta (Horn e cols., 2000).

Após evidenciar a presença de atividade cininásica em extrato de glândula salivar de *R. microplus*, (Bastiani e cols., 2002) purificaram e caracterizaram a enzima chamada de BooKase. Os ensaios de atividade demonstraram que a BooKase é uma metalo-endopeptidase ativada por tiol, capaz de hidrolisar bradicinina, um peptídeo biologicamente ativo importante no controle da pressão sanguínea e na resposta inflamatória. Porém, essa atividade de cininase não foi observada na saliva de fêmeas parcialmente ingurgitadas. Baseados nisso, os autores sugerem que o papel fisiológico da BooKase pode estar associado a estágios iniciais do parasitismo, como na saliva de larvas recém-fixadas (Bastiani e cols., 2002).

Untalan e cols. (2005), utilizando uma estratégia baseada na análise por espectrometria de massas, identificaram um grande número de proteínas expressas em larvas. Foram isoladas, por eletroforese bidimensional, e identificadas, por espectrometria de massas *in tandem*, 20 proteínas abundantes em larva de *R. microplus*. A maior parte das proteínas identificadas ainda não havia sido descrita em *R. microplus*. Entre elas, foram identificadas duas proteínas semelhantes à troponina, uma proteína de choque térmico, uma arginina-quinase, oito proteínas associadas à cutícula e duas proteínas associadas à glândula salivar.

Neupert e cols. (2005) identificaram um neuro-hormônio, o periviscerokina, envolvido na regulação do balanço osmótico em *I. ricinus* e *R. microplus*, por meio de espectrometria de massas<sup>9</sup>. Uma análise por MALDI-TOF direto do tecido do singânglio do carrapato *I. scapularis* elucidou a presença nesse tecido de 20 neuropeptídeos e 12 precursores com alta similaridade com neuropeptídeos de insetos (Neupert e cols., 2009). Os genes expressos no singânglio e em órgãos neurosecretórios acessórios do carrapato *Dermacentor variabilis* foram identificados por pirosequenciamento<sup>10</sup>. Um total de 14.881 sequências contínuas (“contigs”) foram montadas, estando presentes sete acetilcolinesterases, um receptor muscarínico de acetilcolina (Ach), dois receptores de dopamina, dois receptores gama aminobutíricos (GABA), dois transportadores GABA entre outros (Bissinger e cols., 2011). Também foram identificados hormônio da eclosão, corazonina e bursicon no singânglio do carrapato *D. variabilis*, moléculas que em insetos regulam o desenvolvimento da cutícula e a muda, sistema que pode ser modulado para regular a alimentação hematófaga (Bissinger e cols., 2011). A caracterização de moléculas provenientes do sistema nervoso central, que coordenam processos fisiológicos, pode ser interessante na busca por alvos para o controle do parasita.

Valenzuela e cols., (2002), identificou 87 sequências completas, em uma biblioteca de cDNA de glândula salivar de *I. scapularis*. Estas sequências foram comparadas ao resultado do sequenciamento de porções N-terminal de proteínas de extrato de glândula salivar e de saliva, gerando dados relevantes para o estudo da interação do carrapato com o hospedeiro vertebrado. Entre as sequências obtidas foram encontrados vários inibidores de proteases, metaloproteases e novas proteínas com domínios ligadores de histamina, além de peptídeos de funções desconhecidas. No mesmo ano, foi publicado um transcriptoma pioneiro da glândula salivar do carrapato *A. variegatum*, com o sequenciamento de 4.000 clones de cDNA (Nene e cols., 2002). Adicionalmente foi realizada a análise do transcriptoma da glândula salivar dos carrapatos *A. americanum* e *D. variabilis* (Bior e cols., 2002). Nesses oito anos, os estudos com sialotranscriptomas (do grego sialo, saliva) vêm evoluindo e várias novas famílias de proteínas exclusivas de carrapato vêm sendo identificadas. Em 2011, Ribeiro e colaboradores descreveram o sialoma do

---

<sup>9</sup> Método para identificar os diferentes átomos que compõe uma substância. Um espectrômetro de massa bombardeia uma substância com elétrons para produzir íons, ou átomos eletricamente carregados. Os íons atravessam um campo magnético que curva suas trajetórias de modos diferentes, dependendo de suas massas. O campo separa os íons em um padrão chamado espectro de massa. A massa e a carga dos íons podem ser medidas por sua posição no espectro.

