# Vacina contra Carrapato

Foto cedida pelos autores

*Boophilus microplus:* Controlando o carrapato com o uso de vacina

**Itabajara da Silva Vaz Junior**
*Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterrinária, UFRGS - Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul*
*ita@dna.cbiot.ufrgs.br*

**Carlos Termignoni**
*Departamento de Bioquímica, UFRGS - Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul*

**Aoi Masuda**
*Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, UFRGS - Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul*

**Pedro de Oliveira**
*Departamento de Bioquímica Médica, UFRJ*

Desenvolver novos métodos para manipular o sistema imune para controlar doenças infecciosas e parasitárias tem sido um objetivo constante de diferentes grupos de pesquisadores em várias partes do mundo, pois a prevenção de doenças com o uso de vacinas é a prática com a melhor relação custo-benefício nas medicinas humana e veterinária. Na realidade, a utilização de vacinas é uma prática há muito estabelecida e corriqueira para o controle de várias doenças bacterianas e virais. Apesar do esforço constante nas pesquisas para desenvolver vacinas, o controle de parasitas pela estimulação do sistema imune é uma meta ainda não atingida para praticamente todas as parasitoses humanas e veterinárias, pois, até hoje, só existem comercialmente vacinas para o controle do carrapato bovino *Boophilus microplus*.

O carrapato *B. microplus* é um dos principais parasitas que afetam economicamente a bovinocultura, ocasionando um custo anual estimado em 1 bilhão de dólares na pecuária sul-americana (Horn, 1987). O controle deste parasita tem sido feito com o uso de acaricidas. A introdução destas drogas, que permitiram o controle do carrapato, foi um dos fatores preponderantes no desenvolvimento da pecuária em varias regiões.

As dificuldades no uso de produtos químicos, entretanto, têm aumentado cada vez mais, pois os carrapatos têm desenvolvido rapidamente resistência aos diferentes princípios ativos utilizados nos pesticidas. Os produtos que já foram utilizados incluem derivados arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas e piretróides sintéticos. Em média, os diferentes princípios ativos utilizados para controlar o carrapato apresentaram uma vida útil de pouco mais de uma década, quando quase a totalidade das populações de carrapatos presentes no campo apresentava resistência à droga utilizada. O interesse no desenvolvimento de outras formas de controle do carrapato decorre do fato de que o controle químico mostra-se cada vez mais inviável economicamente. Os custos crescentes para desenvolver novas drogas e o curto período de vida útil que elas apresentam (de Castro and Newson, 1993; Kay and Kemp, 1994) estão tornando-se incompatíveis com o preço que o criador pode pagar sem que a produção deixe de ser rentável (Frisch, 1999). Outro fator importante que impõem a procura de novos métodos de controle é a crescente exigência do mercado consumidor por alimentos com níveis cada vez menores de resíduos químicos e que não contaminem o ambiente (Rodriguez et al., 1995).

Conseguir formas alternativas para o controle do carrapato impõem-se como uma necessidade premente. Os estudos para atingir este objetivo têm sido concentrados no controle imunológico, procurando desenvolver vacinas, e, em menor escala, no

controle biológico, através do uso de organismos entomopatogênicos (Monteiro et al., 1998). Tanto no caso do controle pela utilização de drogas como nos métodos alternativos, o conhecimento da dinâmica das populações de carrapato que ocorrem em cada região é fundamental para o sucesso dos programas de controle (Mount et al., 1991).

Entre as vantagens do uso de vacinas está a segurança, que é maior, tanto para o aplicador como para o consumidor, e a ausência de período de carência após a aplicação, fator de importância fundamental na pecuária de leite. A utilização de microorganismos visando o controle de carrapatos é, ainda, pouco estudada. Entretanto, o sucesso, no uso de vírus (*Baculovirus*), bactérias (*Bacillus thuringiensis) e* fungos (*Metarbizium anisopliae)* no controle de pragas da agricultura (Alves, 1986) indica que o controle biológico dos ácaros parasitas de animais pode ser viável.

