

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAMUNDONGOS
PARA A PROTEÍNA GLUTATIONA S-TRANSFERASE DE *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* (GST-Bm), E DE *Haemaphysalis longicornis* (GST-Hl).**

Dissertação de Mestrado

KIYOKO UEMURA UTIUMI

PORTO ALEGRE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAMUNDONGOS
PARA A PROTEÍNA GLUTATIONA S-TRANSFERASE DE *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* (GST-Bm), E DE *Haemaphysalis longicornis* (GST-Hl).**

Kiyoko Uemura Utiumi

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias.

Orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior

Co-orientadora: Dra. Aoi Masuda

Porto Alegre
Fevereiro, 2008

KIYOKO UEMURA UTIUMI

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CAMUNDONGOS
PARA A PROTEÍNA GLUTATIONA S-TRANSFERASE DE *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* (GST-Bm), E DE *Haemaphysalis longicornis* (GST-HI).**

Aprovada em

APROVADO POR

Prof Dr Itabajara da Silva Vaz Junior
Orientador e Presidente da Comissão

Prof Dr John Furlong
Membro da Comissão

Prof Dr Mario Augusto Ono
Membro da Comissão

Profª Dra Elizabeth Cirne-Lima
Membro da Comissão

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul – UFRGS, com apoio financeiro do PRONEX, FINEP, FAPERGS E CAPES.

DEDICATÓRIA

A meu irmão Nobuo Utiumi Uemura (*in memoriam*), pelo exemplo de força,
caráter e dedicação...

AGRADECIMENTOS

À Dra. Aoi Masuda, pela oportunidade e ensinamentos transmitidos nesse período.

Ao Dr. Itabajara Vaz, pela orientação e valiosa contribuição na execução dos trabalhos.

À Dra. Sandra Farias, pelos ensinamentos e valiosa amizade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e aos órgãos de fomento, PRONEX, FINEP, FAPERGS E CAPES.

A todos os funcionários do Centro de Biotecnologia.

À toda minha família, pelo apoio incondicional e compreensão nos momentos de ausência.

Em especial, às minhas crianças, Bi e Gu, pelas alegrias e por tudo que representam.

A todos os colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada a Sanidade Animal, e aos colegas do Setor de Patologia Veterinária.

Aos amigos Pedro, Isis, Cíntia Bezerra, e Letícia Sperafico pelo carinho nestes dois anos e valiosa amizade.

Aos “amigos de Campos”, Helga, Niltinho, Eldo e Jozi pela preciosa amizade.

Ao DJ pelos momentos compartilhados juntos, pelo apoio nos momentos de dificuldade e principalmente pelo seu amor e carinho....

À DEUS!!!!

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	15
1.2 Ciclo de vida.....	18
1.2.1 O carrapato <i>R. microplus</i>	18
1.2.2 O carrapato <i>Haemaphysalis longicornis</i>	19
1.3 Métodos de controle	22
1.3.1 Controle químico	22
1.3.2 Controle biológico	22
1.3.3 Controle imunológico	25
1.4 A proteína Glutathiona S-transferase (GST)	32
2 OBJETIVOS DO TRABALHO	35
3 MATERIAIS	36
3.1 Tampões para gel de poliacrilamida.....	36
3.2 Tampões e soluções para Western-blotting.....	36
3.3 Tampões e soluções para ELISA.....	36
3.4 Tampões para cromatografia de afinidade a glutathiona.....	37
3.5 Coluna de cromatografia	37
3.6 Gel de poliacrilamida desnaturante	37
3.7 Meios.....	37
4 MÉTODOS.....	38
4.1 Expressão da GST-Bm e GST-H1.....	38
4.2 Purificação da GST-Bm e GST-H1	38
4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	39
4.4 Western-blotting.....	39

4.5	Imunização dos camundongos.....	39
4.6	Titulação dos soros dos camundongos por ELISA	40
5	RESULTADOS	42
5.1	Expressão e purificação das GST-Bm e GST-H1	42
5.2	Cinética de produção de anticorpos IgM e IgG dos camundongos imunizados com GST-H1, GST-Bm e <i>E. coli</i>	44
5.3	Titulação de anticorpos anti-GST-H1	47
6	DISCUSSÃO.....	48
7	CONCLUSÕES.....	53
8	PERPECTIVAS.....	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

° C	graus Celsius
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
BmTIs	inibidores de tripsina de <i>R. microplus</i>
BYC	<i>Boophilus Yolk pro-Cathepsin</i>
cDNA	DNA complementar
CRT	<i>Calreticulin</i>
D.O.	densidade óptica
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
IgG	imunoglobulina G
IPTG	isopropionil-B-D-tiogalactopiranosídeo
NBT	<i>nitroblue tetrazolium</i>
OPD	o-fenilenodiamina
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
SDS	dodecilssulfato de sódio
THAP	<i>Tick Heme-binding Aspartic proteinase</i>
VTDC	<i>Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase</i>

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Divisão dos grupos de camundongos Balb/c que foram imunizados.....40

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Mapa da distribuição geográfica do carrapato *R. microplus*; pontos em preto indicam a presença do carrapato, desde o norte da Argentina até o México, incluindo as ilhas do Caribe17
- FIGURA 2 - Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato *R. microplus*.19
- FIGURA 3 - Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato *H. longicornis*21
- FIGURA 4 - Cronograma das imunizações e coleta de sangue dos camundongos40
- FIGURA 5 - SDS-PAGE 14% - expressões e purificações das GST-Bm e GST-HI, coradas com Coomassie blue. Linha 1, amostra do extrato protéico de bactéria *E. coli* expressando a GST-Bm; linha 2, GST-Bm purificada; linha 3, extrato total da expressão da GST-HI; linha 4, GST-HI purificada42
- FIGURA 6 - Western blot das GST-Bm e GST-HI purificadas. Linha 1, IgG bovino, linha 2 GST-Bm, linha 3, GST-HI. Foi utilizado conjugado fosfatase anti-IgG coelho (1:5000)43
- FIGURA 7 - Cinética por teste de ELISA para detectar anticorpos IgG contra *E.coli* nos soros dos camundongos. 3 e 4 camundongos inoculados com GST-HI emulsificado com adjuvante Montanide 888/Marcol 52; 9, 10, 11, camundongos inoculados com GST-Bm emulsificado com adjuvante Montanide 888/Marcol 52; 13 e 14, camundongos inoculados com *E. coli* saponina; 15 e 16, camundongos inoculados com *E. coli* emulsificado com adjuvante Montanide 888/Marcol 52; 17 e 18, camundongos inoculados com *E. coli* somente44
- FIGURA 8 - Cinética por teste de ELISA para detecção de IgM nos soros dos camundongos inoculados com GST-HI. 1 e 2, camundongos inoculados com GST-HI saponina; 3 e 4, camundongos inoculados com GST-HI Montanide 888/Marcol 52; 5 e 6, camundongos inoculados com GST-HI somente.....45
- FIGURA 9 - Cinética por teste de ELISA para detecção de anticorpos IgM nos soros dos camundongos inoculados com GST-Bm. 7 e 8, camundongos inoculados com GST-Bm saponina; 10 e 11, camundongos inoculados com GST-Bm Montanide 888/Marcol 52; 12 e 13, camundongos inoculados com GST-Bm somente.45
- FIGURA 10 - Cinética por teste de ELISA para detecção de IgG nos soros dos camundongos inoculados com GST-HI. 1 e 2, camundongos inoculados com

GST-HI saponina; 3 e 4, camundongos inoculados com GST-HI Montanide 888/Marcol 52; 5 e 6, camundongos inoculados com GST-HI somente.....	46
FIGURA 11 - Cinética por teste de ELISA para detecção de IgG nos soros dos camundongos inoculados com GST-Bm. 7 e 8, camundongos inoculados com GST-Bm saponina; 9, 10 e 11, camundongos inoculados com GST-Bm Montanide 888/Marcol 52; 12 e 13, camundongos inoculados com GST-Bm somente. Camundongos 14 – 25 foram animais controle, e não estão incluídos na figura	47
FIGURA 12 - Cinética por ELISA para detecção de IgG nos soros dos camundongos após quarta imunização com GST-Bm. 7 e 8, camundongos inoculados com GST-Bm saponina, 9, 10 e 11, camundongos inoculados com GST-Bm Montanide 888/Marcol 52 e 12 e 13, camundongos inoculados com GST-Bm somente. O soro dos camundongos foram diluídos 1:200 e detectados com conjugado peroxidase anti-IgG camundongo diluído 1:2000	47
FIGURA 13 - Titulação por ELISA para detecção de IgG nos soros dos camundongos imunizados com GST-HI. 1 e 2, camundongos inoculados com GST-HI saponina; 3 e 4, camundongos inoculados com GST-HI Montanide 888/Marcol 52; 5 e 6, camundongos inoculados com GST-HI somente. Cam*: camundongos.....	48

RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasito hematófago que infesta os rebanhos bovinos de regiões tropicais e subtropicais, e é um dos principais causadores de prejuízos econômicos à pecuária. O principal método de controle baseia-se no uso de acaricidas. No entanto, devido à crescente preocupação com os problemas criados pela poluição química do meio ambiente, ao alto custo e toxicidade das drogas e ao aparecimento de carrapatos resistentes aos acaricidas, métodos alternativos para o controle do *R. microplus* devem ser encontrados. Um dos métodos alternativos estudados é o uso de vacinas. As glutatona S-transferases (GST) são enzimas que estão presentes em organismos animais e vegetais e entre suas funções podem-se destacar transporte intracelular, participação em processos digestivos, síntese de prostaglandinas, e detoxificação de substâncias tóxicas e proteção contra estresse oxidativo. Neste estudo foi analisada a resposta imunológica comparativa de camundongos para a GST de *R. microplus* (GST-Bm) e para a GST de *Haemaphysalis longicornis* (GST-Hl). Ambas as proteínas foram expressas em *Escherichia coli* linhagem AD494, e purificadas por cromatografia de afinidade por glutatona utilizando a coluna GSTrap FF. Para verificar a imunogenicidade das proteínas, foram utilizados 25 camundongos Balb/c divididos em 12 grupos. As condições testadas foram as inoculações das proteínas GST-Bm e GST-Hl com os adjuvantes Montanide, saponina ou sem adjuvantes. Camundongos controle foram inoculados com extrato de *E. coli* ou somente com os adjuvantes. Foi coletado sangue de todos os animais com intervalos de sete dias durante 70 dias. Os soros foram analisados por ELISA para acompanhar a cinética da produção de anticorpos de todos os animais imunizados. Os camundongos inoculados com GST-Hl emulsificada com Montanide mostraram aumento dos níveis de anticorpos a partir do dia 21. O nível máximo de anticorpos foi detectado no dia 42, e diminuiu após o dia 56. Todos os outros animais não apresentaram aumento nos níveis de anticorpos.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (B) microplus*, *Haemaphysalis longicornis*, GST-Bm, GST-Hl, ELISA, vacinas, carrapato, bovinos.

ABSTRACT

Rhipicephalus (Boophilus) microplus tick is a hematophagous ectoparasite that infests cattle in tropical and subtropical regions and is one of the principal causes of economic losses in the cattle farm. The principal method of control is the use of acaricides. However, due to increased worry about environmental chemical pollution, high costs and drugs toxicity and the selection of ticks resistant to acaricides, alternative methods for *R. microplus* control should be developed. One of these methods is vaccination. Glutathione S-transferases (GSTs) enzymes are present in animal and vegetal organisms and the functions are intracellular transport, participation in digestive process, synthesis of prostaglandins and detoxification of toxic substances and protection against oxidative stress. In this study the immunological response of mice inoculated with *R. microplus* GST (GST-Bm) and with *Haemaphysalis longicornis* GST (GST-HI) was analysed. Both proteins were expressed in *Escherichia coli* strain AD494 and were purified by affinity chromatography using GSTrap FF column. To verify the protein immunogenicity, 25 Balb/c mice divided into 12 groups were used. The tested conditions were inoculation of GST-Bm, GST-HI proteins with Montanide and saponin adjuvants or without adjuvant. Control mice were inoculated with *E. coli* extract or the adjuvant alone. Blood from all animals were collected with intervals of seven days during seventy days, the sera were analyzed by ELISA to verify the kinetic of antibodies production of all immunized animals. Mice inoculated with GST-HI emulsified with Montanide showed an increase in the antibodies levels from day 21. The maximum level of antibodies was detected on day 42 and decreased after day 56. The other animals did not show an increase in antibodies levels.

Keywords: *Rhipicephalus (B) microplus*, *Haemaphysalis longicornis*, GST-Bm, GST-HI, ELISA, vaccines, ticks, bovines.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O carrapato *Rhipicephalus (B) microplus*

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (HORAK *et al.*, 2002), anteriormente chamado de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887), conhecido popularmente como carrapato do boi ou carrapato bovino, é um ectoparasito hematófago que tem sua origem na Ásia, e tem como principal hospedeiro o bovino, embora seja capaz de completar seu ciclo de vida em outros animais, como a ovelha, o cavalo, o búfalo e o veado (GONZALES, 1995). Quando ocorre alta infestação nos bovinos, este carrapato pode, eventualmente, parasitar humanos durante a manipulação do animal (GUGLIELMO *et al.*, 2006, p.121). Pertence ao filo *Arthropoda*, classe *Arachnida*, ordem *Acarina* e família *Ixodidae*, conhecida como família dos carrapatos duros, e caracteriza-se pela presença de escudo quitinoso. Os membros da classe *Arachnida* caracterizam-se pela presença de quatro pares de patas, corpo composto por cefalotórax e abdômen e peças bucais modificadas (URQUHART *et al.*, 1998). Sua distribuição no mundo inclui os grandes rebanhos comerciais da América (Figura 1), África, Ásia e Oceania, entre os paralelos 32° N e 32° S (JOHNSTON *et al.*, 1986, GONZALES, 1995), sendo considerado o carrapato de maior significado econômico dos que afetam a pecuária destas áreas. Deste modo, o controle deste ectoparasito é motivo de grandes preocupações para os bovinocultores, a ponto de centralizar as atenções da indústria de carrapaticidas, órgãos governamentais e instituições de ensino e de pesquisa de vários países (MARTINS *et al.*, 2006, p.145). Durante sua fase parasitária, um único carrapato suga de 2 a 3 ml de sangue (GONZALES, 1995), e isto reflete em grandes perdas na produção de leite e carne (SUTHERST *et al.*, 1983, LEAL *et al.*, 2006), além dos danos ao couro do bovino causados pelas lesões e reações inflamatórias nos pontos de fixação do carrapato (PATARROYO & LOMBANA, 2004); ainda é vetor de hemoparasitos como os protozoários do gênero *Babesia* e da riquetsia *Anaplasma marginale*, agentes da doença infecciosa, tristeza parasitária bovina (TPB) (McCOSKER, 1981; YOUNG *et al.*, 1986; GUGLIELMO *et al.*, 2006, p.122). Além dos prejuízos diretos causados pela infestação parasitária, existem despesas adicionais vinculadas aos métodos de controle, como despesas com instalações e

equipamentos necessários à aplicação nos rebanhos e mão-de-obra, aquisição de carrapaticidas, além do tempo de carência após a aplicação das drogas (CORDOVÉS, 1996, JONSSON *et al.* 2000). Os maiores impactos econômicos do *R. microplus* na produção bovina são observados na América do Sul, América Central e Austrália (COBON & WILLADSEN, 1990). Estima-se que, anualmente, as perdas decorrentes da infestação pelo *R. microplus* cheguem a 1 bilhão de dólares americanos no Brasil (GOMES, 1998).