<sup>10</sup> Método desenvolvido para sequenciamento de DNA em grande escala. No pirosequenciamento, pequenos fragmentos de DNA são ligados (com auxílio de sequências adaptadoras) a esferas microscópicas. Cada esfera captura um único fragmento de DNA. Cada esfera com um fragmento é isolada em uma gotícula de água em emulsão com óleo e submetida a um PCR em emulsão (emPCR). O sequenciamento é detectado pela emissão de luz gerada na incorporação do fragmento. Os fragmentos de DNA são sequenciados diretamente, sem necessidade de clonagem e de isolamento de clones e apresenta grande capacidade de leitura, pode ler 400-600 milhões de bases por 10 horas de corrida.



carrapato *A. variegatum* em um estudo proteômico com glândula salivar deste parasita (Ribeiro e cols., 2011). Todos esses estudos vêm desvendando inúmeras proteínas de função desconhecida, deste modo, a análise funcional dessas proteínas e o descobrimento de novos compostos farmacologicamente ativos torna-se imperativo.

### Genoma do carrapato.

A genômica é uma área recente no cenário científico. O primeiro organismo a ter o seu genoma completo sequenciado foi a bactéria *Haemophilus influenzae*, em 1995, seguindo-se de genomas de outros microorganismos até o do primeiro organismo eucariótico, a levedura, em 1996, o genoma da *Drosophila melanogaster*, em 2000, e o genoma humano, em 2003.

A necessidade de conhecer o genoma para avançar na pesquisa sobre carrapatos e doenças transmitidas por carrapatos têm sido reconhecida há vários anos. Em 2004, um consórcio internacional de pesquisadores iniciou um primeiro esforço para obter a seqüência completa do genoma de carrapatos relevantes para a medicina humana. O carrapato *I. scapularis*, transmissor da doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), anaplasmose (*Anaplasma phagocytophilum*) e babesiose (*Babesia microti*) (Belongia e cols., 2002, Krause e cols., 2002, Krause e cols., 2002) foi o primeiro carrapato a ter o genoma sequenciado. Em paralelo, estão em andamento projetos de sequenciamento em massa de ESTs<sup>11</sup> de *Amblyomma variegatum*, *R. appendiculatus*, *R. microplus* e *A. americanum*. Tomadas em conjunto, estas iniciativas representam o início de uma nova era na pesquisa sobre carrapatos e doenças transmitidas por carrapatos.

Já foi determinado o tamanho do genoma dos carrapatos *A. americanum* (1,08 pg de DNA por célula, ou  $1,04 \times 10^3$  Mbp) (Palmer e cols., 1994), *I. scapularis* (2,15 pg de DNA por célula, ou  $2,1 \times 10^3$  Mbp) e *R. microplus* (7,5 pg de DNA por célula, ou  $7,1 \times 10^3$  Mbp) (Ullmann e cols., 2005). Baseado nestes dados, está sendo organizado um consórcio internacional, coordenado por pesquisadores do Knippling-Bushland US Livestock Insects Research Laboratory (United States Department of Agriculture) visando o seqüenciamento em massa de ESTs e do genoma do *R. microplus* para viabilizar a obtenção de dados suficientes que permitam dar suporte básico para estudos de controle do carrapato.

### Estudos sobre *R. microplus* no Brasil.

O progresso da participação do Brasil nos estudos sobre o carrapato *R. microplus* pode ser compreendido analisando o número de publicações em revistas científicas.

No período de 1986 a 1996, usando a palavra-chave "*Boophilus microplus*" foram localizados 22 artigos de pesquisadores brasileiros em revistas indexadas no ISI, com apenas 2 artigos de pesquisadores participantes do Arthromint.

---

<sup>11</sup>Uma etiqueta de seqüência expressa (EST, na sigla em inglês) é um segmento seqüenciado de DNA de apenas algumas centenas de nucleotídeos na extremidade de um gene. Ela pode ser utilizada como um marcador para identificar um gene completo.

Em comparação, no período de 2001 a 2011, foram localizados 308 artigos, com 61 artigos de pesquisadores participantes do Arthromint. É importante ressaltar que neste período os trabalhos envolveram diferentes aspectos da biologia do carrapato, alguns exemplos são os estudos sobre métodos de controle biológico e imunológico, identificação de novas proteínas com a caracterização da função biológica, clonagem e expressão de genes. Em uma parcela significativa desses trabalhos existiu associação entre pesquisadores do grupo Arthromint.

### Considerações Finais.

Os problemas de resistência, o alto custo dos produtos químicos e da mão-de-obra na aplicação dos produtos, bem como o aparecimento de resíduos tóxicos na carne e no leite e a contaminação do ambiente, levam, cada vez mais, à procura de métodos biológicos e imunológicos como formas de controle do carrapato. Apesar de o controle imunológico ainda não satisfazer completamente as necessidades da pecuária, os diversos resultados obtidos com proteções parciais, tanto em experimentos controlados como em testes a campo, indicam que o desenvolvimento de uma vacina para o controle de carrapatos é um objetivo viável a médio e longo prazo.

