

**Recentes Descobertas de
Antígenos com Potencial
para a Imunização de
Bovinos contra Infestações
pelo Carrapato
*Rhipicephalus (Boophilus)
microplus***

ISSN 1982-5390

Janeiro, 2018

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sul
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 158

Recentes Descobertas de Antígenos com Potencial para a Imunização de Bovinos contra Infestações pelo Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

*Magda Vieira Benavides
Claudia Cristina Gulias Gomes
Emanuelle Baldo Gaspar*

Embrapa Pecuária Sul
Bagé, RS
2018

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sul

BR 153, Km 632,9 Caixa postal 242

96401-970 - Bagé – RS

Fax: 55 53 3240-4650

www.embrapa.br/pecuaria-sul

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Fernando Flores Cardoso*

Secretária-Executiva: *Márcia Cristina Teixeira da Silveira*

Membros: *Bruna Pena Sollero, Elisa Köhler Osmari, Estefanía Damboriarena, Fabiane Pinto Lamego, Graciela Olivella Oliveira, Jorge Luiz Sant'Anna dos Santos, Robert Domingues, Sérgio de Oliveira Juchem*

Suplentes: *Henry Gomes de Carvalho, Marcos Jun Iti Yokoo*

Supervisor editorial: *Lisiane Bassols Brisolara*

Revisor de texto: *Manuela Bergamim de Oliveira*

Normalização bibliográfica: *Graciela Olivella Oliveira*

Editoração eletrônica: *Murilo Gonçalves*

1ª edição

Publicação digitalizada (2018)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sul

Benavides, Magda Vieira

Recentes descobertas de antígenos com potencial para a imunização de bovinos contra infestações pelo carrapato

Rhipicephalus (Boophilus) microplus / Magda Vieira Benavides,

Claudia Cristina Gulias Gomes, Emanuelle Baldo Gaspar. – Bagé :

Embrapa Pecuária Sul, 2017.

PDF (28 p.) : 21 cm x 15 cm. – (Documentos / Embrapa Pecuária Sul, ISSN 1982-5390 ; 158)

1. Tristeza parasitária. 2. Vacina. 3. Bovino. 4. Carrapato. I. Gulias Gomes, Claudia Cristina. II. Gaspar, Emanuelle Baldo. III. Título. IV. Série.

CDD 636.0896936

© Embrapa, 2018

Autores

Magda Vieira Benavides

Zootecnista, PhD em Wool Science,
Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul, Bagé,
RS.

Claudia Cristina Gulias Gomes

Médica Veterinária, Pós-Doutora em Ecologia
Química de Artrópodes Vetores, Pesquisadora da
Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS.

Emanuelle Baldo Gaspar

Médica Veterinária, Pós-Doutora em Microbiologia
Médica, Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul,
Bagé, RS.

Apresentação

As publicações técnicas da Série Embrapa são importantes veículos de informação, destinada a produtores, técnicos, empresários do agronegócio, pesquisadores, estudantes e público em geral interessados nas tecnologias desenvolvidas pela Empresa e seus colaboradores. Trata-se de publicações com distintas características, objetivos e público alvo, tais como: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; Documentos; Circular Técnica; Comunicado Técnico; Sistemas de Produção; Livro e outros.

A Embrapa Pecuária Sul utiliza este veículo para comunicar suas tecnologias produzidas, recomendações, práticas agrícolas e resultados de pesquisa e desenvolvimento, direcionando ao público interessado informações ligadas à produção de forrageiras e pastagens, bovinocultura de corte e leite e ovinocultura dos campos sulbrasilieiros. É com satisfação que oferecemos mais esta obra, destacando recente trabalho desenvolvido pelo Centro da Embrapa, em Bagé, em benefício à sustentabilidade da pecuária sulina.

O presente documento trata de um dos maiores problemas de sanidade em bovinos do Estado do RS: o carrapato bovino e a Tristeza Parasitária Bovina (TPB). Entre os métodos atualmente empregados encontram-se as aplicações de carrapaticidas, realizadas em banheiros de imersão ou aspersão, por aplicação "pour-on", drogas injetáveis (lactonas macrocíclicas) e vacinas.

Entre os métodos atualmente empregados encontram-se as aplicações de carrapaticidas, realizadas em banheiros de imersão ou aspersão, por aplicação “pour-on”, drogas injetáveis (lactonas macrocíclicas) e vacinas.