O Brasil atualmente é um dos maiores produtores de carne bovina do mundo, possui um rebanho de mais de 200 milhões de cabeças, exportou cerca de 1 milhão de toneladas de carne *in natura* e aproximadamente 250 mil toneladas de carne industrializada e miúdos, no período entre janeiro e setembro de 2007 (ABIEC, 2007). Sendo assim, o controle do carrapato bovino é fundamental para manter a sanidade dos rebanhos bovinos brasileiros e para aumentar a produtividade desta que é uma atividade de fundamental importância para o país.

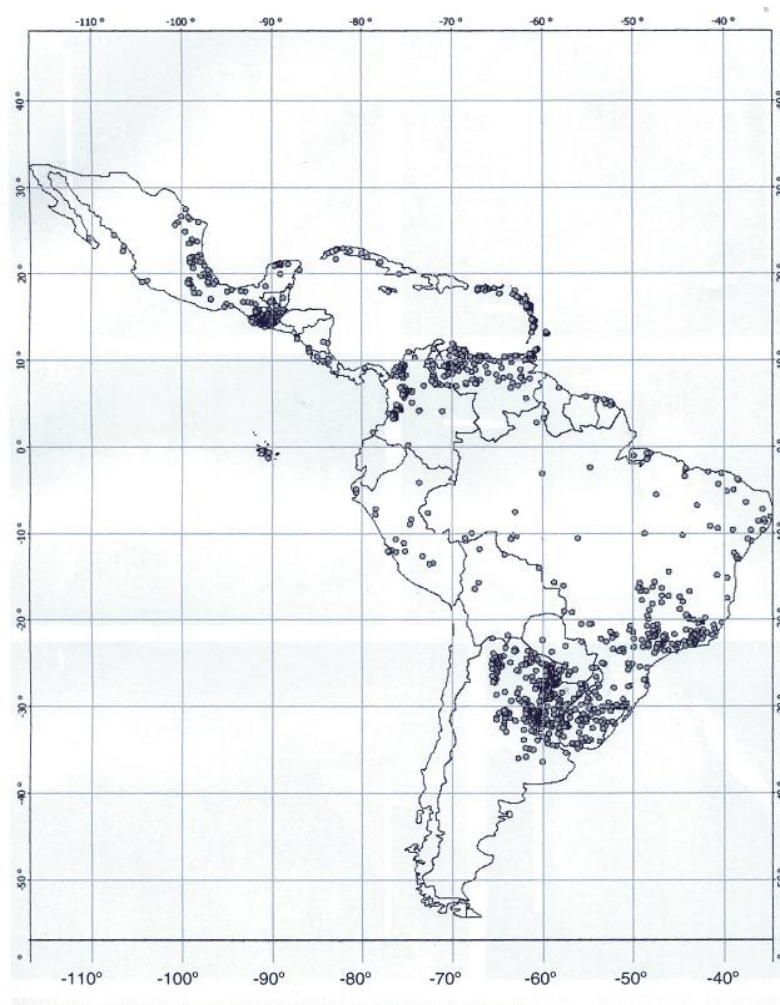


Figura 1 Mapa da distribuição geográfica do carrapato *R. microplus* nas Américas; pontos em preto indicam a presença do carrapato, desde o norte da Argentina até o México, incluindo as ilhas do Caribe. (Fonte: Guglielmo *et al.*, 2006, p.136)

1.2 Ciclo de vida

1.2.1 O carrapato *R. microplus*

O ciclo biológico do carrapato *R. microplus* divide-se em duas fases: a fase de vida livre e a fase de vida parasitária.

A fase de vida livre ocorre no meio ambiente e pode variar de 20 dias a vários meses, dependendo das condições climáticas, como temperatura e umidade, e do volume de sangue ingurgitado. Esta fase tem início quando as teleóginas (fêmeas completamente ingurgitadas) se desprendem do hospedeiro e caem ao solo, e termina quando as larvas encontram um hospedeiro. Elas possuem geotropismo positivo e buscam abrigo no solo e vegetação para iniciar o período de pré-postura que dura de 2 a 3 dias, dependendo do volume de sangue ingerido e da temperatura ambiente. Após esse período, que é o tempo necessário para o início da formação dos ovos, as teleóginas iniciam o processo de postura, que dura aproximadamente de 12 a 15 dias e cerca de 7 dias após o final da postura, inicia-se a eclosão dos ovos, que dura em torno de 5 dias (GONZALES, 1995). Em condições apropriadas, com alta umidade e temperatura ao redor de 24-28° C, uma fêmea ingurgitada pode transformar 50 a 60% de seu peso corporal em ovos, 2000 a 4000 ovos por fêmea, com eclosão de 85 a 95% das larvas. Estas podem sobreviver sem alimentação por 30 dias em ambientes quentes e mais de 120 dias em condições climáticas amenas (CORSON *et al*, 2004, GUGLIELMONE *et al.*, 2006, p.122). Após um período de aproximadamente 7 dias as neolarvas transformam-se em larvas infectantes, aptas a iniciar a fase de vida parasitária (GONZALES, 1995). As larvas migram para as pontas da vegetação, de onde localizam o hospedeiro pelo odor, vibrações e sombreamento (WALADDE & RICE, 1982).

A fase de vida parasitária tem duração de cerca de 21 dias. Esta fase inicia-se quando as larvas infestam o bovino na pastagem e migram para determinadas regiões corporais, como a região posterior das coxas e as regiões perianal e perivulvar, as quais são mais propícias para o seu desenvolvimento devido à espessura, vascularização e temperatura da pele (CORDOVÉS *et al.*, 1996). Durante esta fase, o carrapato passa por vários instares até atingir a fase adulta. Os instares e seus respectivos períodos de duração são: larva a metalarva (4 dias), metalarva a

ninfa (4 dias), ninfa a metaninfa (3 dias), a partir desta fase, ocorre o dimorfismo sexual; metaninfa a neandro (3 dias), e gonandro (1-2 dias), macho adulto, metaninfa a neógina (4 dias) neógina a partenógina (3 dias) e partenógina a teleógina (3-4 dias), fêmea adulta (GONZÁLES, 1995). A figura 2 ilustra o ciclo de vida do carrapato *R. microplus*.

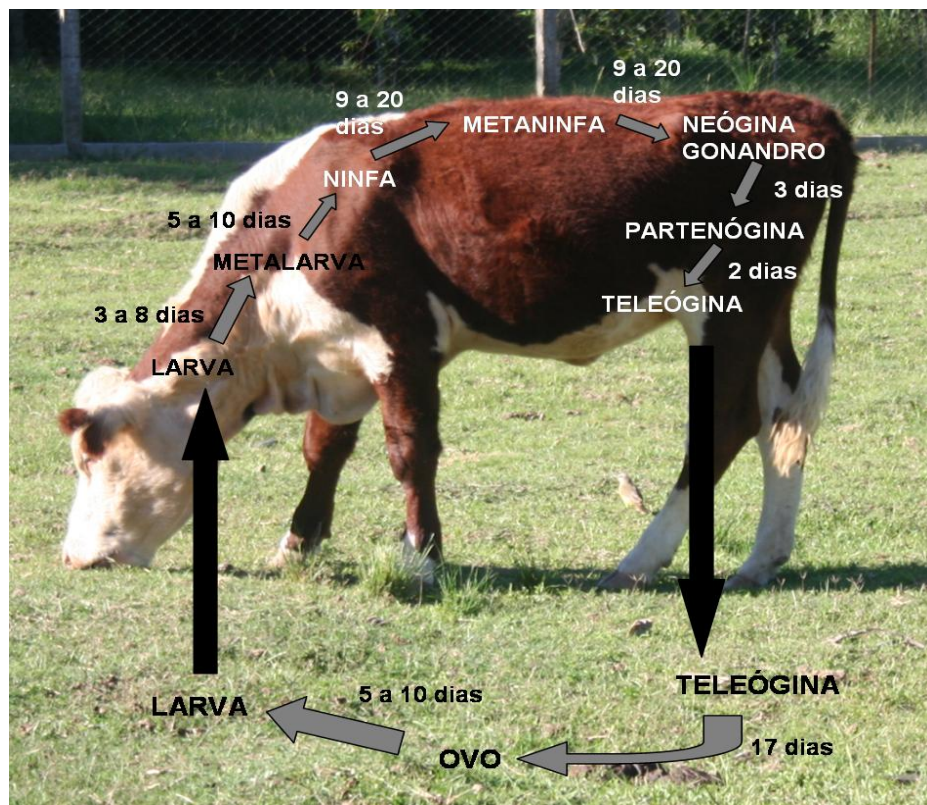


Figura 2- Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato *R. microplus*.

1.2.2 O carrapato *Haemaphysalis longicornis*

O gênero *Haemaphysalis* é o segundo maior em número de espécies de carrapato no mundo (ONOFRIO *et al.*, 2006, p.31). É encontrado nos países do leste da Ásia (IMAMURA *et al.*, 2005). São carrapatos que frequentemente infestam rebanhos bovinos e cães (HARNNOI *et al.*, 2006). São vetores da *Babesia gibsoni*, *B. ovata*, *Rickettsia japonica* (UMEMIYA *et al.*, 2007), além da *Theileria sargenti* e *T. buffeli* que são responsáveis por doenças de maior importância econômica nos rebanhos bovinos (SUGINO *et al.*, 2003). A teileriose, causada pela *T. sargenti*, é a principal doença de importância econômica transmitida por carrapatos no Japão

(IMAMURA *et al.*, 2005). A doença não é letal, mas bovinos infectados apresentam-se anêmicos, anoréxicos e exibem uma redução na taxa de crescimento (SHIMIZU *et al.*, 2000).

Todas as espécies deste gênero possuem um ciclo de três hospedeiros. A oviposição pode durar de uma a duas semanas, e cada fêmea pode produzir até 2000 ovos neste período. A incubação dos ovos pode variar de 60 a 90 dias, dependendo da temperatura e da umidade. Após a eclosão, as larvas infestam o hospedeiro e ficam fixadas por até 5 dias. Quando estão completamente alimentadas com sangue, as larvas caem ao solo, se escondem em lugar escuro e úmido e entram numa fase de pré ecdise, no qual podem ficar por 30 dias, dependendo novamente da temperatura e umidade. Mudam então para ninfas, estas infestam novamente o hospedeiro e se alimentam em média por 7 dias. Quando estão alimentadas caem ao solo novamente e ficam cerca de 40 dias na vegetação até mudarem para adultas. Após a muda para adultas, infestam o hospedeiro e fixam-se, alimentando-se por cerca de 7 dias podendo ficar mais tempo em alimentação dependendo da temperatura. Quando estão completamente alimentadas, elas caem ao solo e iniciam o período de postura. As fêmeas frequentemente sobrevivem por 2 a 3 semanas após a ovipostura (HEATH, A.C.G., 2007). O ciclo biológico do carrapato *H. longicornis* está representado na Figura 3.

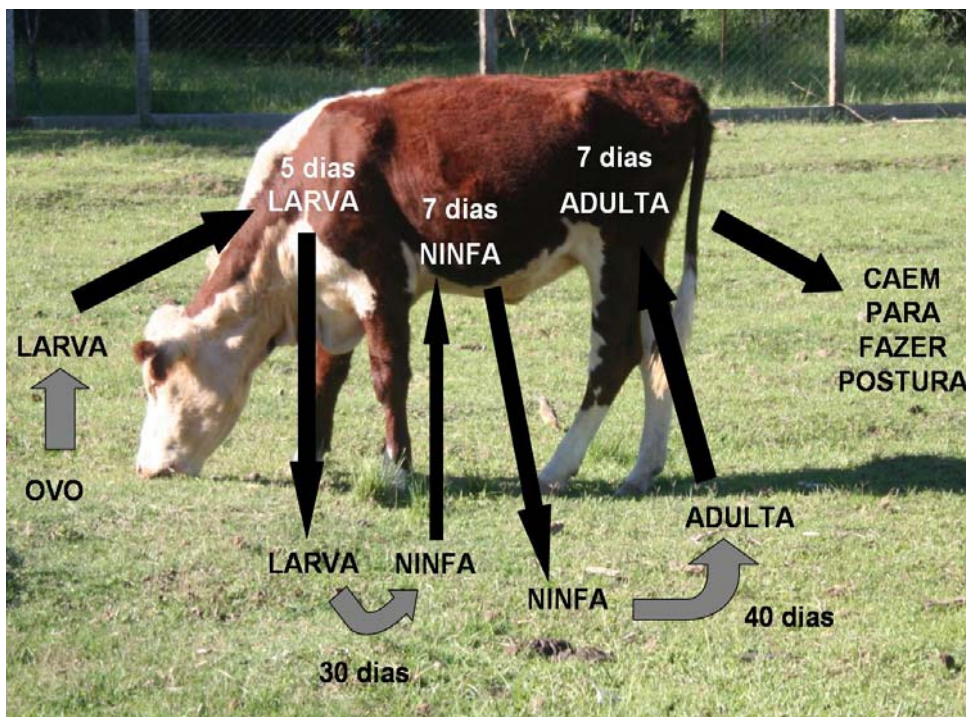


Figura 3- Representação esquemática do ciclo de vida do carrapato *H. longicornis*.

1.3 Métodos de controle

1.3.1 Controle químico

O método de controle para o carrapato *R. microplus* mais utilizado desde o século XX é o uso de acaricidas (PRUETT, 1999). Apesar de ser o único método eficaz disponível atualmente, o uso de acaricidas tem se tornado problemático por inúmeras razões, como ser dispendioso, causar danos ao meio ambiente, deixar resíduos tóxicos nos produtos de origem bovina (carne, leite e derivados) e também permitir a seleção de populações de carrapatos resistentes a diferentes drogas existentes no mercado. Ao longo do tempo, foram utilizados, seqüencialmente, acaricidas baseados em compostos arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidas, piretróides e avermectinas (GEORGE *et al.*, 2004). O principal motivo para a troca dos princípios ativos tem sido o surgimento de populações de carrapatos resistentes. Na década de 30, foram descritos os primeiros casos de resistência aos compostos arsenicais e, a partir disso, novos casos de resistência para as diferentes drogas introduzidas foram descritos ao longo do século XX (GEORGE *et al.*, 2004). O curto período de tempo entre as gerações e o emprego de subdosagem, parecem contribuir para o rápido aparecimento de resistência no *R. microplus* (KOCAN, 1995).

Devido a esses fatores citados, tem-se procurado métodos alternativos para o controle do carrapato *R. microplus*. Atualmente, os controles biológico e imunológico já constituem parte de programas de controle integrado de ectoparasitos, que ainda exigem a utilização de produtos químicos (PRUETT, 1999).