Tabela II. Alguns eventos no estudo para uma vacina contra carrapato.

Ano/ Pesquisador	Descoberta
1918 Johnston e cols.,	Observação de resistência em carrapatos de campo
1976 Roberts e Kerr	Transferência passiva de anticorpos
1976 Brossard	Imunização com antígenos de glândula salivar
1982 Wikel	Caracterização da imunidade mediada por células
1988 Willadsen e cols.,	Purificação da Bm86
1994 Riding e cols.,	Purificação e clonagem da Bm91
1994/1995	Testes de campo com Bm86 (vacina comercial)
1996 Willadsen e cols.,	Imunização com Bm86-Bm91
1998 McKennae cols.,	Purificação e imunização com BMA7
1998 Logullo e cols.,	Purificação da BYC
1998 Da-Silva-Vaz e cols.,	Imunização com BYC
1999 De-Rose e cols.,	Vacina de DNA (gene da Bm86)
2000 García-García e cols.,	Imunização com Bm95
2002 Andreotti e cols.,	Imunização com inibidores de proteinases
2002 Patarroyo e cols.,	Imunização com peptídeos sintéticos de Bm86
2002 Valenzuela e cols.,	Transcriptoma da saliva de <i>I. scapularis</i>
2003 Seixas e cols.,	Purificação da VTDCE
2005 Guerrero e cols.,	Proposta de sequenciar o genoma do <i>R. microplus</i>
2005 Hill e cols.,	Genoma do <i>Ixodes scapularis</i>
2006 Leal e cols.,	Utilização de BYC recombinante em vacina
2008 Seixas e cols.,	Imunização de bovinos com VTDCE
2011 Parizi e cols.,	Imunização de bovinos com HIGST

## Referências Bibliográficas.

- Almazan, C., Blas-Machado U., Kocan, K.M., Yoshioka, J.H., Blouin, E.F., Mangold, A.J., De-la-Fuente, J., 2005a. Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. *Vaccine* 23, 4403-4416.
- Almazan, C., Kocan, K.M., Bergman, D.K., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, EF, De-la-Fuente, J., 2003. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 21, 1492-1501.
- Almazan, C., Kocan, K.M., Blouin, E.E., De-la-Fuente, J., 2005b. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine* 23, 5294-5298.
- Alves-Branco, F.P., Echevarria, F.A.M., Siqueira, A.S. 1983. Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. *Comunicado Técnico da EMBRAPA* 1, 1-4.
- Andreotti, R., Gomes, A., Malavazi-Piza, K.C., Sasaki, S.D., Sampaio, C.A.M., Tanaka, A.S., 2002. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *Int. Immunopharmacol.* 2, 557-563.
- Bastiani, M., Hillebrand, S., Horn, F., Kist, T.B.L., Guimaraes, J.A., Termignoni, C., 2002. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1439-1446.
- Bechara, G.H., Morelli Júnior, J., Szabó, M.P., 2000. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 570-575.
- Belongia, E.A., Naimi, T.S., Gale, C.M., Besser, R.E., 2002. Antibiotic use and upper respiratory infections: A survey of knowledge, attitudes, and experience in Wisconsin and Minnesota. *Prev. Med.* 34, 346-352.
- Bior, A.D., Essenberg, R.C., Sauer, J.R., 2002. Comparison of differentially expressed genes in the salivary glands of male ticks, *Amblyomma americanum* and *Dermacentor andersoni*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32, 645-655.
- Bissinger, B.W., Donohue, K.V., Khalil, S.M., Grozinger, C.M., Sonenshine, D.E., Zhu, J., Roe, R.M., 2011. Synganglion transcriptome and developmental global gene expression in adult females of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Insect Mol. Biol.* *In press*.
- Braz, G.R.C., Coelho, H.S.L., Masuda, H., Oliveira, P.L., 1999. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Curr. Bio.* 9, 703-706.
- Brossard, M. 1976. Immunologic relations between cattle and ticks, specifically between cattle and *Boophilus microplus*. *Acta Trop.* 33, 15-36.
- Brum, J.G.W., 1988. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* Grimont e cols., 1981: etiopatogenia e