Um conceito totalmente novo que surgiu com os experimentos de vacinação contra o *B. microplus* é o de "antígeno oculto" (*concealed antigen*) (Willadsen and Kemp, 1988). Como antígeno oculto entende-se uma ou mais proteínas imunogênicas do parasita, que durante uma infestação não entram em contato com o sistema imunológico do hospedeiro, e, portanto, não têm possibilidade de induzirem uma resposta imune durante o parasitismo. Entretanto, uma vez que o hospedeiro seja imunizado artificialmente com um destes antígenos, anticorpos e outros elementos efetores do seu sistema imune do hospedeiro, se ingeridos pelo parasita, interagem com a proteína ou proteínas utilizadas na imunização. Estas interações podem interferir nas funções destes antígenos de modo a causarem danos ao parasita. O objetivo das pesquisas que estão sendo desenvolvidas nesta área é identificar proteínas do parasita que estimulem uma resposta imune do hospedeiro que venha prejudicar alguma função fisiológica importante para a sobrevivência, o desenvolvimento, a capacidade do carrapato de gerar descendência ou a vários desses processos. Uma dificuldade das vacinas baseadas em antígenos ocultos é que a resposta imunológica de animais tratados não é continuamente estimulada pela infestação natural. A manutenção do nível de anticorpos protetores, portanto, só pode ser mantida através de revacinações.

A vantagem estratégica do uso de vacinas com antígenos ocultos é a de evitar os principais mecanismos que os parasitas apresentam para escapar da resposta imune do hospedeiro. Entre os mecanismos descritos para diferentes espécies de carrapatos encontram-se fatores de imunossupressão, inibidores do sistema complemento, da citotoxicidade, da resposta inflamatória e interleucinas e competição antigênica (Barriga, 1999; Willadsen, 1999). Obviamente, esta eficiência em evitar os mecanismos de proteção dos hospedeiros desenvolveu-se gradualmente durante o longo tempo em que ocorreu a coevolução dos parasitas e seus hospedeiros. A resposta imune do hospedeiro e os mecanismos de escape do parasita estão em um equilíbrio extremamente refinado, que permite a sobrevivência de ambas as espécies. Como os carrapatos, não tiveram oportunidade de desenvolver estratégias de escape da resposta imune contra antígenos ocultos devido à falta de contato entre estes antígenos e o sistema imune do bovino, esta resposta seria, teoricamente, mais eficaz que uma resposta imune natural (Willadsen, 1988).

Outro conceito recente no campo da imunidade, inicialmente utilizado em algumas propostas de vacinas para malária, é o de "vacina altruísta" (Brown, 1991). Uma vacina altruísta é definida quando a resposta imune desenvolvida não protege diretamente o organismo imunizado, mas interfere na propagação do parasita. Ela traz beneficio aos outros indivíduos da mesma ou das próximas gerações do hospedeiro (Kaslow et al., 1991). O principal efeito de uma vacina deste tipo, no caso do *B. microplus*, é a

## Ciclo Biológico do Carrapato

O *Boophilus microplus* é originário da Ásia e está presente em áreas tropicais e subtropicais, entre os paralelos 32º N e 32º S, área que abriga grandes rebanhos bovinos comerciais na América, África, Ásia e Austrália (GONZALES, 1975). Ele causa queda na produção de leite e carne, danos ao couro e transmite os protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e a rickettsia *Anaplasma marginale,* que causam o quadro conhecido como Tristeza Parasitária Bovina.

O ciclo biológico do *B. microplus*, diferentemente de outros carrapatos, é completado pela passagem em apenas um hospedeiro. Após desprender-se do bovino, a fêmea ingurgitada procura um local protegido da luz solar direta para realizar a postura, que pode durar de uma semana a vários meses, dependendo das condições ambientais como temperatura e umidade . Uma vez completada a postura a fêmea morre. Quando eclode, a larva é extremamente ativa e migra por geotropismo negativo para as extremidades das folhas do pasto, procurando o hospedeiro. Ao entrar em contato com o bovino, a larva dirige-se para regiões corporais mais propícias ao seu desenvolvimento como a parte posterior das coxas, regiões perineal, perianal e perivulvar e a face interna das orelhas. Após fixação, a larva alimenta-se inicialmente de linfa realizando ecdise para ninfa em cerca de sete dias. O período de ninfa prolonga-se por outros sete dias e após nova ecdise ocorre a diferenciação sexual. No estágio adulto, a fêmea inicia o repasto sanguíneo, realiza a cópula e aumenta do volume sanguíneo ingurgitado até que a fêmea totalmente ingurgitada cai ao solo. O ciclo de vida parasitário dura em média 21 dias. O macho permanece no bovino, sobrevivendo um tempo até duas vezes maior do que as fêmeas.