1.3.2 Controle biológico

O controle biológico clássico inclui a preservação dos inimigos naturais locais e o aumento dos agentes biocontroladores, geralmente como parte de um programa de manejo integrado de pragas (SAMISH *et al.*, 2004). O *R. microplus*, como qualquer outro organismo vivo, possui inimigos naturais que interferem em

etapas distintas do seu ciclo biológico. ALVES-BRANCO *et al.*, (1983, apud LEAL, 2006c, p. 17) observaram uma redução de até 66% no número de teleóginas que realizam postura em bovinos que são seguidos por *Egretta ibis* (garça vaqueira), pois estas se alimentam de neóginas e teleóginas retiradas do corpo dos bovinos. Também as formigas carnívoras, que se alimentam de teleóginas que caem ao solo; o pássaro *Molotrus banariensis* (“vira-bosta”); *Vanellus chilensis* (quero-quero), são exemplos que podem reduzir o nível de infestação em uma determinada área (GONZALES, 1995). Existem ainda alternativas como a seleção de raças menos sensíveis ao parasito (JONSSON, 2006), a rotação de pastagens (ELDER *et al.*, 1980), o manejo do rebanho (WHARTON *et al.*, 1980), o cultivo de forrageiras que dificultam o desenvolvimento e a sobrevivência das fases de vida livre (BASSO *et al.*, 2005), as condições climáticas (SUTHERST *et al.*, 2006), o uso de patógenos para o carrapato, como bactérias, fungos, nematódeos e parasitóides (SAMISH *et al.*, 2004), têm sido estudados como meios que influenciam no ciclo de desenvolvimento dos parasitos.

O tipo de vegetação e a seleção de raças bovinas menos sensíveis ao carrapato também podem atuar como fatores limitantes capazes de influenciar o ciclo biológico do carrapato. Pastagens nativas com vegetação arbustiva proporcionam abrigo às fêmeas em postura, enquanto que outras pastagens podem ser tóxicas, repelentes ou imobilizam as larvas através de secreções ou estruturas da planta limitando assim o número de carrapatos. Em especial, o plantio de gramíneas do gênero *Stylosanthes* (SUTHERST *et al.*, 1982) e do capim gordura (*Melinis minutiflora*) (FARIAS *et al.*, 1986) podem contribuir consideravelmente para o controle do carrapato. Estudos demonstraram que *M. minutiflora*, *S. scabra* e *S. viscosa* possuem ação repelente e podem causar a morte de larvas do carrapato (FARIAS *et al.*, 1986). Outra técnica que pode ser viável utilizando os conhecimentos sobre o ciclo biológico do carrapato é a rotação de pastagens, que comprovadamente, reduz os níveis de infestação pelo *R. microplus*, especialmente nas épocas de pico parasitário (ELDER *et al.*, 1980; NORTON *et al.*, 1983).

Vários patógenos têm sido estudados no controle biológico de pestes, SAMISH *et al.* (2004) relataram a existência de 96 formulações baseadas em microorganismos. Porém, apenas algumas espécies foram avaliadas contra carrapatos, sendo que os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* têm sido os mais estudados e parecem os mais promissores (ALONSO-DÍAZ *et al.*,

2007). O fungo *M. anisopliae*, é altamente patogênico para carrapatos *Ixodes scapularis* e *R. microplus* (ZHILOUA *et al.*, 1997, FRAZZON *et al.*, 2000). No Brasil, já foram encontrados isolados de *M. anisopliae* infectando naturalmente o *R. microplus* (DA COSTA *et al.*, 2002). Avaliação *in vitro* de 12 isolados de *M. anisopliae* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* mostrou que existem isolados mais patogênicos e que podem causar a morte de até 100% dos carrapatos infectados dependendo da concentração de esporos na suspensão utilizada (BITTENCOURT *et al.*, 1999 FRAZZON *et al.*, 2000). Outros estudos demonstraram que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* induziram uma taxa de mortalidade de aproximadamente 30% em *R. appendiculatus* adultos alimentados em coelhos, enquanto que *M. anisopliae* induziu mortalidade de 37 % em *Amblyomma variegatum* adultos. Estes fungos não perdem sua capacidade de infecção sobre o carrapato quando são incubados com acaricida por mais de 5 dias, mantendo o crescimento e suas características morfológicas normais (KAAYA *et al.*, 1996, BAHIENSE, 2006). Basso *et al.* (2005) avaliaram o efeito de *M. anisopliae* na população de *R. microplus* e a influência das pastagens *Brachiaria brizantha* e *Cynodon* spp (Tifton 85) nessa interação, evidenciando menor número de larvas no Tifton, indicando que o tipo de pastagem favoreceu a ação do fungo. Esse resultado demonstra que a associação de medidas de controle pode potencializar o resultado do controle biológico. Bactérias, como *E. coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* são naturalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato e também têm sido estudadas no controle biológico. Existem relatos de uma diminuição de até 47 % na postura quando teleóginas de *R. microplus* foram submersas em suspensão de *C. lapagei* (BRUM, 1988). Outros organismos parasitos, tais como nematódeos, têm sido também avaliados como ferramentas no controle biológico de carrapatos. (SAMISH & GLAZER, 2001).

Outra estratégia envolvendo controle biológico é a utilização de compostos naturais como pesticidas. Davey *et al.* (2001) testaram, em bovinos, diferentes concentrações de “spinosad”, um acaricida natural de *Sacharopolyspora spinosa* (actinomiceto), obtendo uma drástica redução no número de fêmeas ingurgitadas, na massa de ovos e no índice de fecundidade do *R. microplus*. O extrato de *Sapindus saponaria*, uma árvore rica em saponinas e encontrada nos EUA, México, Argentina e Brasil, foi testado, *in vitro*, contra larvas de *R. microplus* demonstrando ação larvicida (FERNANDES *et al.*, 2005). Resultado semelhante foi obtido com óleo

essencial extraído de 3 espécies de *Eucalyptus* (CHAGAS *et al.*, 2002). O controle biológico através de um programa de manejo integrado de pragas, apesar de eficiente, nem sempre pode ser utilizado por interferir no manejo rotineiro da criação, além de poder gerar desequilíbrios ecológicos no ecossistema.

1.3.3 Controle imunológico

O controle de ectoparasitos através de vacinação tem sido estudado nas últimas cinco décadas e é considerado um dos métodos mais promissores como alternativa ao uso de acaricidas (WILLADSEN & KEMP, 1988). Concomitante a isso, o avanço no desenvolvimento da biotecnologia tem permitido a identificação de novos antígenos e o melhor entendimento das relações parasito-hospedeiro. No entanto, o desenvolvimento de uma vacina depende da identificação de moléculas com potencial protetor, caracterização de seus papéis na fisiologia do carrapato e produção de antígenos recombinantes, etapas fundamentais para produção de uma vacina economicamente viável (WILLADSEN, 2001).

Para o desenvolvimento de uma vacina, é importante o conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica do hospedeiro. Quando os bovinos são infestados pelo carrapato *R. microplus*, durante o processo de sugar o sangue, os carrapatos estão estimulando os dois tipos de resposta imunológica no hospedeiro, resposta inata e resposta adquirida (WIKEL & BERGMAN, 1997). Tais respostas imunes são reguladas por proteínas secretadas que são as citocinas, e o tipo de citocina produzido no local da fixação do carrapato determina se a resposta imune desenvolvida será mediada por células ou humoral (VANCOVA *et al.*, 2007). A resistência adquirida mediada imunologicamente é expressa pela diminuição da produção e viabilidade dos ovos e larvas, pela redução no número de carrapatos, que se fixam no hospedeiro, redução no peso das teleóginas, o aumento do tempo de alimentação e pela morte dos carrapatos (WIKEL, 1996). Entretanto, os carrapatos desenvolveram, ao longo de sua evolução, maneiras de escapar ou suprimir as respostas imunes do hospedeiro. Um bom exemplo desta adaptação são as moléculas anti-hemostáticas presentes na saliva dos artrópodes hematófagos, além de moléculas vasodilatadoras, antiinflamatórias e imunomoduladoras, facilitando assim o processo de alimentação e transmissão de patógenos (RIBEIRO, 1989; NUTTAL

& LABUDA, 2004). A imunomodulação é importante para os carrapatos, inclusive o *R. microplus*, que permanece se alimentando por vários dias em um único hospedeiro (WIKEL & BERGMAN, 1997). O *R. microplus* consegue inibir resposta humoral, ativação do sistema complemento, proliferação de linfócitos T, produção de citocinas e de mediadores químicos como serotonina e histamina (VALENZUELA, 2004; BROSSARD & WIKEL, 2004).

As bases científicas que justificaram a investigação da vacinação como método de controle do carrapato, foram a existência de bovinos com maior grau de resistência ao *R. microplus*, e a redução da susceptibilidade após infestações sucessivas, que indicaram a capacidade dos bovinos de desenvolver uma resposta imunológica naturalmente adquirida contra o parasito (WILLADSEN, 2004). Dois experimentos, um de Roberts e Kerr e outro de Wikel *et al*, foram muito importantes para a fundamentação do controle imunológico. Foram realizadas transferências passivas de imunidade de animais resistentes para animais suscetíveis. Apesar do limitado grau de proteção, Roberts e Kerr (1976) demonstraram transferência passiva de imunidade através da transferência de soro de bovinos resistentes ao *R. microplus* para bovinos sensíveis, confirmando o envolvimento de anticorpos na resistência adquirida (LEAL, 2006c). Wikel *et al.* (1976) demonstraram a importância dos linfócitos na resposta adquirida contra *Dermacentor andersoni*, através da transferência de células de linfonodos de cobaias resistentes para suscetíveis (LEAL, 2006c).

Bovinos infestados naturalmente com carrapatos desenvolvem linfócitos T e B de memória, que permitem uma resposta mais eficiente em futuras infestações (WIKEL, 1996). Apesar da importância dos linfócitos T na indução e manutenção de uma resposta eficaz ser bem definida, ainda não foi elucidada qual a importância de cada tipo de resposta (celular ou humoral), para a proteção contra o carrapato (WIKEL & BERGMAN, 1997; WILLADSEN, 2004; RUIZ *et al.*, 2006). Acredita-se que a resistência imunológica ao carrapato seja conferida pela ação de anticorpos, complemento ou reações de hipersensibilidade (VALENZUELA, 2004). Kashino *et al.* (2005) avaliaram o padrão de resposta humoral em bovinos parcialmente resistentes (raças zebuínas) e suscetíveis (raças européias) à infestação por *R. microplus*, encontrando maiores níveis de imunoglobulina G (IgG) anti-saliva em animais da raça Nelore (zebuínos) comparado com bovinos da raça Holandesa e Aberdeen (européias).

Sendo confirmada a possibilidade de indução de uma resposta imunológica protetora contra os carrapatos, os trabalhos então foram direcionados para a pesquisa de antígenos com potencial protetor, que se constitui no maior desafio para o desenvolvimento de vacinas (WILLADSEN & KEMP, 1988), sendo ainda hoje o objeto de estudo de vários grupos de pesquisa. Dois tipos de antígenos candidatos para vacina são identificáveis: os antígenos naturalmente expostos ao sistema imune do hospedeiro durante a fase parasitária, como proteínas e peptídeos excretados da glândula salivar; e os antígenos ocultos (*concealed antigen*), que não entram em contato com o hospedeiro (NUTTALL *et al.*, 2006). Este conceito de antígeno oculto surgiu com experimentos de vacinação contra o *R. microplus* (WILLADSEN & KEMP, 1988). Por não entrarem em contato com o sistema imunológico do hospedeiro, os antígenos ocultos não têm possibilidade de induzirem resposta imune durante o parasitismo. Entretanto, uma vez que o hospedeiro seja imunizado artificialmente com um destes antígenos, anticorpos e outros elementos do sistema imune, se ingeridos pelo parasito, interagem com a proteína utilizada na imunização, podendo interferir nas funções desta de modo a causarem danos ao parasito (DA SILVA VAZ JR *et al.*, 2002).

A vantagem estratégica do uso de vacinas com antígenos ocultos é a de evitar os principais mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, como inibidores do sistema complemento, da resposta inflamatória, da proliferação de linfócitos T, produção de citocinas e histamina (BARRIGA, 1999). No entanto, uma implicação negativa do uso de antígenos ocultos é que a resposta imunológica dos animais tratados não é continuamente estimulada pela infestação natural, necessitando a revacinação para manutenção da proteção (WILLADSEN, 2004).

Em 1986, houve a identificação do primeiro antígeno oculto presente no intestino do carrapato *R. microplus*. Este antígeno oculto é chamado de Bm86, uma glicoproteína de membrana presente no intestino. (WILLADSEN *et al.*, 1988). A Bm86 induz resposta imunológica em bovinos imunizados, sendo a base de duas vacinas comerciais presentes no mercado: a TickGard™, desenvolvida na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO, e a Gavac™, desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba. As duas vacinas são produzidas em sistema heterólogo, a proteína da TickGard é obtida em *E. coli*, e a Gavac em *Pichia pastoris*. Essas vacinas não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas. (WILLADSEN *et al.*, 1996; DE LA

FUENTE *et al.*, 1999; VALLE *et al.*, 2004).

Com o intuito de aumentar a efetividade da vacina, o grupo australiano avaliou o potencial da vacinação com DNA na produção de uma resposta imune protetora utilizando a seqüência codificante da Bm86, mas o nível de proteção foi muito menor quando comparado às imunizações com a proteína (DE ROSE *et al.*, 1999). Outro estudo realizado com o antígeno Bm 86 avaliou três peptídeos sintéticos derivados dessa glicoproteína, denominados SBm4912, SBm7462 e SBm19733. Vinte bovinos da raça Jersey com idade entre 8 e 10 meses foram divididos em quatro grupos e imunizados com os peptídeos sintéticos citados. Cada grupo foi tratado com 3 doses de um dos peptídeos (2mg) associado com saponina (1,5 mg), e o grupo controle recebeu somente o adjuvante. Vinte e um dias após a última dose, cada animal foi desafiado com 1500 larvas de *R. microplus*. O título de anticorpos contra os peptídeos atingiram 400 e 2400, após duas ou três imunizações. O resultado desta infestação experimental foi diminuição do número, peso e capacidade de oviposição das teleóginas (PATARROYO *et al.*, 2002). O grupo australiano descreveu e avaliou um segundo antígeno oculto, denominado Bm91, que em associação com Bm86 aumenta a eficácia da vacinação (RIDING *et al.*, 1994; WILLADSEN *et al.*, 1996).

Embora antígenos ocultos sejam a base das vacinas comerciais e tenham sido estudados em outros ectoparasitos, como a *Lucilia cuprina* e *Pediculus humanus* (TRIMNELL *et al.*, 2002), experimentos com antígenos naturalmente expostos ao sistema imunológico do hospedeiro associado a antígenos ocultos, demonstraram o potencial da associação de diferentes alvos em uma mesma vacina (TRIMNELL *et al.*, 2002).

Além dos antígenos que compõem as vacinas comercialmente disponíveis descritas acima, outras proteínas que também conferem algum grau de proteção, ou induzem a produção de anticorpos que interferem no sucesso reprodutivo do carrapato, têm sido descritas (LEAL *et al.*, 2003).