- sazonalidade. Tese (Doutor em ciências). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, R.J.
- Coppolino, M.G., Dedhar, S., 1998. Calreticulin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 553-558.
- Cordovés, C.O., 1996. Carrapato: controle e erradicação. Alegrete. Gralha.
- Ciprandi, A., de Oliveira, S.K., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C., 2006. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Exp. Parasitol.* 114, 40-46
- Crampton, A.L., Baxter, C.D., Barker, S.C., 1999a. A new family of cytochrome P450 genes (CYP41) from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 29, 829-834.
- Crampton, A.L., Baxter, G.D., Barker, S.C., 1999b. Identification and characterization of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 377-384.
- Cruz, A.P., Silva, S.S., Mattos, R.T., Da Silva Vaz, I. Jr., Masuda, A., Ferreira, C.A., 2008. Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines. *Vet Parasitol.* 25, 152-158.
- Cruz, C.E., Fogaça, A.C., Nakayasu, E.S., Angeli, C.B., Belmonte, R., Almeida, I.C., Miranda, A., Miranda, M.T., Tanaka, A.S., Braz, G.R., Craik, C.S., Schneider, E., Caffrey, C.R., Daffre, S., 2010. Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. *Parasit Vectors.* 27, 3-63.
- Da-Costa, G.L., Sarquis, M.I.M., de Moraes, A.M.L., Bittencourt, V.R.E.P., 2002. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia* 154, 207-209.
- Da-Silva-Vaz Jr, I., Logullo, C., Sorgine, M., Velloso, F.F., Rosa-de-Lima, M.F., Gonzales, J.C., Masuda, H., Oliveira, P.L., Masuda, A., 1998. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66, 331-341.
- Da-Silva-Vaz Jr, I., Martinez, R.H., Oliveira, A., Heck, A., Logullo, C., Gonzales, J.C., Dewes, H., Masuda, A., 1996. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet. Parasitol.* 62, 155-160.
- Davey, R.B., George, J.E., Snyder, D.E., 2001. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae) on cattle. *Vet. Parasitol.* 99, 41-52.
- De-la-Fuente, J., Rodriguez, M., Montero, C., Redondo, M., Garcia-Garcia, J.C., Mendez, L., Serrano, E., Valdes, M., Enriquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boue, O., Machado, H., Leonart, R., 1999. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac (TM). *Genet. Anal.* 15, 143-148.
- De-Rose, R., McKenna, R.V., Cobon, G., Tennent, J., Zakrzewski, H., Gale, K., Wood, P.R., Scheerlinck, J.P.Y., Willadsen, P., 1999. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71, 151-160.

- Elder, J.K., Emmerson, F.R., Kearnan, J.F., Waters, K.S., Dunwell, G.H., Morris, R.S., Knott, S.G., 1980. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 3. Chemical control. *Aust. Vet.J.* 56, 212-218.
- Estrela, A.B., Seixas, A., Teixeira, V. de O., Pinto, A.F., Termignoni, C., 2010. Vitellin- and hemoglobin-digesting enzymes in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae and females. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 157, 326-335.
- Estrela, A., Seixas, A., Termignoni, C., 2007. A cysteine endopeptidase from tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) larvae with vitellin digestion activity. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 148, 410-416.
- Farias, N.A.R., Gonzales, J.C., Saibro, J.C., 1986. Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. *Pesqu. Agropec. Bras.* 21, 1313-1320.
- Fernandes, E.K., Bittencourt, V.R., 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Exp. Appl. Acarol.* 46, 71-93.
- Ferreira, C.A.S., Barbosa, M.C., Silveira, T.C.L., Valenzuela, J.G., Da-Silva-Vaz, Jr.I., Masuda, A., 2002a. cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. *Parasitol.* 125, 265-274.
- Ferreira, C.A.S., Da-Silva-Vaz Jr.I., da Silva, S.S., Haag, K.L., Valenzuela, J.G., Masuda, A., 2002b. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Exp. Parasitol.* 101, 25-34.
- Fogaça, A.C., da Silva, P.I., Miranda, M.T.M., Bianchi, A.G., Miranda, A., Ribolla, P.E.M., Daffre, S., 1999. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 274, 25330-25334.
- Fogaça, A.C., Lorenzini, D.M., Kaku, L.M., Esteves, E., Bulet, P., Daffre, S., 2004. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 191-200.
- Frazzon, A.P., Da-Silva-Vaz Jr., I., Masuda, A., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2000. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 94, 117-125.
- Freitas, D.R., Rosa, R.M., Moraes, J., Campos, E., Logullo, C., Da Silva Vaz I Jr., Masuda, A., 2007. Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146, 688-694.
- Freeman, J.M., Davey, R.B., Kappmeyer, L.S., Kammlah, D.M., Olafson, P.U. Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. *Parasit. Vectors* 3, 101.
- de Freitas, D.R., Vaz, I. da S. Jr., Masuda A., 2008. Expression and enzymatic activity of glutathione s-transferase in tissues of *Boophilus microplus* females. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 99-104.
- Garcia-Garcia, J.C., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Boue, O., Rodriguez, M., Joglar, M., Machado, H., Gonzalez, I.L., Valdes, M., Mendez, L., De-la-Fuente, J., 2000. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 18, 2275-2287.
- Gobert, G.N., 1998a. Immunolocalization of schistosome proteins. *Microsc. Res. Tech.* 42, 176-185.