Este trabalho revisa as novas alternativas de antígenos existentes para programas de imunização dos rebanhos, tanto para o carrapato como para a TPB, e discute possibilidades futuras de uso comercial.

Esperamos que os leitores desfrutem deste Documento e sugerimos que, em caso de maior interesse no tema abordado ou necessidades de esclarecimentos, realizem o contato com nosso setor de atendimento ao cliente (SAC)¹, ou pelo fone (53) 3240-4650. A Embrapa terá o máximo prazer em atendê-lo.

Alexandre Varella
Chefe-Geral

¹Disponível em: < www.embrapa.br/faleconosco/sac/ > .

Sumário

Introdução.....	08
Descoberta de métodos de controle contra o <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>.....	11
Redução da população de carrapatos utilizando técnicas reprodutivas.....	11
Descoberta de novos antígenos contra o <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	12
Voraxina.....	12
Subolesina.....	13
Outros antígenos para uso potencial em vacinas contra carrapatos.....	15
Serpina.....	15
Haa86 e 64P.....	16
Vitelina.....	17
Ferritina 2.....	17
Metaloproteases.....	18
Aquaporina.....	19
Discussão.....	20
Referências.....	24

Recentes Descobertas de Antígenos com Potencial para a Imunização de Bovinos contra Infestações pelo Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Magda Vieira Benavides
Claudia Cristina Gulias Gomes
Emanuelle Baldo Gaspar

Introdução

O carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, causa problemas de perda de peso em animais altamente infestados, além de redução na produção de leite e carne, depreciação do couro, ocorrência de miíases em decorrência das lesões de pele e também é responsável pela transmissão dos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e da riquetsia *Anaplasma marginale* aos bovinos.

O controle do carrapato dos bovinos tem sido feito historicamente por meio de aplicações de carrapaticidas, realizadas em banheiros de imersão ou aspersão, por aplicação “pour-on”, drogas injetáveis (lactonas macrocíclicas) e vacinas. O carrapato tem apresentado resistência a todas as drogas comercialmente utilizadas por produtores rurais e a demanda por métodos não-químicos para o controle do parasito é cada vez maior.

O primeiro trabalho a mostrar que o uso de imunização contra carrapatos era possível foi desenvolvido por Allen e Humphreys (1979) que, somado a outros, culminou no desenvolvimento e comercialização, na década de 90, de duas vacinas recombinantes: TickGard (WILLADSEN et al., 1995) e Gavac (DE LA FUENTE et al., 2007), ambas baseadas em um antígeno oculto, denominado Bm86 (do antigo nome científico do carrapato dos bovinos: *B. microplus*), que é uma proteína do intestino do carrapato. Estas vacinas foram desenvolvidas independentemente pelo *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation* (CSIRO) da Austrália e pelo Centro de Engenharia Genética y Biotecnologia de Cuba e foram registradas na Austrália e na América Latina, respectivamente, até 1997. Dentre os efeitos do antígeno sobre os carrapatos alimentados em animais vacinados estão a redução do peso de fêmeas ingurgitadas e a interferência na capacidade reprodutiva das fêmeas, causando redução no número de ovos. Conjuntamente, estes efeitos fazem com que haja uma redução da infestação por carrapatos no campo de forma gradual, afetando negativamente, a médio prazo, futuras gerações de carrapatos. Há relatos de que a combinação do uso da vacina Gavac com acaricidas mostrou sucesso no controle do carrapato, ao mesmo tempo que reduziu o uso de acaricidas em 2/3 e o número de surtos de babesiose e anaplasmose (DE LA FUENTE et al., 1998).

A Bm86 em bovinos também mostrou proteção contra *B. bigemina* quando bovinos imunizados com Bm86 foram infestados com carrapatos positivos para *B. bigemina*, no entanto não ofereceu proteção contra *B. bovis* após desafio com carrapatos infectados com este parasito (PIPANO et al., 2003).

Por outro lado, Bastos et al. (2010) observaram que o silenciamento¹ da Bm86, proteína que é normalmente expressa no intestino, larvas, ninfas e nos ovários de fêmeas parcialmente ingurgitadas, causava reduzida expressão desta proteína nos ovários de fêmeas de *R. (B.) microplus*, especialmente de teleóginas² infectadas com *B. bovis*.