A BYC (*Boophilus Yolk pro-Cathepsin*), uma aspártico protease isolada de ovos embrionários do *R. microplus* (LOGULLO *et al.*, 1998), é sintetizada no corpo gorduroso e intestino, secretada para a hemolinfa e captada pelo ovócito em crescimento e representa entre 5-8% das proteínas do ovo. É ativada por proteólise limitada durante a embriogênese, onde parece atuar sobre a degradação da vitelina, a principal reserva dos ovos do carrapato (LOGULLO *et al.*, 1998). Essa participação

na degradação da vitelina foi posteriormente confirmada *in vitro*, demonstrando a importância dessa enzima no processo de embriogênese (ABREU *et al.*, 2004). A BYC foi capaz de induzir resposta imune protetora em bovinos contra infestações de *R. microplus*. Os efeitos protetores foram observados pela redução no número de teleóginas, capacidade de postura e fertilidade dos ovos, com eficácia variando entre 14% e 36%. O cDNA da BYC foi clonado em dois vetores plasmidiais distintos para a expressão em *E. coli* de duas formas de proteína recombinante, uma com e outra sem a proteína de fusão tioredoxina. As duas formas foram imuno-reativas contra soros de coelhos, camundongos e bovinos previamente imunizados com a BYC nativa (LEAL *et al.*, 2006a). Experimentos de vacinação de bovinos com BYC recombinante produzida em *E. coli* resultaram em um índice de proteção global de 25,24% quando os bovinos foram desafiados com 20.000 larvas infestantes de *R. microplus* (LEAL *et al.*, 2006b). A taxa de proteção induzida pela BYC nativa e pela BYC recombinante, no entanto, são insuficientes para permitir um controle eficiente do *R. microplus*. Uma possível razão para estes resultados se deve ao fato da BYC ser abundante nos ovos, necessitando alta concentração de anticorpos para induzir um dano significativo nos carrapatos. Dados que corroboram para essa suposição é a observação que a inoculação de anticorpos monoclonais anti-BYC em fêmeas ingurgitadas de carrapato, induz redução de fertilidade de forma dose-dependente (DA SILVA VAZ Jr *et al.*, 1998).

A proteína *Tick Heme-binding Aspartic proteinase* (THAP) foi isolada dos ovos do *R. microplus* e constitui o primeiro relato de uma aspártico protease capaz de ligar heme e ter sua atividade regulada por esta molécula. O substrato natural dessa proteína, aparentemente, é a vitelina, que no caso do carrapato, também é uma hemoproteína (SORGINE *et al.*, 2000). Logullo *et al.*, (2002), realizaram experimentos *in vitro* para mensurar a capacidade de ligação de heme à vitelina, e demonstraram então, que cada molécula de vitelina é capaz de ligar até 31 moléculas de heme, impedindo assim, a formação de radicais livres. Neste mesmo estudo, os autores ainda apresentaram evidências de que a vitelina é o principal reservatório de heme, que além de fornecer heme para o desenvolvimento embrionário durante sua degradação, se liga a qualquer molécula de heme livre que exceda a quantidade necessária para o desenvolvimento embrionário (LOGULLO *et al.*, 2002).

A VTDCE é uma cisteíno endopeptidase degradadora de vitelina, purificada e caracterizada a partir de ovos de *R. microplus* (SEIXAS *et al.*, 2003). Ela é

naturalmente associada à vitelina, sendo ativada por acidificação. Ensaios de atividade demonstraram atividade da VTDCE frente a vários substratos sintéticos, além da hemoglobina, albumina, gelatina, e vitelina, este sendo seu provável substrato natural. Esta atividade foi demonstrada em larvas não alimentadas e em ovários e ovos de fêmeas ingurgitadas, sugerindo um papel na embriogênese do carrapato bovino (SEIXAS *et al.*, 2003). Assim como a BYC, o envolvimento na embriogênese associado à capacidade imunogênica fazem da VTDCE um antígeno potencial, que poderia ser associada com a BYC, como antígenos para comporem a vacina contra o carrapato do boi (SEIXAS *et al.*, 2003).

O potencial imunogênico da vitelina, principal proteína de reserva do ovo, foi avaliado em experimentos de imunização, usando ovinos como modelos experimentais. Neste estudo foram avaliadas duas glicoproteínas derivadas do complexo vitelina, uma de 87 kDa (VIT87) e outra de 80 kDa (GP80), purificadas a partir de ovos e larvas, respectivamente. A eficácia global da imunização, mensurada pela redução no número de larvas após um ciclo completo, foi de 68% com VIT87 e 66% com GP80 (TELLAM *et al.*, 2002).

Boophilus microplus trypsin inhibitors (BmTIs) foram detectados em diferentes fases de desenvolvimento do *R. microplus*, indicando um possível papel na interação parasito-hospedeiro. Esses BmTIs foram usados como antígenos emulsionados com adjuvante de Freund completo, para a imunização de bovinos que foram desafiados com larvas do carrapato *R. microplus*. Os níveis de IgG tiveram seu pico 40 dias após a primeira imunização e apresentaram diminuição após a infestação. Os bovinos apresentaram redução de 67,9% no número total de carrapatos, 71,3% no peso total dos ovos e 69,5% no peso total das fêmeas ingurgitadas, quando comparados aos bovinos controles. A eficácia total da vacinação foi de 72,8% (ANDREOTTI *et al.*, 2002).

A paramiosina é uma proteína muscular encontrada em várias espécies de invertebrados, incluindo artrópodes, moluscos e nematódeos (MAROTO *et al.*, 1995). A função da paramiosina em músculos de invertebrados não é totalmente conhecida. Esta proteína é encontrada no tegumento de *Schistosoma mansoni* e *S. japonicum*, e experimentos realizados em ratos com transferência passiva de anticorpos anti-paramiosina de *Schistosoma*, demonstraram atividade protetora, estimulando a investigação da paramiosina como componente de uma vacina para esquistossomose (GOBERT, 1998). Lacleite *et al.*, (1992), observaram que a

paramiosina inibe a ativação de complemento *in vitro*, sugerindo assim que esta molécula possa estar atuando como imunomoduladora da resposta do hospedeiro.

A calreticulina (CRT) é uma proteína capaz de ligar-se a cálcio, sendo encontrada em um grande número de espécies e em todas as células nucleadas de mamíferos (MICHALAK *et al.*, 1992). Foi identificada e caracterizada em *R. microplus* (FERREIRA *et al.*, 2002). Possui várias funções, entre elas, estocagem de cálcio, mediação da função de integrinas, ligação de C1q, lectina extracelular, chaperonina, além de inibir a expressão gênica regulada por esteróides (COPPOLINO & DEDHAR, 1997). No carrapato *Amblyomma americanum* foi demonstrado a secreção de calreticulina pela saliva diretamente no hospedeiro, sendo sugerido que atue modulando o sistema imune e/ou hemostase do hospedeiro (JAWORSKI *et al.*, 1995). Também neste carrapato foi visto que a calreticulina pode ser utilizada como biomarcador e que os níveis de anticorpos contra esta proteína podem estar diretamente relacionados com índices de ingurgitação do parasito (SANDERS *et al.*, 1998; SANDERS *et al.*, 1999). Uma calreticulina de *R. microplus* recombinante (rBmCRT), expressa em *E. coli*, não foi imunogênica para bovinos, e soro de bovinos naturalmente infestados também não reconhecem a rBmCRT (FERREIRA *et al.*, 2002).

As serpinas (*serine protease inhibitors*) são uma família de proteínas encontradas numa grande variedade de organismos, incluindo os artrópodos hematófagos (PREVOT *et al.*, 2006). Têm sido isoladas dos carrapatos, *Amblyomma hebraeum*, *A. variegatum*, *R. microplus*, *H. longicornis*, *Ixodes scapularis* e *R. appendiculatus* (SUGINO, *et al.*, 2003; IMAMURA, *et al.*, 2005, PREVOT, *et al.*, 2007). Estas proteínas são expressas na glândula salivar dos carrapatos e secretadas na saliva (SUGINO *et al.*, 2003). Um exemplo da ação das serpinas de carrapatos no mecanismo de defesa dos hospedeiros é a proteína HLS2 de *H. longicornis*, que impede a coagulação e inibe a atividade da trombina (IMAMURA *et al.*, 2005). Andreotti *et al.*, (2002), observou uma redução significativa no número de carrapatos e no peso dos ovos, após a vacinação de rebanho bovino contra serpina de *R. microplus*. Em outro estudo observou-se o aumento na mortalidade de *H. longicornis* e *R. appendiculatus* durante sua alimentação com sangue nos bovinos imunizados com serpina (IMAMURA *et al.*, 2006). Mulenga *et al.*, (2000), também tem proposto o uso de serpinas como antígeno candidato a vacina.

Os estudos realizados até o momento sugerem a viabilidade de um método

de controle alternativo para o carrapato *R. microplus*, através do desenvolvimento de uma vacina. Porém, uma vacina com reais possibilidades de substituir totalmente o uso de acaricidas ainda não está disponível, desta forma a busca por novos antígenos é imprescindível. Outras proteínas com potencial vacinal podem ser descobertas com maior facilidade com o sequenciamento do genoma do *R. microplus* (ULLMAN *et al.*, 2005; GUERREIRO *et al.*, 2006), a fim de concretizar a meta de uma vacina eficiente e economicamente viável contra o carrapato do boi.

1.4 A proteína Glutathione S-transferase (GST)

As glutathione S-transferases (GSTs), são uma família multi-funcional de enzimas presentes em organismos animais e vegetais, e entre suas funções pode-se destacar transporte intracelular, participação em processos digestivos, síntese de prostaglandinas, detoxificação de substâncias tóxicas e proteção contra Estresse oxidativo (LEE *et al.*, 2002; ROSA DE LIMA *et al.*, 2002). Também estão envolvidas no desenvolvimento de resistência de células e organismos frente a drogas, pesticidas, herbicidas, antibióticos (FOURNIER *et al.*, 1992; NEUEFEIND *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 1998) e anti-helmínticos (SHARP *et al.*, 1991).

As GSTs são encontradas no citosol, embora tenham sido isoladas também da mitocôndria. As GSTs citosólicas são agrupadas em nove classes: Alfa, Beta, Kappa, Mu, Omega, Pi, Sigma, Theta e Zeta, com base em sua homologia, estrutura, especificidade ao substrato, estudos imunológicos e análise filogenética (LEE *et al.*, 2002). Os membros das diferentes classes têm monômeros similares em tamanho (entre 24 e 28 kDa) e têm distinta, mas sobreposta, especificidade a substrato (ROSAS DE LIMA, 2001). A superexpressão de GSTs em tumores parece estar relacionada com resistência adquirida contra drogas anti-tumorais, tornando estas proteínas um alvo terapêutico para o desenvolvimento para novas drogas (COLES *et al.*, 1990). As GSTs que parecem ter papel na resistência a drogas anti-tumorais pertencem às classes Alfa e Pi (TERRIER *et al.*, 1990).

GSTs são encontradas na forma de homo e heterodímeros devido aos múltiplos genes e hibridização dos monômeros. A dimerização e hibridização ocorrem apenas entre subunidades da mesma classe e não entre subunidades de classes diferentes, indicando haver um reconhecimento molecular classe-específico na interface das subunidades (DIRR *et al.*, 1994 *apud* ROSA DE LIMA, 2001).

Cada dímero tem dois sítios ativos, que são independentes um do outro. Cada sítio ativo consiste em pelo menos duas regiões ligadoras: o sítio de ligação a GSH (sítio G), que é muito específico; enquanto que o sítio de ligação hidrofóbico para substratos eletrofílicos (sítio H) é menos específico permitindo que a GSH reaja com uma ampla variedade de agentes tóxicos (ROSA DE LIMA, 2001).

Em parasitos, Kawalek *et al.* (1984) demonstraram que a atividade de GST em *Haemonchus contortus* resistentes a cambendazole é 1,5 a 1,8 vezes maior, quando comparada com linhagens susceptíveis. Em *Fasciola hepática*, também foi encontrada uma correlação entre o nível de atividade de GST e a eficiência da droga utilizada no controle da fasciolose. Entretanto, neste estudo, observaram que a diminuição na atividade da GST estava associada a um aumento na resistência às drogas (MILLER *et al.*, 1994).

Em 1986, Smith *et al.* constataram que GST de *S. japonicum* é reconhecida por anticorpos de camundongos infectados por esse parasito. E que camundongos resistentes têm níveis mais altos de anticorpos anti-GST no soro, do que os camundongos que permanecem suscetíveis. Com esta observação surgiu a hipótese de que, neste modelo animal, a resposta imune contra GST seria responsável pela resistência adquirida contra infecção por *S. japonicum* (SHARP *et al.*, 1991).

Vibanco-Perez *et al.* (1999), caracterizaram GST de *Taenia solium* (SGSTF), com massa molecular de 26 kDa, que parece ser da classe Mu. Estudos de imunolocalização indicaram que GSTs estão presentes no tegumento, parênquima e protonefrídeos, sugerindo que esta proteína tem papel importante na sobrevivência do parasito no hospedeiro. Também mostraram que camundongos imunizados com SGSTF reduziram 74,2% dos metacestódeos. Os anticorpos gerados contra SGSTF apresentaram reatividade cruzada com *T. saginata*, *T. taeniaeformis*, *T. crassiceps*; porém, não reagem com GSTs de *S. mansoni* adultos, de camundongos, fígado de coelhos e de porcos.

Scott & McManus (2000) observaram que a GST de *S. mansoni* de 28 kDa (SmGST28) tem comprovada eficácia como um antígeno para imunidade protetora, reduzindo o número de espécimes nos indivíduos parasitados, fecundidade das fêmeas e viabilidade dos ovos. Cães vacinados com GST de *Ancylostoma caninum* (AcGST-1) recombinante exibiram uma considerável redução dos ancilostomas adultos e na quantidade de ovos quando comparados com os cães controle. Hamsters também foram vacinados com rAcGST e mostraram 53,7% de redução do número

de espécimes nos indivíduos parasitados após serem desafiados com *Necator americanus* (ZHAN, *et al.*, 2005).

He *et al.* (1999) purificaram, caracterizaram e clonaram uma GST de larvas de *R. microplus* com o objetivo de investigar o papel da GST de carrapato na resistência a acaricidas. Quando foram comparados isolados suscetíveis e resistentes a acaricidas, constataram não haver diferença na seqüência de cDNA obtida, nem nos níveis de expressão da GST estudada, entre os isolados de carrapatos estudados.

A resistência para inseticidas organoclorados e organofosforados é associada com aumento nos níveis de GST. Isto sugere que a conjugação acaricida/inseticida conjugada com glutatona, pode ser um mecanismo de detoxificação nos artrópodes (WEI *et al.*, 2001). Da Silva Vaz Jr *et al.*, (2004) analisaram o potencial de vários acaricidas na atividade enzimática da GST-Bm recombinante (rGST-Bm). Observaram que os vários acaricidas como etion, amitraz, clorpirifos, DDT, cipermetrina, diazinon, ivermectina, deltametrina e flumetrim inibiram a rGST, e o coumafos apresentava um efeito ativador na atividade da rGST-Bm.

Como vários trabalhos sugerem que a GST de alguns parasitos possam ser antígenos protetores candidatos a uma vacina contra os próprios parasitos, mais estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar se a GST pode atuar como antígeno protetor em outros hospedeiros. O nosso grupo de pesquisa tem o objetivo de investigar a imunogenicidade das GSTs de *R. microplus* e *H. longicornis*, devido a estudos prévios realizados por Da Silva Vaz Jr *et al.*, (2004a), que observaram, por western blot, que soro policlonal anti-GST de *R. microplus* reagiu com GST de *H. longicornis*, indicando assim uma reatividade cruzada entre estas duas proteínas.

2 OBJETIVOS DO TRABALHO

Avaliar a imunogenicidade das proteínas GST-Bm e GST-HI em camundongos Balb/c.

3 MATERIAIS

3.1 Tampões para gel de poliacrilamida

- Tampão de corrida pH 8,3: Tris-base 0,3%, glicina anidra 1,44% e SDS 0,01% ajustar pH 8,3 e água destilada q.s.p 1 litro;
- Tampão de amostra 1x para SDS-PAGE: Tris-HCl (pH 8,0) 62,5mM , SDS 2%, glicerol 10%, beta-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,001%, uréia 10 M;
- Coomassie-blue G-250: comassie G-250 0,1%, metanol 25%, ácido acético 5%;
- Solução de acrilamida: acrilamida 30% e bisacrilamida 0,8% em água destilada.