redução do número de larvas que surgem após a fase de infestação. O efeito da vacina para o próprio animal vacinado é pequeno mas a redução no número de larvas disponíveis para futuras infestações tem um efeito extremamente importante pois a população do parasito diminui a cada geração e assim o nível de infestação da população bovina também decresce. Deste modo, mais ainda do que no caso de outros tipos de vacina, é importante não só que todos os animais sejam vacinados mas também que a entrada de animais não vacinados no rebanho seja estritamente evitada. É importante observar que os efeitos da vacinação serão mais visíveis somente após um período de tempo correspondente a algumas gerações do parasita.

**Figura 1:** Carrrapato fêmea realizando postura (esquerda) e outro em período de pré-postura (direita). Uma fêmea no início da postura pesa aproximadamente 300mg e realiza uma postura de aproximadamente 3000 ovos (150mg)

No momento, existem duas vacinas disponíveis que controlam parcialmente o *B. microplus*. Ambas são baseadas na proteína Bm86, identificada no intestino de fêmeas do carrapato. A Bm86 é uma glicoproteína de membrana com massa molecular de 89 kDa, presente nas células intestinais e com papel na endocitose (Willadsen et al., 1989). O gene da Bm86 foi identificado, clonado e expressado na bactéria *Escherichia coli* (Rand et al., 1989) e na levedura *Pichia pastoris* (Rodríguez et al., 1994). para a produção em maior quantidade. Testes iniciais de vacinação, realizados com a proteína isolada de carrapato demonstraram que sua inoculação em bovinos é capaz de induzir uma resposta imune que leva a uma redução de até 90% na viabilidade da nova geração de carrapato. Os efeitos protetores da vacina comercial, que usa a proteína recombinante produzida em bactérias e leveduras têm sido observados não só a nível experimental, mas também, em condições reais a campo. A eficácia destas vacinas tem variado entre 51% e 91%, dependendo das características da população de carrapato e da condição nutricional dos bovinos utilizados no teste.(Penichet et al., 1994; Rodríguez et al., 1995). Este nível de proteção pode proporcionar uma redução de até 60% no consumo de acaricidas. Ademais, também diminui a transmissão de babesiose (De la Fuente et al., 1999), uma das doenças transmitidas pelo carrapato.

Uma característica interessante da Bm86 é a sua capacidade de atuar como adjuvante nas vacinas contra rinotraqueíte bovina (em bovinos) e da hepatite B (em camundongos). Atividade de adjuvante só havia sido descrita para citocinas, toxina colérica, porinas bacterianas e fragmento C3d do sistema complemento. O mecanismo desta ação da Bm86 ainda permanece desconhecido (Gárcia-Gárcia, et al., 1998)

Além da Bm86, outras proteínas de *B. microplus* têm sido caracterizadas como imunógenos, mas nenhuma delas está ainda sendo utilizada em vacina comercial. As proteínas Bm91 e BMA7, também isoladas de membranas intestinais, além de induzem, por si só, uma resposta imunológica fracamente protetora, aumentaram o grau de proteção induzido pela Bm86, quando inoculadas simultaneamente. A Bm91 é uma glicoproteína presente na glândula salivar e no intestino. Embora ela tenha uma estrutura primária muito semelhante à enzima conversora de angiotensina sua função fisiológica ainda é desconhecida (Riding et al., 1994). A BMA7 esta amplamente distribuída nos tecidos do parasita e apresenta similaridade com proteínas relacionadas com as mucinas. Ela é tão intensamente glicolisada que da massa molecular de 66kDa, 36 Kda são devidos à porção glicídica (McKenna, et al., 1998).