A vacina australiana atingiu bons níveis de venda nos primeiros anos, no entanto, reestruturações de indústrias farmacêuticas que incluíram o fechamento da empresa que produzia vacina, fizeram com que esta não permanecesse no mercado. Duas reintroduções no mercado foram realizadas posteriormente e a vacina foi vendida para um público cada vez menor de produtores (DE LA FUENTE et al., 2007). Atualmente é comercializada via associação de produtores. Além dos problemas com companhias farmacêuticas, a redução do uso das vacinas também ocorreu devido a competição com acaricidas, falta de interesse de companhias comerciais e do uso incorreto de vacinas por falta de entendimento de como a vacina funcionava. Apesar da vacina conferir bons resultados de imunização, os efeitos desta não são imediatos. Não ocorre a queda instantânea dos carrapatos no animal, assim como ocorre no caso dos carrapaticidas, que têm efeito adulticida³. Assim, deveria haver um maior esclarecimento dos efeitos a longo prazo da vacina para os produtores rurais não desacreditarem dos efeitos da mesma.

Enquanto a maioria dos trabalhos científicos das décadas de 80 e 90 concentrou esforços no estudo de Bm86, atualmente avanços nas técnicas de biologia molecular e sequenciamento de patógenos têm auxiliado a gerar novas alternativas de antígenos que podem resultar no desenvolvimento de novas vacinas comerciais, ou vacinas com combinação de antígenos mais eficientes.

¹ Silenciamento de uma proteína: mecanismo por meio do qual a expressão de um gene (e consequentemente de uma proteína) é regulada negativamente.

² Teleóginas: fêmeas ingurgitadas de carrapato, fase do ciclo onde ocorre a queda do carrapato do animal e a postura de ovos.

³ Drogas com efeito adulticida matam os estágios adultos de um parasito.

Considerando que o Rio Grande do Sul está em uma região geográfica afetada por carrapatos e onde o problema da tristeza parasitária bovina (TPB) é uma constante devido à situação de instabilidade enzoótica para esta doença, este manuscrito se dedica a uma breve revisão de novas alternativas de antígenos, tanto para o carrapato como para a TPB, e discute possibilidades futuras de uso comercial.

Descoberta de métodos de controle contra o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Redução da população de carrapatos utilizando técnicas reprodutivas

Na década de 70, acreditava-se que vários eram os fatores que estavam ligados à reprodução dos carrapatos. Eram conhecidos diversos "fatores de acasalamento", presentes no líquido seminal (composto por secreções do testículo e de glândulas acessórias do carrapato), capazes de alterar a fisiologia do parasito. Desde 1972 é conhecida a existência de um mecanismo denominado "fator de ingurgitamento" (EF, do inglês *engorgement factor*) em carrapatos *Dermacentor variabilis*, produzido pelas gônadas masculinas e passado às fêmeas durante a cópula (PAPPAS; OLIVER, 1972). Para descartar a ligação do fator de acasalamento aos espermatozoides, estes autores expuseram machos a radiação gama, que esteriliza as espermátides, e logo alocaram fêmeas junto aos machos irradiados. As fêmeas acasaladas ingurgitaram e realizaram a oviposição de forma natural, no entanto nenhum dos ovos eclodiu, mostrando assim que a presença do fator de ingurgitamento ocorria de forma independente da presença de espermatozoides.

Além deste, foi reportada uma proteína chamada de "fator de capacitação espermática", produzida pela glândula acessória do macho que estimula a fase final da maturação do esperma após o espermatóforo ter sido transferido à fêmea (SHEPHERD et al., 1982) e ainda o "fator estimulante de vitelogenina" que causa a vitelogenese e a posterior oviposição (SAHLI et al., 1985). Assim, uma das primeiras formas de reduzir a população de carrapato foi estudar a reprodução dos parasitos.

Descoberta de novos antígenos contra o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Mais tarde, com os avanços das técnicas de biologia molecular, foi possível identificar genes super-regulados em tecidos reprodutivos do carrapato *Amblyomma hebraeum* (WEISS et al., 2002). A partir destes resultados foram geradas 28 proteínas recombinantes⁴, sendo que duas delas estimulavam o completo ingurgitamento de fêmeas virgens, a degeneração da glândula salivar e o desenvolvimento parcial do ovário. Estas foram denominadas voraxina- α e voraxina- β (WEISS; KAUFMANN, 2004).