3.2 Tampões e soluções para Western-blotting

- Tampão de transferência 1x: NaHCO₃ 13 mM, Metanol 20%, pH 9,9;
- Tampão PBS 1X: NaCl 150mM, NaH₂PO₄ 25 mM, pH 7,5;
- Tampão de revelação fosfatase (TRF): Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM;
- Tampão de bloqueio 5% (Blotto 5%): 5 g de leite Molico desnatado em 100 ml PBS
- NBT: 0,05 g em 1 ml de DMF 70%
- BCIP: 0,05 g em DMF 100%
- Solução de Ponceau: ponceau S 2%, TCA 30%, ácido sulfossalicílico 30% em água destilada.

3.3 Tampões e soluções para ELISA

- Tampão Carbonato/Bicarbonato de Sódio 0,05 M, pH 9,6
- Tampão Citrato/Fosfato 0,1 M, pH 5,0
- Solução cromogênica – 3,4 mg de OPD, 5 µl e H₂O₂ em 10 ml de tampão citrato/fosfato
- PBS 1x - NaCl 150mM, NaH₂PO₄ 25 mM, pH 7,5;
- Tampão de bloqueio 5% (Blotto) 5 g de leite Molico desnatado em 100 ml de PBS
- Solução de H₂SO₄ 12,5%

3.4 Tampões para cromatografia de afinidade a Glutathione

- Tampão de ligação: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3.
- Tampão de eluição: 50 mM Tris-HCl, 10 mM de glutathione reduzida, pH 8.0.

3.5 Coluna de Cromatografia

- Cromatografia de afinidade: GStrap FF, 1 ml (GE Healthcare).

3.6 Gel de poliacrilamida desnaturante

- Gel de empilhamento (5%)- 667 µl de solução de acrilamida/bisacrilamida, 520 µl de Tris-HCl 1M (pH 6,8), 40 µl de SDS 10%, 2,749 ml de H₂O destilada, 20 µl de persulfato de amônio 10%, 4 µl de TEMED;
- Gel de separação (14%)- 3,267 ml de solução de acrilamida, 2,613 ml de Tris-HCl 1M (pH 8,8), 70 µl de SDS 10%, 1,008 ml de H₂O destilada, 35 µl de persulfato de amônio 10%, 7 µl de TEMED.

3.7 Meios

- SOB: triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 250 mM, MgCl₂ 2M, em 100 ml de água.

4 MÉTODOS

4.1 Expressão da GST-Bm e GST-HI

As bactérias *E. coli* linhagem AD494 foram transformadas com o DNA do plasmídeo recombinante pET5b/GST-Bm e pET43/GST-HI, previamente obtidos pela Dra Mônica Rosa de Lima e Dr Itabajara da Silva Vaz Junior, respectivamente, pelo método de choque térmico e plaqueadas em ágar SOB completo, contendo o antibiótico ampicilina (100 µg/ml). Uma única colônia foi isolada e inoculada em 25 ml de meio SOB completo (item 3.7) contendo ampicilina, e crescida sob agitação constante a 180 rpm, 37°C por 16 horas. Após o cultivo foram inoculadas em 500 ml de meio SOB completo em erlenmeyer de dois litros. Foram incubadas sob agitação constante a 180 rpm, 37°C até alcançar a densidade ótica 0,6 no comprimento de onda de 600 nm. Para a indução da expressão da proteína, o isopropil- β-D tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado para concentração final de 0,4 mM para GST-Bm, e 1 mM para GST-HI, e então incubados sob agitação constante a 180 rpm, 30°C, por 16 horas. As células cultivadas foram centrifugadas a 3000x g por 5 minutos a 4°C. Desprezado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em 50 ml de água. Foram então congeladas a -70°C e descongeladas em temperatura ambiente, este processo foi repetido três vezes para ocorrer a lise das células, que então foram sonicadas na amplitude de 40 MHz cinco vezes por 30 segundos cada, com intervalo de um minuto, em banho de gelo. Logo após, foram centrifugadas a 3000 g durante 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em filtro 0,47 µm.

4.2 Purificação da GST-Bm e GST-HI

A purificação da GST-HI e GST-Bm foi realizada por cromatografia de afinidade a glutationa utilizando a coluna GSTrap FF , 1 ml (GE Healthcare). A amostra foi aplicada na coluna previamente equilibrada com tampão de ligação (item 3.4). Em seguida, a coluna foi lavada com o tampão de ligação até a remoção das proteínas não ligadas. Posteriormente as proteínas foram eluídas (item 3.4) com o tampão de eluição. As frações eluídas foram dialisadas em PBS 1x, e concentradas por liofilização.

4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Amostras de GST-Bm e GST-HI foram analisadas por SDS-PAGE 14% (item 3.6). As frações protéicas foram misturadas a 25% do volume de tampão de amostra para SDS-PAGE, fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel. O gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida (item 3.1) com corrente de 10 mA e posteriormente corado com Coomassie Blue G-250.

4.4 Western-blotting

As frações protéicas foram submetidas à SDS-PAGE 14% e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose a 190 mA por 60 minutos a 4°C em tampão carbonato 12 mM, pH 9,9, 20% metanol (item 3.2) (DUNN, 1986). A transferência foi monitorada corando-se a membrana com vermelho Ponceau 0,5% (p/v) em PBS 1X por 10 minutos. Posteriormente, a membrana foi descorada por lavagem com PBS 1X. A membrana foi então bloqueada com tampão de bloqueio 5% por 60 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi incubada com o soro de coelho anti-GST-Bm (produzido pelo laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal, no Centro de Biotecnologia da UFRGS) e de coelho anti-GST-HI (produzido pelo laboratório de Doenças Infecciosas, Departamento de Controle de Doenças, na Universidade de Hokkaido - Japão) diluídos 1:400 em tampão de bloqueio 5% durante uma hora. A seguir foram feitos 3 lavagens com tampão de bloqueio 5%, e em seguida incubados por 1 hora com conjugado fosfatase anti-IgG coelho (Sigma), diluídos 1:5000 em tampão de bloqueio 5%, logo após foram lavados 3 vezes com PBS 1x e revelados com NBT e BCIP.

4.5 Imunização dos camundongos

Foram utilizados camundongos fêmeas Balb/c com 45 dias de idade, mantidas no biotério do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os animais foram divididos em doze grupos com dois animais cada. Três grupos de camundongos foram inoculados com a proteína GST-Bm, três grupos foram inoculados com a GST-HI. Nos grupos controles foram inoculadas extrato de

E. coli ou somente os adjuvantes. Cada proteína foi testada na presença dos adjuvantes saponina, Montanide 888/Marcol 52 ou sem adjuvante (Tabela 1). Os inóculos foram de 25µg de GST-Bm, 25µg de GST-HI, ou 25 µg de extrato de *E. coli*. Todos os inóculos foram injetados por via subcutânea nos dias 0, 14 e 28 (Figura 4).

Ao final das inoculações, os grupos inoculados com GST-Bm receberam, no dia 63, uma dose adicional de 50 µg de proteína.

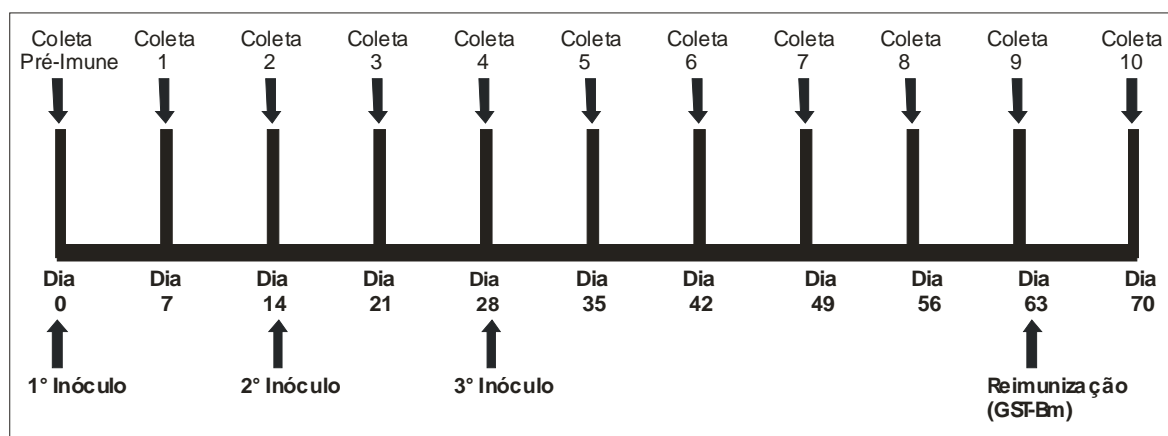


Figura 4 Cronograma das imunizações e coleta de sangue dos camundongos.

Tabela 1 Divisão dos grupos de camundongos Balb/c que foram imunizados com as proteínas GST-Bm e GST-HI e os animais controles.

Animais	Antígeno	Adjuvantes		
		Saponina	Montanide 888/Marcol 52	PBS
Vacina	GST-HI	2*	3*	2*
	GST-Bm	2*	2*	2*
Controles	<i>E. coli</i>	2*	2*	2*
	PBS	2*	2*	2*

* Número de camundongos em cada grupo

4.6 Titulação dos soros dos camundongos por ELISA

Foram coletados soros de todos os camundongos a cada sete dias (Figura 4). Foram realizados teste de ELISA para a titulação de IgG e IgM. Placas de

polietileno foram sensibilizadas com 100 ng/poço dos antígenos GST-HI e GST-Bm e *E. coli* por 16 horas a 4°C em tampão carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9,6 (item 3.3). As placas sensibilizadas foram bloqueadas com 150µl/poço de tampão de bloqueio 5% durante uma hora a 37°C, após foram incubadas com 100 µl/poço de anticorpo primário, diluído 1:200 em tampão de bloqueio 5%. A seguir as placas foram lavadas três vezes com 100 µl/poço de tampão de bloqueio 5% a temperatura ambiente por dois minutos cada lavagem, e incubadas novamente por uma hora a 37°C com conjugado peroxidase anti IgG de camundongo (Sigma) e anti-IgM de camundongo (Sigma), diluído 1:2000 em tampão de bloqueio 5%. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 100 µl/poço de PBS por dois minutos cada lavagem. A reação foi revelada com uma solução cromogênica (item 3.3), por 15 minutos e a reação de revelação foi interrompida com H₂SO₄ 12,5%. A leitura foi realizada a uma densidade ótica de 492 nm.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão e purificação das GST-Bm e GST-HI

Na figura 5 observa-se o extrato protéico de bactérias *E. coli* expressando GST-Bm ou GST-HI, e as frações contendo GST-Bm e GST-HI purificadas por cromatografia de afinidade a glutationa. As proteínas purificadas têm massa molecular aparente de 26 kDa.

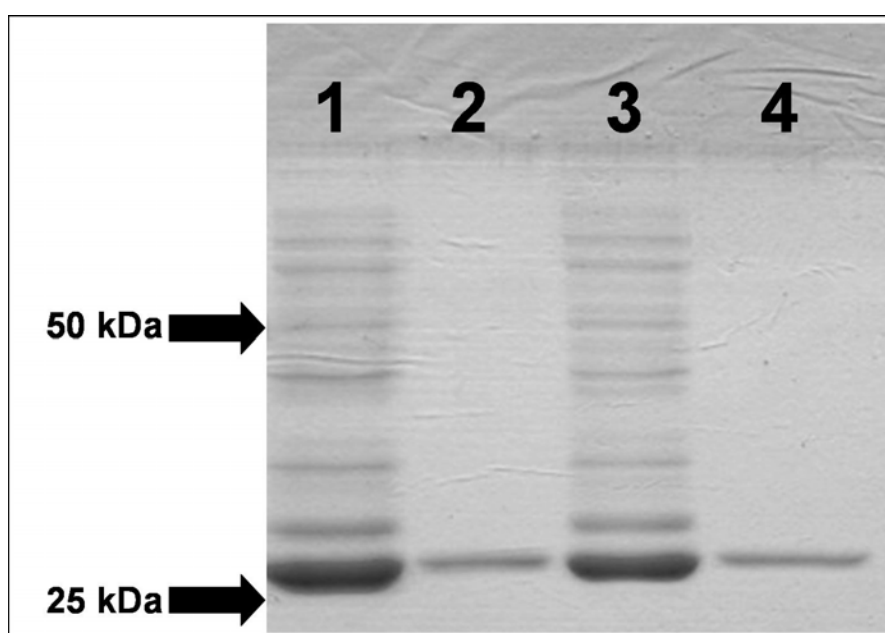


Figura 5 – SDS-PAGE 14% - expressões e purificações das GST-Bm e GST-HI, coradas com Comassie blue. Linha 1, amostra do extrato protéico de bactéria *E. coli* expressando a GST-Bm; linha 2, GST-Bm purificada; linha 3, extrato total da expressão da GST-HI; linha 4, GST-HI purificada.

Foi realizado um western blot para confirmar a identidade das proteínas purificadas (Figura 5), para posterior inóculo em camundongos. O western blot foi sondado com anticorpos de coelhos anti-GST-Bm ou anti-GST-HI, e observou-se as proteínas GST-Bm e GST-HI com massa molecular aparente de 26 kDa.

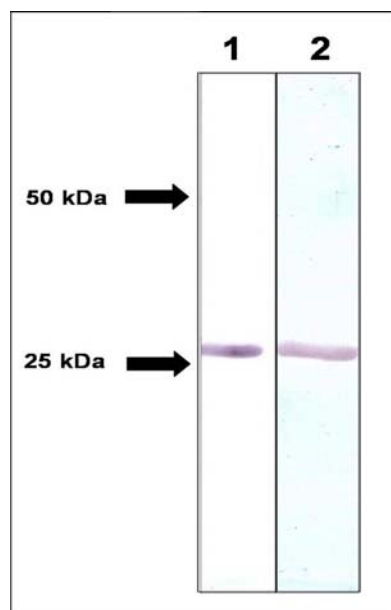


Figura 6. Western blot das GST-Bm e GST-HI purificadas. Linha 1 GST-Bm; linha 2, GST-HI.

5.2 Cinética de produção de anticorpos IgM e IgG dos camundongos imunizados com GST-HI, GST-Bm e *E. coli*

Foi realizado um teste de ELISA para detectar a existência de anticorpos IgG contra *E. coli* nos soros dos camundongos inoculados com GST-Bm e GST-HI. Verificou-se que não havia presença destes anticorpos contra proteínas de *E. coli* nos soros dos animais imunizados com GST-Bm e GST-HI (Figura 7).