Para estudar este problema, foi formada uma associação entre pesquisadores do Centro de Biotecnologia e da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, do Departamento de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo que contam ainda com a colaboração de pesquisador do National Institutes of Health (Estados Unidos). Os trabalhos estão orientados no sentido de caracterizar outras proteínas com potencialidade para serem utilizadas em uma vacina poliimunogênica e assim obter-se vacinas com uma efetividade tal que o controle do carrapato possa ser feito sem o uso de pesticidas químicos.

Uma glicoproteína com capacidade de imunoprotetora e, portanto, potencialmente útil em uma vacina, denominada BYC (*Boophilus* Yolk Catepsina), foi isolada de ovo de carrapato após 1 dia da postura (Logullo et al., 1998).

Durante o processo de purificação da BYC, por cromatografias de troca iônica e gel-filtração, foi observado que a fração identificada como BYC continha dois peptídeos, de massas moleculares de 54 e 49 kDa. A análise da seqüência de aminoácidos da região N-terminal de ambos os

peptídeos indicou que o peptídeo menor era resultante da hidrolise do peptídeo sinal do outro e que ambos apresentavam similaridade com precursores de proteinase aspártica. Experimentos de hidrolise *in vitro* e análise de ovos durante os 21 dias de incubação, mostraram que o peptídeo de 49 kDa é resultante da autoproteólise do peptídeo sinal, provocada durante o processo de acidificação do ovo que ocorre na embriogênese. *In vitro*, a proteína purificada, após ativação por acidificação, apresenta atividade hidrolítica sobre hemoglobina e vitelogenina. Essa atividade sobre vitelogenina sugere que ela tenha participação no processamento de proteínas do ovo para a produção de proteínas do embrião (Logullo et al., 1998). A sua utilização como imunógeno em uma vacina experimental levou a uma proteção entre 14% e 36%, sendo que o principal efeito observado foi sobre o percentual de eclosão dos ovos. Anticorpos específicos foram detectados até 11 meses após a imunização com a BYC, quando, com um reinóculo da proteína, foi possível observar a manutenção de memória imunológica (Da Silva Vaz et al., 1998).

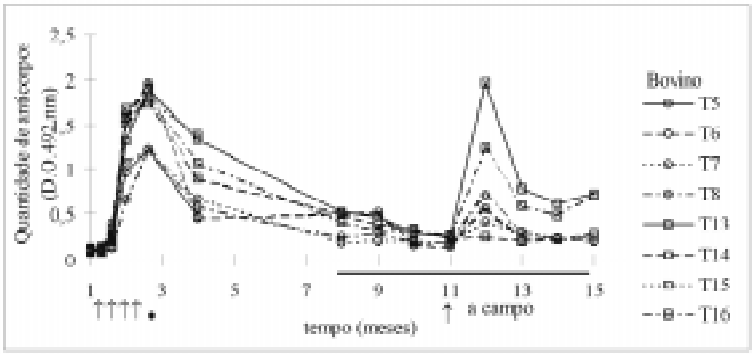


**Figura 2:** Dinâmica da resposta imune humoral, determinada por ELISA, de bovinos imunizados com BYC de *B. microplus*. Oito bovinos estabulados receberam quatro inóculos (↑) de 100µg BYC com adjuvante Quil A e oito foram utilizados como controle, aos quais foi inoculado somente adjuvante. Quinze dias após, os bovinos foram desafiados com uma infestação (•) de 30.000 larvas de *B. microplus* em cada bovino. Após a infestação os animais foram mantidos em condições de campo por 8 meses. Os níveis de anticorpos declinaram gradualmente até o 11º mês do experimento, quando foi realizada uma nova inoculação de 100µg de BYC50. Após o inóculo de reforço (↑), foi observado que os anticorpos anti-BYC voltaram aos níveis anteriores, indicando a manutenção de memória imunológica. A densidade óptica (DO) indica a concentração de anticorpos específicos para BYC

Outra observação importante é o efeito de um anticorpo monoclonal anti-BYC. Quando inoculado na hemocele ("cavidade abdominal") de fêmeas ingurgitadas, o anticorpo reduz em até 52% a capacidade de postura dessas fêmeas, sugerindo que a adição desta proteína à vacina atualmente disponível poderia aumentar o grau de proteção. Este dado sugere que, se a proteção observada nos testes de vacinação for aumentada, por modificações na formulação da vacina e na apresentação dos antígenos para o sistema imunológico do bovino, este antígeno tem potencial de ser usado em uma futura vacina. (Da Silva Vaz et al., 1998), a semelhança do que foi realizado com a Bm86 (Rodríguez et al., 1994, De Rose et al., 1999).