- Gobert, G.N., 1998b. The role of microscopy in the investigation of paramyosin as a vaccine candidate against *Schistosoma japonicum*. *Parasitol. Today* 14, 115-118.
- Gonzales, J.C., 1995. O controle do carrapato do boi. 2<sup>ed</sup>. Porto Alegre. Edição do Autor.
- Guerrero, F.D., Miller, R.J., Rousseau, M.E., Sunkara, S., Quackenbush, J., Lee, Y., Nene, V., 2005. BmiGI: a database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 35, 585-595.
- Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., Cobenas, M.E.M., Scherling, N., Posse, F.G., Anziani, O.S., Ioppolo, M., 2000. Moxidectin pour-on for control of natural populations of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina : Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 87, 237-241.
- Häuserman, W., Friedel, T., Hess, E.A., Strong, M.B., 1992. A new active ingredient for a new approach to protect cattle against ticks In: *Proceedings of XIX International Congress of Entomology*. Beijing, China.
- He, H., Chen, A.C., Davey, R.B., Ivie, G.W., George, J.E., 1999. Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 737-743.
- Horn, F., Dos Santos, P.C., Termignoni, C., 2000. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: An antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 68-73.
- Imamura, S., Da-Silva-Vaz Jr., I., Sugino, M., Ohashi, K., Onuma, M., 2005. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine* 23, 1301-1311.
- Jaworski, D.C., Higgins, J.A., Azad, A.F., 1995a. Characterization of Calreticulin in Cat Fleas. *J. Cel. Biochem.* 208, 208.
- Jaworski, D.C., Simmen, F.A., Lamoreaux, W., Coons, L.B., Muller, M.T., Needham, G.R., 1995b. A Secreted Calreticulin Protein in Ixodid Tick (*Amblyomma-Americanum*) Saliva. *J. Insect. Physiol.* 41, 369-375.
- Jittapalapong, S., Kaewhom, P., Pumhom, P., Canales, M., de la Fuente, J., Stich, R.W., 2010. Immunization of rabbits with recombinant serine protease inhibitor reduces the performance of adult female *Rhipicephalus microplus*. *Transbound Emerg. Dis.* 57, 103-106.
- Johnston, L.A., Kemp, D.H., Pearson, R.D., 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on tick populations. *Int. J. Parasitol.* 16, 27-34.
- Jonsson, N.N., Mayer, D.G., Green, P.E., 2000. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Vet. Parasitol.* 88, 79-92.
- Kaaya, G.P., Mwangi, E.N., Ouna, E.A., 1996. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 67, 15-20.
- Kaaya, G.P., 2000. The potential for antitick plants as components of an integrated tick control strategy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 576-582.
- Kashino, S.S., Resende, J., Sacco, A.M., Rocha, C., Proença, L., Carvalho, W.A., Firmino, A.A., Queiroz, R., Benavides, M., Gershwin, L.J., De Miranda Santos, I.K., 2005. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine

immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp. Parasitol.* 110, 12-21.