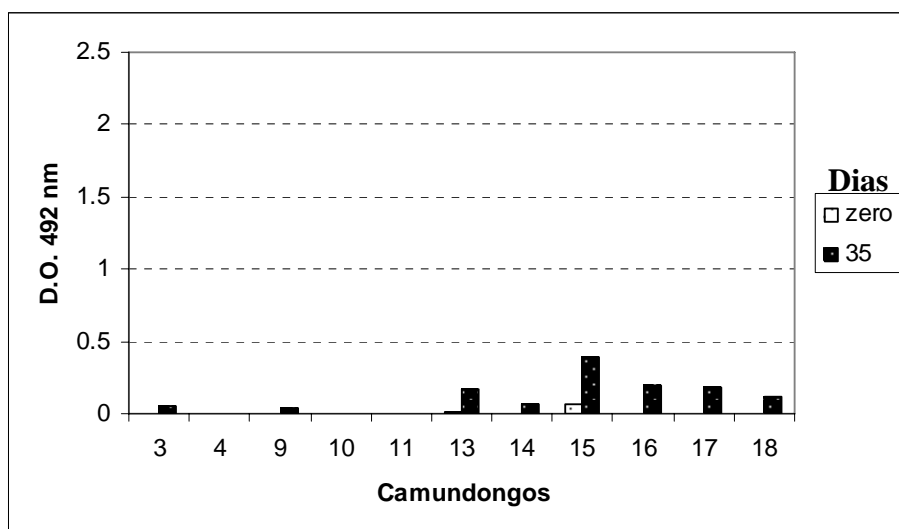


Figura 7 Cinética por teste de ELISA para detectar anticorpos IgG contra *E.coli*

nos soros dos camundongos. 3 e 4, camundongos inoculados com GST-HI emulsificado com adjuvante Montanide 888/Marcol 52; 9, 10, 11, camundongos inoculados com GST-Bm emulsificado com adjuvante Montanide 888/Marcol 52; 13 e 14, camundongos inoculados com *E. coli* com saponina; 15 e 16, camundongos inoculados com *E. coli* emulsificado com adjuvante Montanide 888/Marcol 52; 17 e 18, camundongos inoculados com *E. coli* somente.

A cinética de produção de anticorpos IgM dos camundongos inoculados com GST-HI, mostrou aumento dos níveis destes anticorpos nos animais que foram inoculados com GST-HI emulsificado com adjuvante Montanide 888/Marcol 52 no dia 21, e os níveis destes anticorpos diminuem no dia 35 (Figura 8). Os animais que foram inoculados com GST-HI com saponina não apresentaram aumento nos níveis de anticorpos IgM, e aqueles inoculados somente com GST-HI não apresentaram produção detectável destes anticorpos contra esta proteína.

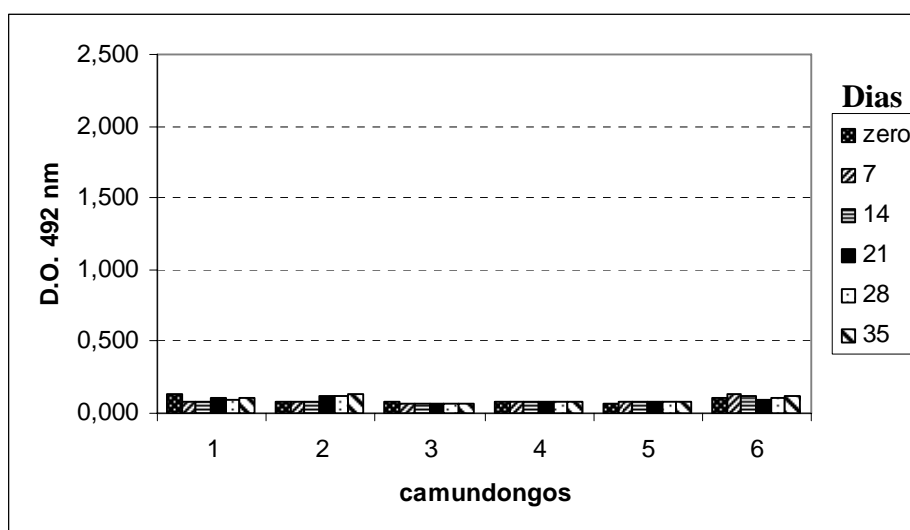


Figura 8 – Cinética por teste de ELISA para detecção de IgM nos soros dos camundongos inoculados com GST-HI. 1 e 2, camundongos inoculados com GST-HI saponina; 3 e 4, camundongos inoculados com GST-HI Montanide 888/Marcol 52; 5 e 6, camundongos inoculados somente com GST-HI.

O teste de ELISA realizado para observar a cinética da produção de anticorpos IgM dos camundongos inoculados com GST-Bm, mostrou não haver produção de anticorpos anti-GST-Bm. (Figura 9).

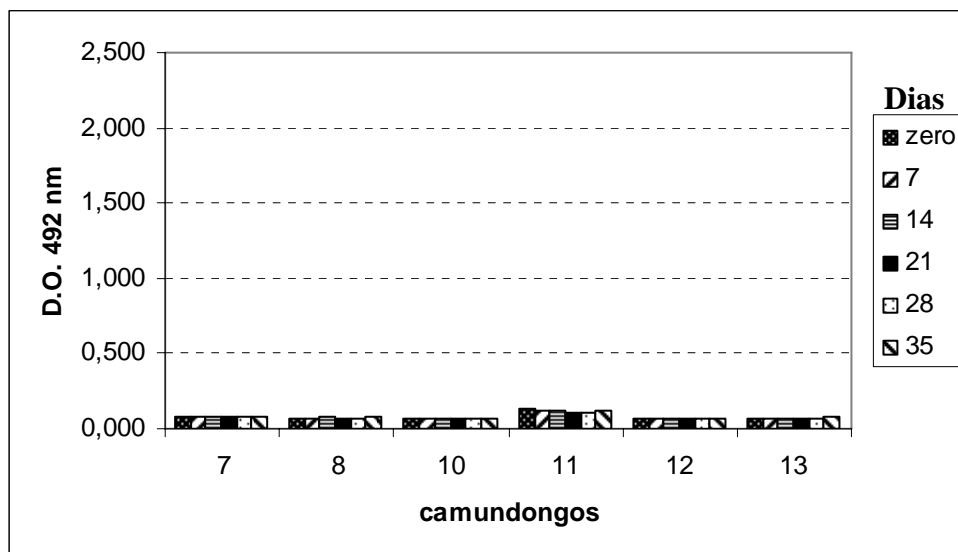


Figura 9 – Cinética por teste de ELISA para detecção de anticorpos IgM nos soros dos camundongos inoculados com GST-Bm. 7 e 8, camundongos inoculados com GST-Bm saponina; 10 e 11, camundongos inoculados com GST-Bm Montanide 888/Marcol 52; 12 e 13, camundongos inoculados somente com GST-Bm.

A cinética de produção de anticorpos IgG dos camundongos inoculados com GST-HI mostrou aumento dos níveis destes anticorpos nos animais que foram inoculados com GST-HI emulsificado com adjuvante Montanide 888/Marcol 52 no dia 21. O nível máximo de anticorpos IgG foi detectado no dia 42, diminuindo após o dia 56 (Figura 10). Os animais que foram inoculados com GST-HI com saponina não apresentaram aumento nos níveis de anticorpos IgG e aqueles inoculados somente com GST-HI não apresentaram produção detectável destes anticorpos contra esta proteína.

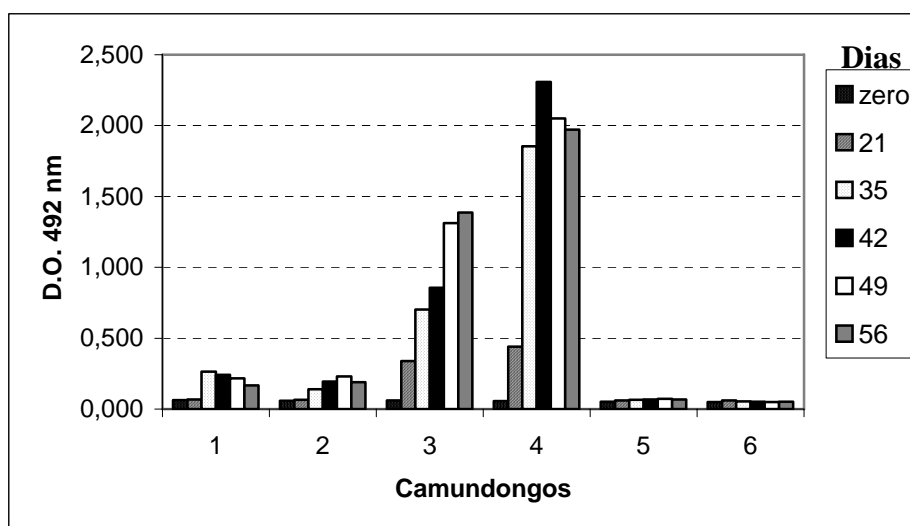


Figura 10 – Cinética por teste de ELISA, para detecção de IgG nos soros dos camundongos inoculados com GST-HI. 1 e 2, camundongos inoculados com GST-HI saponina; 3 e 4, camundongos inoculados com GST-HI Montanide 888/Marcol 52; 5 e 6, camundongos inoculados somente com GST-HI.

Foi observado que nenhum dos camundongos inoculados com GST-Bm apresentou produção de anticorpos anti-GST-Bm. (Figura 11).

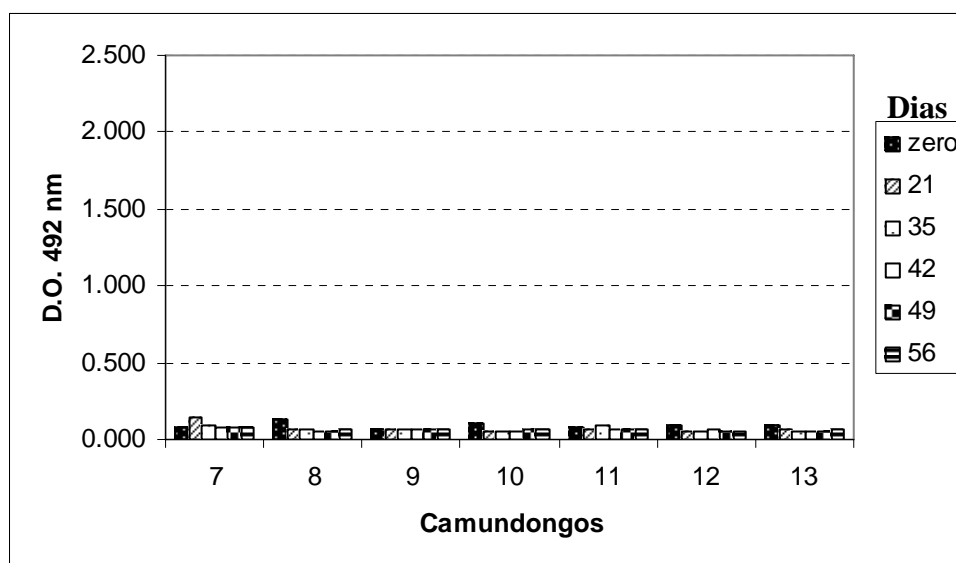


Figura 11 – Cinética, por teste de ELISA, para detecção de IgG nos soros dos camundongos inoculados com GST-Bm. 7 e 8, camundongos inoculados com GST-Bm saponina; 9, 10 e 11, camundongos inoculados com GST-Bm Montanide 888/Marcol 52; 12 e 13, camundongos inoculados somente com GST-Bm. Camundongos 14 – 25 foram animais controle, e não estão incluídos na figura.

A cinética da produção de anticorpos dos camundongos que receberam a quarta dose com 50 µg de GST-Bm foi realizada por teste de ELISA. Verificou-se que não houve nenhum aumento nos níveis de anticorpos IgG nestes animais (Figura 12).

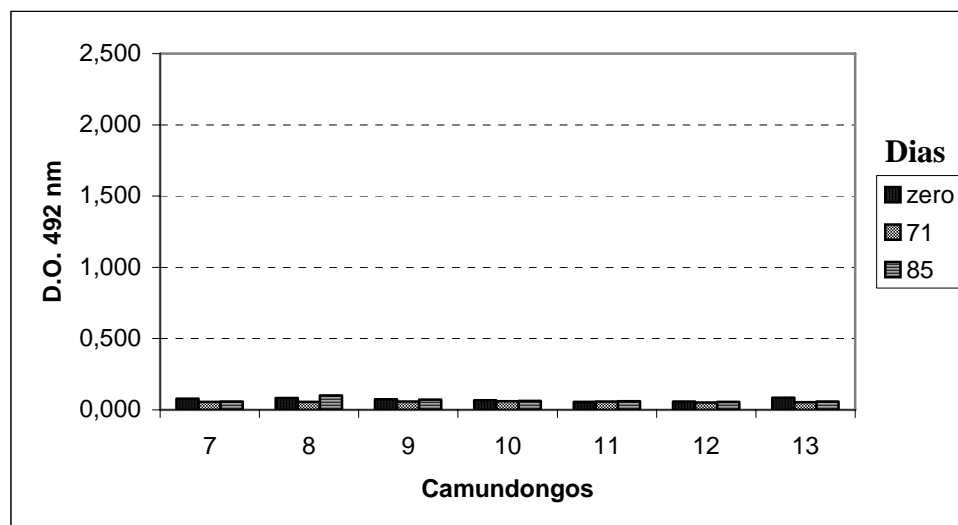


Figura 12- Cinética, por ELISA, para detecção de IgG nos soros dos camundongos após quarta imunização com GST-Bm. 7 e 8, camundongos inoculados com GST-Bm saponina; 9, 10 e 11, camundongos inoculados com GST-Bm Montanide 888/Marcol 52; 12 e 13, camundongos inoculados com GST-Bm somente. O soro dos camundongos foi diluído 1:200 e detectados com conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo diluído 1:2000.

5.3 Titulação de anticorpos anti-GST-HI

O título de anticorpos IgG produzidos pelos camundongos imunizados com GST-HI emulsificado com adjuvante Montanide 888/Marcol 52 foi de 6400 (Figura 13).

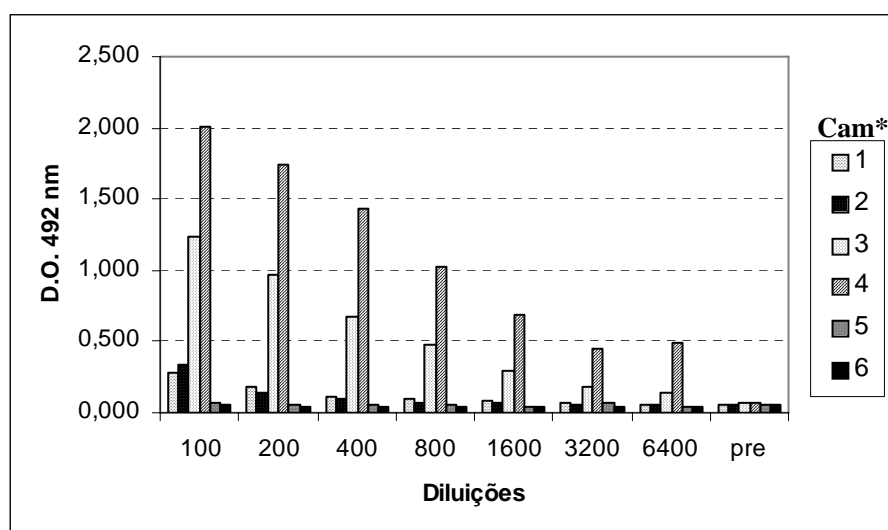


Figura 13 Titulação por ELISA para detecção de IgG nos soros dos camundongos imunizados com GST-HI. 1 e 2, camundongos inoculados com GST-HI saponina; 3 e 4, camundongos inoculados com GST-HI Montanide 888/Marcol 52; 5 e 6, camundongos inoculados somente com GST-HI. Cam*: camundongos.