Um último grupo de antígenos já caracterizados é formado por proteínas identificadas com o uso de anticorpos monoclonais. Utilizando o anticorpo monoclonal QU13, foi caracterizado um grupo de proteínas, com massas moleculares variando entre 30kDa e 200kDa, que induzem, em bovinos, uma resposta imune parcialmente protetora (Lee e Opdebeeck, 1991). Outro anticorpo monoclonal, o BrBm2, reconhece uma proteína de 27 kDa de intestino. Esta proteína ainda não foi testada em experimento de vacinação, mas seu potencial como candidata a compor uma vacina é referendado pelo fato de que a inoculação direta do anticorpo BrBm2 em fêmeas ingurgitadas causou uma redução de até 70% na ovoposição (Toro-Ortiz et al., 1997). Observe-se que este efeito não traz benefício imediato ao indivíduo vacinado mas

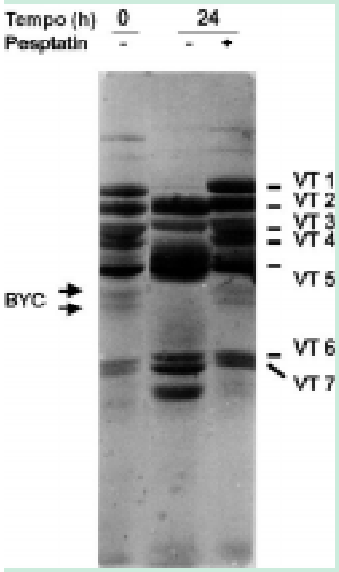


**Figura 3:** Atividade hidrolítica da BYC sobre a vitelogenina, *in vitro*.
Ovos de 1 dia foram macerados e incubados em tampão ácido para ativar a BYC e verificar sua participação no processamento da vitelogenina. O extrato de ovo foi incubado por 24 horas com BYC, na presença ou ausência de pepstatina (enzimas do tipo catepsinas). Após a incubação, os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida corado com azul brilhante de Coomassie. Os diferentes peptídeos de vitelogenina (VT) presentes no extrato de ovo são visíveis. Após 24 horas, é possível observar a redução da massa molecular dos peptídeos da vitelogenina após a incubação com a BYC (aumento da quantidade das formas de vitelogenina de menor tamanho, VT6 e VT7). O efeito foi abolido pela presença de pepstatina. Essa redução da massa molecular dos peptídeos da vitelogenina é semelhante à que se observa durante a embriogênese do carrapato