- Kocan, K.M., 1995. Targeting Ticks for Control of Selected Hemoparasitic Diseases of Cattle. *Vet. Parasitol.* 57, 121-151.
- Kovacs, H., Campbell, I.D., Strong, P., Johnson, S., Ward, F.J., Reid, K.B.M., Eggleton, P., 1998. Evidence That C1q Binds Specifically to CH2-like Immunoglobulin gamma Motifs Present in the Autoantigen Calreticulin and Interferes with Complement Activation. *Biochemistry* 37, 17865-17874.
- Krause, P.J., 2002. Babesiosis. *Med. Clin. North. Am.* 86, 361-373.
- Krause, P.J., McKay, K., Thompson, C.A., Sikand, V.K., Lentz, R., Lepore, T., Closter, L., Christianson, D., Telford, S.R., Persing, D., Radolf, J.D., Spielman, A., 2002. Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: Babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. *Clin. Infect. Dis.* 34, 1184-1191.
- Laclette, J.P., Shoemaker, C.B., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D., Nicholsonweller, A., 1992. Paramyosin Inhibits Complement C1. *J. Immunol.* 148, 124-128.
- Labuda, M., Trimnell, A.R., Licková, M., Kazimírová, M., Davies, G.M., Lissina, O., Hails, R.S., Nuttal, P.A., 2006. An antivektor vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathog.* 2, e27.
- Leal, A.T., Pohl, P.C., Ferreira, C.A., Nascimento-Silva, M.C., Sorgine, M.H., Logullo, C., Oliveira, P.L., Farias, S.E., Da-Silva-Vaz, Jr. I., Masuda, A., 2006. Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 45, 107-114.
- Lee, A.J., Huntley, J., Van den Broek, A., Coates, D., Isaac, R.E., 2002. Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. *Vet. Parasitol.* 105, 49-63.
- Logullo, C., Da-Silva-Vaz, Jr. I., Sorgine, M.H., Paiva-Silva, G.O., Faria, F.S., Zingali, R.B., De Lima, M.F., Abreu, L., Oliveira, E.F., Alves, E.W., Masuda, H., Gonzales, J.C., Masuda, A., Oliveira, P.L., 1998. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitol.* 116, 525-532.
- Logullo, C., Moraes, J., Dansa-Petretski, M., Da-Silva-Vaz, Jr. I., Masuda, A., Sorgine, M.H.F., Braz, G.R., Masuda, H., Oliveira, P.L., 2002. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem, Mol. Biol.* 32, 1805-1811.
- McCosker, P.L., 1981. The global importance of babesiosis. In: Ristic, M., Kreir J. P. (Eds.) *Babesiosis*. New York, Academic Press.
- McKenna, R.V., Riding, G.A., Jarmey, J.M., Pearson, R.D., Willadsen, P., 1998. Vaccination of cattle against the *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. *Parasite Immunol.* 20, 325-336.
- Michalak, W.Z., Gibb, R.A., 1992. A Debt to the West - Recent Developments in the International Financial Situation of East-Central-Europe. *Prof Geogr* 44, 260-271.
- Mounsey, K.E., Pasay, C.J., Arlian, L.G., Morgan, M.S., Holt, D.C., Currie, B.J., Walton, S.F., McCarthy, J.S., 2010. Increased transcription of Glutathione S-transferases in acaricide exposed scabies mites. *Parasit. Vectors.* 18, 3-43.

- Murrell, A., Barker, S.C., 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol.* 56, 169-172.
- Nari, A., 1995. Strategies for the Control of One-Host Ticks and Relationship with Tick-Borne Diseases in South-America. *Vet. Parasitol.* 57, 153-165.
- Neupert, S., Predel, R., Russell, W.K., Davies, R., Pietrantonio, V., Nachman, R.J. 2005. Identification of tick periviscerokinin, the first neurohormone of Ixodidae: Single cell analysis by means of MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1860-1864.
- Nene, V., Lee, D., Quackenbush, J., Skilton, R., Mwaura, S., Gardner, M.J., Bishop, R.. 2002. AvGI, an index of genes transcribed in the salivary glands of the ixodid tick *Amblyomma variegatum*. *Int. J. Parasitol.* 32, 1447-1456.
- Neupert, S., Russell, W.K., Predel, R., Russell, D.H., Strey, O.F., Teel, P.D., Nachman, R.J., 2009. The neuropeptidomics of *Ixodes scapularis* synganglion. *J. Proteomics* 72, 1040-1045.
- Nolan, J., 1985. Mechanisms of Resistance to Chemicals in Arthropod Parasites of Veterinary Importance. *Vet. Parasitol.* 18, 155-166.
- Oneill, G.M., Donovan, G.R., Baldo, B.A., 1994. Cloning and Characterization of A Major Allergen of the House-Dust Mite, *Dermatophagoides Pteronyssinus*, Homologous with Glutathione-S-Transferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1219, 521-528.
- Palmer, M.J., Bantle, J.A., Guo, X., Fargo, W.S., 1994. Genome size and organization in the ixodid tick *Amblyomma americanum* (L.). *Insect. Mol. Biol.* 3, 57-62.
- Patarroyo, J.H., Portela, R.W., De Castro, R.O., Pimentel, J.C., Guzman, F., Patarroyo, M.E., Vargas, M.I., Prates, A.A., Mendes, M.A.D., 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet. Immunol. Immunopathol* 88, 163-172.
- Parizi, L.F., Rech, H., Ferreira, C.A., Imamura, S., Ohashi, K., Onuma, M., Masuda, A., Vaz I da S. Jr., 2009. Comparative immunogenicity of *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* calreticulins. *Vet. Parasitol.* 164, 282-290.
- Parizi, L.F., Utiumi, K.U., Imamura, S., Onuma, M., Ohashi, K., Masuda, A., da Silva Vaz, I. Jr., 2011. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Exp. Parasitol.* 127, 113-118.
- Polar, P., Moore, D., Kairo, M.T, Ramsubhag, A., 2008. Topically applied mycoacaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Exp. Appl. Acarol.* 46, 119-148.
- Pohl, P.C., Sorgine, M.H., Leal, A.T., Logullo, C., Oliveira, P.L., Vaz Ida S. Jr., Masuda, A., 2008. An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 151, 392-399.
- Prevot, P.P., Couvreur, B., Denis, V., Brossard, M., Vanhamme, L., Godfroid, E., 2007. Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine* 25, 3284-3292.
- Pruett, J.H., 1999. Immunological control of arthropod ectoparasites - a review. *Int. J. Parasitol.* 29, 25-32.
- Renard, G., Garcia, J.F., Cardoso, F.C., Richter, M.F., Sakanari, J.A., Ozaki, L.S., Termignoni, C., Masuda, A., 2000. Cloning and functional expression