6 DISCUSSÃO

Para o controle imunológico, considerado atualmente como uma alternativa para o controle do carrapato *R. microplus*, várias moléculas têm sido estudadas para a identificação e caracterização de antígenos protetores, o que representa o maior desafio para o desenvolvimento de uma vacina viável economicamente (WILLADSEN, 2004). Existem várias proteínas sendo estudadas como antígenos potenciais para candidatos a uma vacina contra o *R. microplus*. Essas proteínas podem interferir em importantes funções fisiológicas, como o sucesso reprodutivo, tendo como exemplo, a *Boophilus Yolk pro-Cathepsin* (BYC) (LOGULLO *et al.*, 1998; DA SILVA VAZ Jr *et al.*, 1998, LEAL, 2007), inibidores de tripsina (BmTIs) (ANDREOTTI *et al.*, 2002) e vitelina (TELLAM *et al.*, 2002). Existem ainda outras proteínas que ainda estão sendo caracterizadas, e que atuam em diferentes funções fisiológicas do carrapato, como a *Tick Heme-binding Aspartic proteinase* (THAP) (SORGINE, 2000), a VTDC (SEIXAS *et al.*, 2003), glutationa-S-transferase (Bm-GST) (DA SILVA VAZ Jr. *et al.*, 2004; ROSA DE LIMA *et al.*, 2002, HE *et al.*, 1999), entre outras.

Para ter maior possibilidade de sucesso, uma vacina deveria conter dois ou mais antígenos, que atingissem diferentes estágios da vida do carrapato. Esta estratégia aumentaria a eficiência da vacina e diminuiria o potencial para a seleção de resistência entre os carrapatos (TELLAM *et al.*, 2002). O desafio para a construção destas vacinas não se restringe somente ao carrapato bovino *R. microplus*, mas também para outras espécies de carrapatos, além de parasitos que causam prejuízos e danos à saúde humana e de animais.

Em *Schistosoma mansoni*, estão sendo estudados vários antígenos com potencial para candidatos à vacina, como a enzima glicolítica triose-fosfato isomerase (SmTPI), glutathione-S-transferase 28 kDa (Sm28), proteína paramiosina miofibrilar (Sm97), uma proteína integral de membrana (Sm23) e a calpaína (Smcalpain) (YANG *et al.*, 2001). Em *S. japonicum* também estão sendo estudados vários antígenos. Em *R. microplus* comercialmente existe em uso um antígeno, a Bm86, que é uma glicoproteína ligada à membrana de células do intestino de carrapatos fêmeas (WILLADSEN, 1988).

Tendo em vista as proteínas antigênicas já estudadas em diversas espécies de parasitos, este trabalho buscou verificar a imunogenicidade da proteína glutationa S-

transferase de *R. microplus* e *H. longicornis*, com o objetivo de produzir uma vacina contra ambos os carrapatos, ou utilizar a maior antigenicidade da GST-HI para produzir uma vacina contra o *R. microplus*. Boulanger *et al.*, (1999) e Lebens *et al.*, (2003), utilizando a proteína GST de duas espécies diferentes, *Schistosoma* spp. e *Fasciola* spp., demonstraram aumento na imunidade do hospedeiro contra as duas espécies, fato que pode ser considerado para o desenvolvimento de uma vacina universal contra mais de uma espécie de carrapato (DA SILVA VAZ JR *et al.*, 2004a).

A GST de artrópodes tem sido estudada devido ao seu papel na detoxificação de vários tipos de compostos químicos usados em produtos comerciais (YU, 2002). Vários níveis na detoxificação algumas vezes são relacionados com a resistência a um amplo espectro de inseticidas devido à grande quantidade de GST encontrada nos insetos (HEMINGWAY, 2000), sendo assim uma vacina capaz de induzir uma neutralização mediada por anticorpos tem o potencial de tornar os parasitos vulneráveis para os produtos tóxicos gerados pelo sistema imune (SCOTT & McMANUS, 2000).

Estudos, em camundongos Balb/C, com a inoculação de SmGST-28 utilizando-se diferentes adjuvantes, mostrou que a produção da resposta imunológica pode induzir a produção de anticorpos com diferentes isotipos de imunoglobulina G. Imunização com SmGST-28 com hidróxido de alumínio induziu uma forte resposta IgG1 anti-SmGST-28 e baixos níveis de IgG2a. Quando imunizados, por via subcutânea ou intraperitoneal com SmGST-28 emulsificado com adjuvante completo de Freund, os animais apresentaram altos níveis de ambos, IgG1 e IgG2a (COMMOY, *et al.*, 1998).

Em 2003, Rao *et al.* realizaram um estudo utilizando a expressão da SmGST-28 na superfície de fagos filamentosos, este então foi denominado de pdGST. Tal pesquisa foi para avaliar se a imunização com esta pdGST poderia ser imunogênica e conferir alguma proteção contra um desafio com cercarias, em camundongos. Os inóculos foram sem adjuvantes, somente com o pdGST, e por via intraperitoneal ou intradérmica. A análise dos isotipos de anticorpos específicos para GST no soro dos camundongos inoculados com pdGST mostrou que, duas semanas após a imunização, os anticorpos anti-GST predominantes foram do tipo IgM. Na semana 4 e 6 após a imunização, aumentos significativos de IgG2b e IgG3 estavam presentes nos soros dos camundongos imunizados com pdGST. Houve uma redução de

29,96% no número de vermes após a vacinação com pdGST.

Adjuvantes podem ser utilizados com antígenos em vacinas para melhorar a resposta imune de diferentes formas, entre elas aumentando a imunogenicidade de antígenos, a velocidade e duração da resposta imune, regulando a avidéz dos anticorpos, especificidade, isotipo ou distribuição das subclasses, estimulando as CTL, promovendo a indução de imunidade das mucosas, aumentando a resposta imune em indivíduos senescentes ou imaturos e diminuindo a dose de antígeno na vacina para redução do custo (SINGH & O'HAGAN, 2003).

Vários adjuvantes têm sido usados para aumentar a resposta imune contra antígenos específicos desde 1925, quando Ramon demonstrou que era possível aumentar artificialmente os níveis de antitoxina tetânica e diftérica pela adição de substâncias como agar, sais metálicos, lecitina ou saponina. Muitas moléculas têm características adjuvantes e podem ser classificados em diferentes formas. Audibert e Lise têm identificado três principais fontes de adjuvantes: vegetais, como a saponina ou extrato glucano; bacterianas, como monofosforil lipídio A, trealose dimicolato, toxina colérica ou lipopolissacarídeos e seus derivados; químicas, como hidróxido de alumínio, surfactantes, emulsões ou micro e nanopartículas (AUCOUTURIER *et al.*, 2001).

Adjuvantes contendo alumínio são amplamente usados para potencializar a resposta imune de vacinas que são administradas por via intramuscular ou subcutânea. Isto é devido a um depósito que é formado no local da injeção, no qual o antígeno é liberado lentamente (MÉNDEZ *et al.*, 2007). Saponinas são um complexo de triterpenoides, extraídos da cortiça da árvore *Quillaia saponaria* Induzem forte resposta Th1 e Th2 e resposta CTL moderada para algumas proteínas, provavelmente como resultado da formação de micelas proteína-saponina (COX & COULTER, 1997). Adjuvante completo de Freund é um potente, mas tóxico, adjuvante água em óleo mineral, o qual contém micobactéria morta (RANKIN, 2002), que induz resposta Th1 específica ao antígeno (BREWER, 2006). Entretanto pode causar inflamação ou necrose com granulomas disseminados sendo relatados em pulmões, fígado, rim, coração, linfonodos e músculos esqueléticos, em coelhos e ratos, após inoculação por via subcutânea ou intravenosa (HOLMAHL, 2001). O adjuvante incompleto de Freund é uma emulsão, sem a micobactéria morta, que tem sido utilizado na vacinação em animais de produção devido ao forte efeito adjuvante (AUCOUTURIER, 2001; RANKIN, 2002). Vacinas emulsionadas com adjuvante

baseado em óleo mineral, formam um depósito que libera lentamente o antígeno, prolongando a persistência e exposição das células imunocompetentes (VALLE, 2001; MILES *et al.*, 2005). Também induzem altos níveis de imunidade em bovinos e suínos (SINGH & O'HAGAN, 2003).

Estudos realizados com camundongos imunizados com GST de *S. japonicum*, linhagem Chinesa (SjcGST26), emulsificada com adjuvante de Freund mostrou ser imunogênica e promoveu níveis de proteção similares aos obtidos com a GST de *S. mansoni* de 28 kDa (SmGST28), em vários hospedeiros mamíferos desafiados com cercaria (SHUXIAN *et al.*, 1995). A SjcGST26 emulsificada com adjuvante de Freund também foi estudada em bovinos. Os animais desenvolveram uma imunidade protetora, reduzindo o número de vermes. Também foram avaliados os efeitos antifecundidade, que mostraram um significativo decréscimo no número de ovos depositados no fígado e na mucosa retal. Estes resultados também mostram que os níveis de proteção e imunidade anti-fecundidade foram similares para os dados obtidos com experimentos realizados com búfalos (WU *et al.*, 2004). A GST de *Schistosoma mansoni* de 28 kDa (SmGST28) tem comprovada eficácia como um antígeno para imunidade protetora reduzindo o número de espécimes nos indivíduos parasitados, a fecundidade das fêmeas e a viabilidade dos ovos (SCOTT & McMANUS, 2000).

Cães vacinados com GST recombinante de *Ancylostoma caninum* (AcGST-1) exibiram uma considerável redução dos ancilostomas adultos e na quantidade de ovos quando comparados com os cães controle. Hamsters também foram vacinados com rAcGST e mostraram 53,7% de redução da carga vermicinal após serem desafiados com *Necator americanus* (ZHAN *et al.*, 2005)

Vibanco-Perez *et al.* (1999) caracterizaram GST de *Taenia solium* (SGSTF) com massa molecular de 26 kDa. Imunizaram camundongos com SGSTF e observaram que houve redução de 74,2% dos metacestodos. Os anticorpos gerados contra SGSTF apresentaram reatividade cruzada com *T. saginata*, *T. taeniaeformis*, *T. crassiceps*; porém, não reagiram com GSTs de *S. mansoni* de camundongos, coelhos e de fígado de suínos.

Com base nestes estudos anteriores que comprovam a imunogenicidade das GSTs em outras espécies de parasitos, este trabalho comparou a imunogenicidade das GSTs dos carrapatos *R. microplus* e *H. longicornis*. Sendo assim, pode-se observar neste estudo que, no teste de ELISA, realizado para detectar anticorpos

IgM, nos camundongos imunizados, somente apresentaram este isotipo os animais que foram inoculados com GST-HI emulsificada com adjuvante Montanide 888/Marcol 52. Nos demais animais não foi detectado a presença desse isotipo. Os camundongos imunizados com GST-HI emulsificada com adjuvante Montanide 888/Marcol 52 apresentaram anticorpos IgG, os quais foram detectados no teste de ELISA, enquanto os animais imunizados com GST-HI emulsificada com saponina ou sem o adjuvante, não apresentaram anticorpos IgG durante o período experimental. O título de anticorpos IgG dos animais imunizados com GST-HI emulsificada com adjuvante Montanide 888/Marcol 52 foi de 6.400. E nenhum dos camundongos imunizados somente com GST-Bm apresentou níveis detectáveis de anticorpos IgG contra este antígeno.

Devido aos vários estudos que foram realizados até o momento, há a confiança sobre a viabilidade de um método alternativo para o controle do carrapato *R. microplus* através do desenvolvimento de uma vacina, e ou, o uso concomitante de uma estratégia de controle biológico. Alguns autores têm evidenciado que a imunidade anti-carrapato, induzida por associação de imunógenos pode ser mais efetiva que as vacinas baseadas em um único antígeno (WILLADSEN *et al.*, 1996; GARCIA-GARCIA *et al.*, 2000).

Os resultados observados nesse trabalho sugerem que a GST-HI é uma proteína imunogênica com potencial para compor uma vacina contra o carrapato *R. microplus*, embora mais estudos necessitem ser realizados com o objetivo de avaliar a imunoproteção contra este carrapato.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

- A GST-Bm não induziu a produção de anticorpos IgG, em camundongos, não sendo, portanto, imunogênica nas condições testadas;
- Animais que foram imunizados com a proteína GST-HI emulsificada com o adjuvante Montanide 888/Marcol 52, induziram a produção de anticorpos IgG, enquanto os animais imunizados com GST-HI com saponina ou sem adjuvante não produziram níveis detectáveis de anticorpos IgG.
- A proteína GST de *H. longicornis* mostrou-se mais imunogênica que a GST de *R. microplus*.

8 PERSPECTIVAS

- Devido aos resultados obtidos com a imunização de camundongos, o estudo das proteínas GST-Bm e GST-HI terá continuidade, com a determinação da imunogenicidade da GST-HI e da GST-Bm em coelhos e, posteriormente, a avaliação de sua imunogenicidade e imunoproteção em bovinos.

• REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC, Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Exportações Brasileiras de Carne Bovina, jan. a set. 2007 [on line]. Disponível na internet via: http://www.abiec.com.br/estatísticas_relatórios.asp. Arquivo capturado em 18 de outubro de 2007.

ABREU, L.A *et al.* Proteolytic activity of *Boophilus microplus* yolk pro-catepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 34: 443-449, 2004.

ANDREOTTI, R.*et al.* BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**, 2: 557-563, 2002.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**, 19: 2666-2672, 2001.

BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, 141(3-4):319-24, 2006.

BARRIGA, O. O. Evidence and mechanisms of immunosuppression in tick infestations. **Genetic Analysis**, v. 15: 139-142, 1999.

BASSO, L.M.S.*et al* Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40 (6): 595-600, 2005.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de penetração do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus*, em condições experimentais. **Ciência Rural**, 29: 351-354, 1999.

BOULANGER, D.*et al.* *Shistosoma bovis*: vaccine effects of a recombinant homologous glutathione S-transferase in sheep. **International Journal for Parasitology**, 29: 415-418, 1999.

BREWER, M.J. (How) do aluminium adjuvants work? **Immunology Letters**, 102: 10-15, 2006.

BROSSARD, M.; WIKEL, S.K. Tick immunobiology. **Parasitology**, 129: S161–S176, 2004.

BRUM, J.G.W. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei*: etiopatogenia e sazonalidade. **Tese (Doutor em ciências)**. Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio Janeiro, 1988.

CHAGAS, A.C.S *et al.* Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 39: 247-253, 2002.

COBON, G.S.; WILLADSEN, P. Vaccines to prevent cattle tick infestations. *New Generation Vaccines*, 50: 901-917, 1990.

COLES, B.; KETTERER, B. **Biochemical Molecular Biology**, 25: 47-70, 1990.

COMOY, E.E.; CAPRON, A.; THYPHRONITIS, G. Adjuvant is the major parameter influencing the isotype profiles generated during immunization with a protein antigen, the *Schistosoma mansoni* Sm28-GST. **Scandinavian Journal of Immunology**, 47: 444-452, 1998.

COPPOLINO, M.G.*et al.* Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signaling and cell adhesion. **Nature**, 386: 843-847, 1997.

CORDOVÉS, C.O. *Carrapato: controle e erradicação*. Alegrete: Gralha, 1996.

CORSON, M.S.; TEEL, P.D.; GRANT, W.E. Microclimate influence in a physiological model of cattle-fever tick (*Boophilus* spp) population dynamics. **Ecol. Model.** 180: 487-514, 2004.

COX, J.C.; COULTER, A.R. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, 15: 248-256, 1997.

DA COSTA, G.L.*et al.* 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, 2002.

DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E.; SNYDER, D.E. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Veterinary Parasitology**, 99: 41-52, 2001.

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

DA SILVA VAZ JR, I. *et al.* Vacina contra o carrapato. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento** 18-22, 2002.

DA SILVA VAZ JR, I. *et al.* Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. **Veterinary Parasitology**, 119: 237-245, 2004.

DA SILVA VAZ JR, I. *et al.*, Cloning, expression and partial characterization of a

Haemaphysalis longicornis and a *Rhipicephalus appendiculatus* glutathione S-transferase. **Insect Molecular Biology**, 13: 329-335, 2004 (a).

DE LA FUENTE, J.; *et al.* Vaccination against ticks (*Boophilus* spp): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Genetic Analysis Biomolecular Engineering**, v. 15: 143-148, 1999.

DE ROSE, R. *et al.* Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. **Veterinary Immunology Immunopathology**, 71(3-4):151-60, 1999.

ELDER, J.K. *et al.* A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistant cattle and pasture spelling. **Australian Veterinary Journal**, 56: 219-223, 1980.

FARIAS, N.A.R.; GONZALES, J.C.; SAIBRO J.C. Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 21: 1313-1320, 1986.

FRAZZON, A. P. *et al.* In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology** 94: 117-125, 2000.

FERNANDES, F.F. *et al.* Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control the cattle tick *Boophilus microplus*, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40: 1243-1245, 2005.

FERREIRA, C.A.S. *et al.* cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. **Parasitology**, 125: 265-74, 2002.

FOURNIER, D. *et al.* Insect glutathione S-transferase: Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. **Journal of Biological Chemistry**, 267: 1840-1845, 1992.

GARCÍA-GARCÍA, J.C., *et al.*, 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, 2000.

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

GOBERT, G.N. The role of microscopy in the investigation of paramyosin as a vaccine candidate against *Schistosoma japonicum*. **Parasitology Today**, 14: 115-118, 1998.

GOMES, A. Controle do carrapato do boi: um problema para quem cria raças européias. EMBRAPA. Campo Grande (MS), Ago, n.31, 1998.

GOMES, A. Carrapato-de-boi: Prejuízos e controle. EMBRAPA. Campo Grande

(MS), Dez, n.42, 2000. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD42.html>. Arquivo capturado em 08 de dezembro de 2006.

GONZALES, J.C. *O controle do carrapato do boi*. 2ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995.

GUERRERO, F.D. *et al.* Sequencing a New Target Genome: The *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Genome Project. **Journal Medicine Entomology**, 43(1): 9-16 (2006).

GLUGLIELMONE, A.A.; *et al.* Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In BARROS-BATESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. 2006

HARNNOI, T. *et al.* Characterization of *Haemaphysalis longicornis* recombinant cement-like antigens and preliminary study of their vaccination effects. **J. Vet. Med. Sci.** 68(12): 1289-1295, 2006.

HE, H. *et al.* Characterization and molecular cloning of glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 29: 737-743, 1999.

HEATH, A.C.G. New Zealand Cattle Tick life Cycle. Ministry of Agriculture and Fisheries, Research Division, Wallaceville Research Centre. Disponível na internet via <http://www.hortnet.co.nz/publications/hortfacts/hf401036.htm>. Arquivo capturado em 13 de outubro de 2007.

HORAK, I.G.; CAMICAS, J.-L.; KEIRANS, J.E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology**, 28 (1-4): 27-54, 2002.

HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, 23: 12-32, 1985.

HUANG, H.S. *et al.* Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 28: 651-658, 1998.

IMAMURA, S. *et al.* A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as a anti-tick vaccine. **Vaccine**, 23: 1301-1311, 2005.

IMAMURA, S., *et al.* Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. **Vaccine**, 24: 2230-2237, 2006.

JAWORSKI, D.C. *et al.* A secreted calreticulina protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. **Journal Insect Physiology**, 41, 369-375, 1995.

JOHNSTON, L.A.Y.; KEMP, D.H.; PEARSON, R.D. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects induced immunity on tick populations. **International Journal for Parasitology**, 16: 27-34, 1986.

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

JONSSON, N.N.; MAYER, D.G.; GREEN, P.E. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). **Veterinary Parasitology**, 88: 79-92, 2000.

KAAYA, G.P.; MWANGI, E.N.; OUNA, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 67: 15-20, 1996.

KASHINO, S.S. *et al.* *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Experimental Parasitology**, 110: 12–21, 2005.

KAWALEK, J.C.; REW, R.S.; HEAVNER, J. Glutathione S-transferase, a possible drug metabolizing enzyme, in *Haemonchus contortus*: comparative activity of a combendazole-resistant and a susceptible strain. **International Journal for Parasitology**, 14: 173-175, 1984.

KOCAN, K.M. Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle. **Veterinary Parasitology**, 57: 121-151, 1995.

LACLETTE, J.P. *et al.*, A. Paramyosin inhibis complement C1. **Journal of Immunology**, 148: 124-128, 1992.

LEAL, A. T.; FREITAS, D.; DA SILVA VAZ JR, I; Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (1): 01-11, 2003.

LEAL, A.T.; *et al.* Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**, v. 45: 107-114, 2006 (a).

LEAL, A.T.; *et al.* Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114: 341-345, 2006 (b).

LEAL, A.T. Clonagem e utilização de uma proteína (*Boophilus Yolk pro-Cathepsin*) recombinante do carrapato *Boophilus* em uma vacina contra carrapato. **Tese (Doutor em Ciências)**. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2006 (c).

LEBENS, M. *et al.* A mucosally administered recombinant fusion protein vaccine

against schistosomiasis protecting against immunopathology and infection. **Vaccine**, 21: 514-520, 2003.

LEE, A.J. *et al.* Expresión and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. **Veterinary Parasitology**, 105: 49-63, 2002.

LOGULLO, C. *et al.* Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, 116: 525-532, 1998.

LOGULLO, C. *et al.* Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 32: 1805-11, 2002.

MAROTO, M. *et al.* Analisis of the paramyosin/miniparamyosin gene. **Journal of Biological Chemistry**, 270: 4375-4382, 1995.

MARTINS, J.R.S. *et al.* Carrapatos de **Importância Médico-Veterinário da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. 2006**

McCOSKER, P. L. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M. & KREIR, J. P. (Eds.) *Babesiosis*. **New York: Academic Press**, 1981.

MÉNDEZ, I.Z.R. *et al.* Potentiation of the immune response to non-adsorbed antigens by aluminum-containing adjuvants. **Vaccine**, 25: 825-833, 2007.

MICHALAK, M. *et al.* Calreticulin: one protein, one gene, many functions. **Biochemical Journal**, 344: 281-292, 1999.

MILLER, C.M.D.; HOWELL, M.J.; BORAY, J.C. Glutathione S-transferase s markers of salicylanilide resistance in isolates of *Fasciola hepatica*. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 4: 533-542, 1994.

MILES, A.P.; *et al.* Montanide® ISA 720 vaccines: quality control of emulsions, stability of formulated antigens, and comparative immunogenicity of vaccine formulations. **Vaccine**, 23: 2530-2539, 2005.

MULENGA, A.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. **Microbes Infect**, 2: 1353-1361, 2000.

NARI, A. Strategies for control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 57: 153-165, 1995.

NEUEFEIND, T.; REINEMER, P.; BIESELER, B. Plant glutathione S-transferase and herbicide detoxification. *Biochemical Journal*, v. 378 (3-4), p. 199-205, 1997.

NORTON, G.A.; SUTHERST, R.W.; MAYWALD, G.F. A framework for integrating control methods against the cattle tick, *Boophilus microplus*, in Australia. **Journal of Applied Ecology**, 20: 489-505, 1983.

NUTTALL, P.A.; LABUDA, M. Tick–host interactions: saliva-activated transmission. **Parasitology**, 129: S177–S189, 2004.

NUTTALL, P. A.; *et al.* Exposed and Concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**, v. 28: 155-163, 2006.

PATARROYO, J.H.; *et al.* Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88: 163-172, 2002.

ONOFRIO, V.C. *et al.* Família Ixodidae: características gerais, comentários e chave para gêneros. In BARROS-BATESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies.**

PATARROYO, J.H.; LOMBANA, C.G., Resposta imune a vacinas sintéticas anti *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Brasileira**, v.13: 129-134, 2004.

PREVOT, P.-P., *et al.*, Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. **Journal of Biological Chemistry**, 281: 26361-26369, 2006

PREVOT, P.-P., Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. **Vaccine**, 25: 3284-3292, 2007.

PRUETT, J.H. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. **International Journal for Parasitology**, 29: 25-32, 1999.

RANKIN, R. *et al.* CpG-containing oligodeoxynucleotides augment and switch the immune responses of cattle to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D. **Vaccine** 20: 3014-3022, 2002

RAO, K.V.N.; HE, Y-X. KALYNASUNDARAM, R., Expression of a 28-kilodalton Glutathione S-transferase antigen of *Schistosoma mansoni* on the surface of filamentous phages and evaluation of its vaccine potencial. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, July: 536-541, 2003.

RIBEIRO, J.M.C. Role saliva in tick/host interactions. **Experimental and Applied Acarology**, 7: 15-20, 1989.

RIDING, G.A. *et al.* A protective “concealed” antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. **Journal of Immunology**, 153: 5158-5166, 1994.

ROSA DE LIMA, M.F. Clonagem e caracterização parcial de cDNA de glândula salivar de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) similar a Glutathione S-transferase. **Dissertação (Mestre em Bioquímica)**. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, do Instituto Básico da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2001

ROSA DE LIMA, M.F. *et al.* Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 32: 747-754, 2002.

RUIZ, L.M.; ARMENGOLA, G.; HABEYCHA, E.; ORDUZ, S. A theoretical analysis of codon adaptation index of the *Boophilus microplus* bm86 gene directed to the optimization of a DNA vaccine. **Journal of Theoretical Biology**, 239: 445–449, 2006.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, 129: S389–S403, 2004.

SAMISH, M.; GLAZER, I. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. **Trends in Parasitology**, 17: 368-371, 2001.

SANDERS, M.L. *et al.* Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 59: 279-285, 1998.

SANDERS, M.L. *et al.* Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* (Say) and are correlated with tick engorgement indices. **American Journal of Epidemiology**, 149: 777-784, 1999.

SCOTT, J.C.; McMANUS, D.P. Molecular cloning and enzymatic expression of the 28 kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma japonicum*: evidence for sequence variation but lack of consistent vaccine efficacy in the murin host. **Parasitology International**, 49: 289-300, 2000.

SEIXAS, A. *et al.* A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. **Parasitology**, 126: 155-163, 2003.

SHIMIZU, S. *et al.* Reduction in tick numbers (*Haemaphysalis longicornis*), mortality and incidence of Theileria sergenti infection in field-grazed calves treated with flumethrin pour-on. **Veterinary Parasitology**, 92: 129-138, 2000.

SHUXIAN, L. *et al.* Immunization of mice with recombinant Sjc26GST induces a pronounced anti-fecundity effect after experimental infection with Chinese *Schistosoma japonicum*. **Vaccine**, 13: 603-607, 1995.

SINGH, M.; O'HAGAN, D.T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **International Journal for Parasitology**, 33: 469-478, 2003.

SMITH, D.B. *et al.* Mr 26000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite GST. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United State of America**, v. 83, p. 8703-8707, 1986.

SORGINE, M.; *et al.* A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of hard tick *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275: 28659-65, 2000.

SUGINO, M. *et al.* A serine proteinase (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis*

longicornis; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. **Vaccine**, 21: 2844-2851, 2003.

SUTHERST, R.W.; BOURNE, A.S. The effect of desiccation and low temperature on the viability of eggs and emerging larvae of the tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Ixodidae). **International Journal for Parasitology**, 36: 193–200, 2006.

SUTHERST, R.W.; JONES, R.J.; SCHNITZERLING, H.J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, 295: 320-321, 1982.

SUTHERST, R.W. *et al.* The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. **Australian Journal of Agricultural Research**, 34: 317-327, 1983.

TELLAM, R.L. *et al.* Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. **Veterinary Parasitology**, 103: 141-156, 2002.

TERRIER, P. *et al.* An immunohistochemical study of Pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. **American Journal Pathology**, 137: 845-853, 1990.

TRIMNELL, A.R.; HAILS, R.S.; NUTTALL, P.A. Dual action ectoparasite vaccine targeting “exposed” and “concealed” antigens. **Vaccine**, 20: 3560-3568, 2002.

ULLMANN, A. J. *et al.* Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* and the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Molecular Biology** 14(2): 217–222, 2005.

UMEMIYA, R. *et al.* *Haemaphysalis longicornis*: Molecular characterization of a homologue of the macrophage migration inhibitory factor from the partially fed ticks. **Experimental Parasitology**, 115: 135-142, 2007.

URQUHART, G.M. *et al.* **Parasitologia Veterinária**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

VALENZUELA, J.G. Exploring tick saliva: from biochemistry to ‘sialomes’ and functional genomics. **Parasitology**, 129: S83–S94, 2004.

VALLE, M.R. *et al.* The evaluation of yeast derivatives as adjuvants for the immune response to the Bm86 antigen in cattle. **BMC Biotechnology** 1:2, 2001.

VALLE, M. R.; *et al.* Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac. **Experimental and Applied Acarology**, v. 34: 375-382, 2004.

VANCOVÁ, I.; *et al.* Differential anti-chemokine activity of *Amblyomma variegatum* adult ticks during blood-feeding. **Parasite Immunology**, 29: 169-177, 2007.

VIBANCO-PEREZ, N. *et al.* Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. **Journal for Parasitology**, v. 85(3), p. 448-453, 1999.

ZHAN, B.; *et al.*, Biochemical characterization and vaccine potencial of a heme-binding glutathione transferase from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. **Infection and immunity**, 73: 6903-6911, 2005.

ZHIOUA, E. *et al.* Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal for Parasitology**, 83: 815-818, 1997.

YANG, W. *et al.* Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. **Vaccine**, 19: 103-113, 2001.

YOUNG, A.S.; MORZARIA, S.P. Biology of *Babesia*. **Parasitology Today**, 2: 211-219, 1986.

YU, S.J. Biochemical characteristics of microsomal and cytosolic glutathione S-transferase in larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 72: 100-110, 2002.

WALADDE, S.M.; RICE, M.J. The sensory basis of tick feeding behavior. In: Obenchain, F.D., Galun, R. (Eds). **Physiology of ticks**. New York, Pergamon Press, 1982.

WEI, S.H.; CLARK, A.G.; SYVANEN, M. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-GA) from a hiper insecticide resistant strain of a housefly *Musca domestica*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 31: 1145-1153, 2001.

WHARTON, R.H; NORRIS, K.R. Control of parasitic arthropods. **Veterinary Parasitology**, 6:135-164, 1980.

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

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

WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. **Parasitology Today**, v. 4: 196-198, 1988.

WILLADSEN, P.; MCKENNA, R.V.; RIDING, G.A. Isolation from the cattle tick, *B. microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. **International Journal for Parasitology**, 18: 183-189, 1988.

WILLADSEN, P.; COBON, G.; MCKENNA, R.V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunology*, 18: 241-246, 1996.

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

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**, 129: S367–S387, 2004.

WU, Z.; *et al.*. Persistence of the protective immunity to *Schistosoma japonicum* in Chinese yellow cattle induced by recombinant 26 kDa glutathione S-transferase (reSje26GST). **Veterinary Parasitology**, 123: 167-177, 2004.