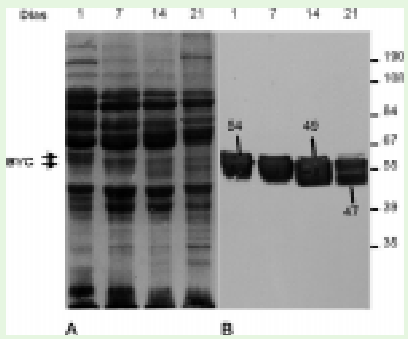


**Figura 4:** Processamento da BYC na embriogênese do carrapato.
Carrapatos foram mantidos em estufa a 28º C com 85% de umidade relativa do ar para realizarem a postura. Extratos protéicos foram obtidos por maceração de ovos (coletados 1, 7 e 14 dias após o inicio da postura) e larvas (coletadas após 21 dias do início da postura) e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida e por Western-blot, utilizando um anticorpo monoclonal anti-BYC.
O gel de poliacrilamida corado com Coomassie (painel A) mostra o grande número de proteínas presentes nos diferentes extratos. O Western blot (painel B) foi revelado com o anticorpo específico para BYC. Conforme indicado com as setas, é possível observar a redução da massa molecular da BYC durante a embriogênese. A massa molecular é reduzida gradativamente de 54 kDa (no início da embriogênese) a 47 kDa (no final da embriogênese). Esta observação, associada com os resultados dos experimentos *in vitro* de hidrólise do peptídeo sinal e ativação da enzima por incubação em tampão ácido indicam que a BYC sofre proteólise do peptídeo sinal durante o processo acidificação do ovo que ocorre na embriogênese. Este dado, junto com a atividade sobre vitelogenina (figura 3), sugere que ela tenha participação no processamento de proteínas do ovo para a produção de proteínas do embrião

leva a uma diminuição no nível de infestação do rebanho.

Todas as proteínas de *B. microplus* caracterizadas como imunógenos são glicoproteínas. Esta característica tem implicações cientificas e industriais. Os estudos e a própria produção de glicoproteínas recombinantes são mais complexos e caros do que de proteínas sem glicídios. No caso da Bm86, os dados indicam que a presença de glicídios não tem importância maior para induzir imunoproteção. Contrariamente, nos casos da Bm91 e da BMA7, os glicídios participam, ao menos parcialmente, na indução da resposta imunológica protetora. (McKenna, et al., 1998). Este aspecto é um bom exemplo dos vários aspectos que devem ser considerados no estudo destas vacinas.

Como as capacidades imunogênicas dos antígenos, de uma maneira geral, dependem do método de imunização utilizado, os trabalhos estão sendo dirigidos também para testes de novos métodos de inoculação. Um novo enfoque para aumentar a capacidade de indução de uma resposta imune protetora é o uso de vacinas de DNA. Neste tipo de vacina, o gene do antígeno de interesse, inserido em vetores de expressão (plasmídeos ou fagos), é inoculado no animal a ser imunizado. A produção das proteínas imunogênicas ocorre diretamente nas células transfectadas pelo DNA, induzindo a resposta imunológica. O gene da Bm86 foi testado como vacina de DNA (conjuntamente com a inoculação do gene da interleucina 1β) mas não foi eficaz na indução de uma proteção adequada. Apesar disto, a vacina de DNA foi capaz de induzir uma resposta imune primária com produção de memória imunológica, sugerindo que é possível melhorar a eficiência da vacina de DNA com o uso de outras interleucinas ou por modificações nas condições de inoculação (De Rose et al., 1999).

A identificação de diversas proteínas com potencial para serem utilizadas em vacinas contra o carrapato permite estimar que a atual vacina, que já é eficaz, torne-se mais eficaz com o acréscimo de novos imunógenos, uso de outros adjuvantes e de citocinas, que levem a alterações na forma de inoculação e apresentação dos imunógenos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ALVES, S.B. Controle Microbiano de Insetos, Editora Manole Ltda, 1986.

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

BROWN, P. Altruistic vaccine boosts hopes for halting malaria. New Scientist 130: 22-22, 1991.

DA SILVA VAZ JR., I.; LOGULLO, C. J.; SORGINE, M.; VELLOSO, F.F.; GONZALES, J.C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P. L. AND MASUDA, A. Immunization of bovines with a new protein isolated from egg of *Boophilus microplus*. Vet. Immunol. Immunopathol. 66: 331-341, 1998.

DE CASTRO, J.J and NEWSON, R.M. Host resistance in cattle tick control. Parasitol. 9: 13-17, 1993.

DE LA FUENTE, J.; RODRÍGUEZ, M.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; GARCÍA-GARCÍA, J.C.; MÉNDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDÉS, M.; ENRÍQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUÉ, O.; MACHADO, H. and LLEONART, R. Genetic Analysis: Biomolecular Engineering 15: 143-148, 1999.

DE ROSE, R.; McKENNA, R.; COBON, G.; TENNENT, J.; ZAKRZEWSKI, H.; GALE, K.; WOOD, P.R.; SCHEERLINCK, J.Y and WILLADSEN, P. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. Vet. Immunol. Immunopathol. 71: 151-160, 1999.