of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. Insect. Biochem. Mol. Biol. 30, 1017-1026.

- Renard, G., Lara, F.A., de Cardoso, F.C., Miguens, F.C., Dansa-Petretski, M., Termignoni, C., Masuda, A., 2002. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. Insect. Mol. Biol. 11, 325-328.
- Rezende, C.A., Silva, F.D., Daffre, S., Pires, J.R. 2009. (1)H, (15)N and (13)C assignments of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* anti-microbial peptide microplusin. Biomol. NMR Assign. 3, 187-189.
- Riding, G.A., Jarmey, J., McKenna, R.V., Pearson, R., Cobon, G.S., Willadsen, P. 1994. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization and possible function. J. Immunol. 153, 5158-5166.
- Roberts, J.A., Kerr, J.D., 1976. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. J. Parasitol. 62, 485-488.
- Rosa-de-Lima, M.F., Sanchez, Ferreira, C.A., Joaquim de Freitas, D.R., Valenzuela J.G., Masuda, A., 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 747-754.
- Rufingier, C., Pasteur, N., Lagnel, J., Martin, C., Navajas, M., 1999. Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Homoptera : Aphididae) from France. Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 385-391.
- Samish, M., Glazer, I., 2001. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. Trends Parasitol. 17, 368-371.
- Samish, M., Ginsberg, H., Glazer, I., 2004. Biological control of ticks. Parasitology 129 Suppl., S389-403.
- Sanders, M.L., Glass, G.E., Nadelman, R.B., Wormser, G.P., Scott, A.L., Raha, S., Ritchie, B.C., Jaworski, D.C., Schwartz, B.S., 1999. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* (say) and are correlated with tick engorgement indices. Am. J. Epidemiol. 149, 777-784.
- Sanders, M.L., Jaworski, D.C., Sanchez, J.L., DeFraitas, R.E., Glass, G.E., Scott, A.L., Raha, S., Ritchie, B.C., Needham, G.R., Schwartz, B.S., 1998. Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59, 279-285.
- Seddon, H.R., 1967. Diseases of Domestic Animals in Australia, Part 3, Arthropod Infestations, Ticks and Mites. Ed. and revised: H.E. Albiston, commonwealth of Australia, Dept. Health, Canberra.
- Seifert, G.W., Springel, P.H., Tatchell, R.J., 1968. Radioactive Studies on Feeding of Larvae Nymphs and Adults of Cattle Tick *Boophilus microplus* (Canestrini). Parasitol. 58, 415.
- Seixas A., Dos Santos, P.C., Velloso, F.F., Da-Silva-Vaz, Jr.I., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C. 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. Parasitol 126, 155-163.
- Seixas, A., Estrela, A.B., Ceolato, J.C., Pontes, E.G., Lara, F., Gondim, K.C., Termignoni, C., 2010. Localization and function of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. Parasitol. 137, 1819-1831.

- Seixas, A., Leal, A.T., Nascimento-Silva, M.C., Masuda, A., Termignoni, C., da Silva Vaz, I. Jr., 2008. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124, 332-340.
- Seixas, A., Oliveira, P., Termignoni, C., Logullo, C., Masuda, A., da Silva Vaz I Jr. 2011. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. *Vet. Immunol, Immunopathol.* In press.
- Silva, F.D., Rezende, C.A., Rossi, D.C., Esteves, E., Dyszy, F.H., Schreier, S., Gueiros-Filho, F., Campos, C.B., Pires, J.R., Daffre, S., 2009. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J. Biol. Chem.* 284, 34735-34746.
- Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of Ticks*. 1st Ed. Vol. 1. New York. Oxford University Press.
- Sorgine, M.H.F., Logullo, C., Zingali, R.B., Paiva-Silva, G.O., Juliano, L., Oliveira, P.L., 2000. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 275, 28659-28665.
- Sossai, S., Peconick, A.P., Sales-Junior, A., Marcelino, F.C., Vargas, M.I., Neves, E.S., Patarroyo, J.H., 2005. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.* 37, 199-214.
- Sugino, M., Imamura, S., Mulenga, A., Nakajima, M., Tsuda, A., Ohashi, K., Onuma, M., 2003. A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine* 21, 2844-2851.
- Sutherst, R.W., Jones, R.J., Schnitzerling, H.J., 1982. Tropical Legumes of the Genus *Stylosanthes* Immobilize and Kill Cattle Ticks. *Nature* 295, 320-321.
- Sutherst, R.W., Maywald, G.F., Kerr, J.D., Stegeman, D.A., 1983. The Effect of Cattle Tick (*Boophilus-Microplus*) on the Growth of *Bos-Indicus* X *Bos-Taurus* Steers. *Aust. J. Agric. Res.* 34, 317-327.
- Tellam, R.L., Kemp, D., Riding, G., Briscoe, S., Smith, D., Sharp, P., Irving, D., Willadsen, P., 2002. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Vet. Parasitol.* 103, 141-156.
- Toro-Ortiz, R.D., Da-Silva-Vaz Jr., I., Gonzales, J.C., Masuda, A., 1997. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. *Vet. Parasitol.* 69, 297-306.
- Trimnell, A.R., Davies, G.M., Lissina, O., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 2005. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine* 23, 4329-4341.
- Trimnell, A.R., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 2002. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine* 20, 3560-3568.
- Turni, C., Lee, R.P., Jackson, L.A., 2002. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leucocytes from Brahman and Hereford cattle. *Parasite Immunol.* 24, 355-361.
- Ullmann, A.J., Lima, C.M., Guerrero, F.D., Piesman, J., Black, W.C., 2005. Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* and the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect. Mol. Biol.* 14, 217-222.
- Untalan, P.M., Guerrero, F.D., Haines, L.R., Pearson, T.W., 2005. Proteome analysis of abundantly expressed proteins from unfed larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 35, 141-151.

- Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M.B., Pham, V.M., Garfield, M.K., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.C., 2002. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J. Exp. Biol.* 205, 2843-2864.
- Ribeiro, J.M., Anderson, J.M., Manoukis, N.C., Meng, Z., Francischetti, I.M. 2011. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics*. 12, 136.
- Valle, M.R., Mendez, L., Valdez, M., Redondo, M., Espinosa, C.M., Vargas, M., Cruz, R.L., Barrios, H.P., Seoane, G., Ramirez, E.S., Boue, O., Vigil, J.L., Machado, H., Nordelo, C.B., Pineiro, M.J., 2004. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac. *Exp. Appl. Acarol.* 34, 375-382.
- Vanamerongen, A., Sauerwein, R.W., Beckers, P.J.A., Mueloen, R.H., Meuwissen, J.H.E.T., 1989. Identification of a Peptide Sequence of the 25 Kd Surface Protein of *Plasmodium-Falciparum* Recognized by Transmission-Blocking Monoclonal-Antibodies - Implications for Synthetic Vaccine Development. *Parasite Immunol.* 11, 425-428.
- Wharton, R.H., Norris, K.R., 1980. Control of Parasitic Arthropods. *Vet. Parasitol.* 6, 135-164.
- Wikel, S.K., 1982. Histamine Content of Tick Attachment Sites and the Effects of H-1 and H-2 Histamine-Antagonists on the Expression of Resistance. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 76, 179-185.
- Wikel, S.K., 1996. Host immunity to ticks. *Ann. Rev. Entomol.* 41, 1-22.
- Wikel, S.K., Bergman, D., 1997. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitol. Today* 13, 383-389.
- Willadsen, P., Kemp, D.H., 1988. Vaccination with "concealed" antigens for tick control. *Parasitol. Today* 4, 196-198.
- Willadsen, P., McKenna, R.V., Riding, G.A. 1988. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *Int. J. Parasitol.* 18, 183-189.
- Willadsen, P., Smith, D., Cobon, G., McKenna, R.V., 1996. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol.* 18, 241-246.
- Zhioua, E., Browning, M., Johnson, P.W., Ginsberg, H.S., Lebrun, R.A., 1997. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Parasitol.* 83, 815-818.