FRISCH, J.E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. Int. J. Parasitol. 29: 57-71, 1999.

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

**Tabela 1: Proteínas de *Boophilus microplus* já caracterizadas como antígenos vacinais.**

| Antígeno | Massa Molecular | Proteção induzida em bovinos imunizados | Localização no carrapato |
|---|---|---|---|
| Bm86 | 89.000 | 51-91%** (1) | intestino |
| Bm91 | 86.000 | 37%* | glândula salivar e intestino |
| BMA7 | 66.000 | 20%* | vários órgãos |
| BYC | 54.000 | 14-36%** | vários órgãos |
| QU13 | 30.000-200.000 | 62-99%* | intestino |
| BrBm2 | 27.500 | não testada | intestino |

(1) Experimentos realizados a campo.
* calculada pela redução do peso da postura de teleóginas.
** calculada pela interação entre redução do peso da teleógina, capacidade de postura e eclosão dos ovos


HORN, S. Ectoparasites of animals and their impact on the economy of South America. In: World Veterinary Congress, *Proceedings* 23 Montreal, 1987.

KASLOW DC, ISAACS SN, QUAKYI IA, GWADZ, R.W.; MOSS, B. and KEISTER, D.B. Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies by recombinant vaccinia virus. Science 252: 1310-1313, 1991.

KAY, B.H. and KEMP, D.H. Vaccines against arthropods. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50: 87-96, 1994.

LEE, R.P. and OPDEBEECK, J.P. Isolation of protective antigens from the gut of *Boophilus microplus* using monoclonal antibodies. Immunol. 72: 121-126, 1991.

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

McKENNA, R.V; RIDING, G.A.; JARMEY, J.M.; PEARSON, R.D. and WILLADSEN, P. Vaccination of cattle against the *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. Parasite Immunol. 20: 325-336, 1998.

MONTEIRO, A.C.; FIORIN, A.C. and CORREIA, A.C.B. Pathogenicity of isolates of *Metharhizium anisopliae* (mestch.) sorokin towards the cattle *Boophilus microplus* (can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. Revista de Microbiologia 29: 109-112.

MOUNT, G.A.; HAILE, D.G.; DAVEY, R.B. and COOKSEY, L.M. Computer simulation of *Boophilus* cattle tick (Acari:Ixodidae) population dynamics. J. Med. Entomol. 28:223-240, 1991.

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

RAND, K.N., MOORE, T., SRISKANTHA, A., SPRING, K., TELLAM, R., WILLADSEN, P. and COBON, G.S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 9657-9661, 1989.

RIDING, G.A., JARMEY, J., MAKENNA, R.V., PEARSON, R., COBON, G.S., WILLADSEN, P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. J. Immunology 153: 5158-5166, 1994.

RODRIGUEZ, M., MASSARD, C.L., FONSECA, A.H., RAMOS, N.F., MACHADO, H., LABARTA and DE LA FUENTE, J. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestation of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. Vaccine 13: 1804-1808, 1995.

RODRIGUEZ, M., RUBIERA. R., MANUEL, P., MONTESINOS, R., CREMATA, J., FALCON, V., SANCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOVÉS, C., VALDES, M., LLEONART, R., HERRERA, L. and DE LA FUENTE, J. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. J. Biotech. 33: 135-146, 1994

TORO-ORTIZ, R.D., DA SILVA VAZ JR., I., GONZALES, J.C. and MASUDA, A. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. Vet. Parasitol., 69: 297-306, 1997.

WILLADSEN, P and JONGEJAN, F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. Parasitology Today 15: 258-262, 1999.

WILLADSEN, P., RIDING, G.A., McKENNA, R.V., KEMP, D.H., TELLAM, R.L., NIELSEN, J.N., LAHNSTEIN, J. COBON, G.S. and GOUCH, J.M. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. J. Immunology 143: 1346-1351, 1989.

WILLADSEN, P. and KEMP, D.H. Vaccination with "concealed" antigens for tick control. Parasitology Today 4: 196-198, 1988.



**AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao CNPq-PADCT, à FAPERGS e à FINEP-PRONEX.