Voraxina

Voraxinas são proteínas do testículo do carrapato *A. hebraeum* e que são transferidas para as fêmeas via cópula para estimular o ingurgitamento das fêmeas. Os estudos de imunização com esta proteína em coelhos mostraram que 74% das fêmeas não cresceram mais do que 10% do peso normal (WEISS; KAUFMAN, 2004), nas fêmeas alimentadas em animais vacinados. Os resultados mostram que houve uma redução de 72% no peso médio de carrapatos sobreviventes, comparado com a redução de 37% no peso de carrapatos desenvolvidos em bovinos imunizados com as vacinas comerciais (TELLAM et al., 1992).

⁴ Proteína recombinante: Proteínas produzidas por engenharia genética, em organismo que normalmente não produziria aquela determinada proteína.

Em 2009, foi caracterizada a voraxina- α do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus* (YAMADA et al., 2009) e estudos preliminares imunizando coelhos com voraxina- α em comparação ao controle apresentaram redução de 42,7% na massa corporal das teleóginas, decréscimo de 39% na taxa de oviposição, redução de 38,6% no número de teleóginas que produziram ovos e redução significativa no peso corporal das teleóginas ($85,1 \pm 15,9\text{mg}$ vs $193,4 \pm 31,1\text{mg}$ nos controles). Este estudo também mostrou que há um alto nível de similaridade das voraxinas- α entre várias espécies de carrapatos, incluindo *A. hebraeum* e *D. variabilis*.

Recentemente foi caracterizada a voraxina- α do *R. (B.) microplus* (KUMAR; GHOSH, 2016), abrindo frente para o estudo deste antígeno no controle desta espécie de ectoparasito.

Subolesina

A proteína 4D8, denominada posteriormente de subolesina (ALMAZÁN et al., 2003), foi estudada como potencial antígeno a ser usado em vacinas contra o carrapato *Ixodes scapularis*. Estudos de imunização com antígenos de *I. scapularis* em ovinos, realizados de forma separada (4D8 e 4F8), e em combinação de antígenos (4D8, 4F8 e 4E6), mostraram que a redução do número de carrapatos foi de 58%, 12% e 16%, comparado ao grupo controle, imunizado com soro-albumina bovina (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*). A oviposição foi reduzida em 46%, 22% e 26% e a eficácia da vacina foi de 71%, 33% e 58% (ALMAZÁN et al., 2005), respectivamente. Estes resultados foram similares aos encontrados para os antígenos Bm86 e Bm95⁵ contra infestações por *Boophilus* (DE LA FUENTE; KOCAN, 2003).

Utilizando técnicas para a diminuição da expressão de genes para identificar sua função ou seu efeito em rotas metabólicas, foi possível observar que a subolesina causava uma incapacidade das fêmeas em atingir taxas normais de repleção e de oviposição (DE LA FUENTE et al., 2005, 2006).

⁵ Bm95: outro gene isolado do *B. microplus* (isolado A) (GARCÍA; GARCÍA et al., 2000) que foi usado como vacina

A subolesina é bem conservada entre espécies de carrapato, o que faz com que esta proteína possa ser replicada, independentemente da espécie de carrapato.

Estudos posteriores mostraram que o silenciamento da subolesina causava problemas no desenvolvimento reprodutivo de machos e fêmeas de carrapato *D. variabilis* (DE LA FUENTE et al., 2006), fazendo com que os machos não produzissem esperma maduro e as fêmeas não produzissem ovos viáveis. O número de fêmeas tratadas e acasaladas com machos também tratados para silenciar a subolesina, que ingurgitaram, foi significativamente menor comparado àquelas que não receberam o tratamento (2 vs 47)⁶. Ainda, o peso das fêmeas ingurgitadas foi menor (100mg/carrapato vs 500)⁶, a oviposição foi prejudicada (55mg ovos/carrapato vs 250)⁶, os ovos produzidos não eclodiram (0mg larvas/mg de ovos vs 0,4)⁶ e a mortalidade das fêmeas tratadas foi de 78% vs 6%.

Com relação aos agentes causadores da tristeza parasitária bovina, De la Fuente et al. (2006) estudaram carrapatos *D. variabilis* silenciados para subolesina e posteriormente infectados com *Anaplasma phagocytophilum* e mostraram degeneração no intestino e nas glândulas salivares. Ainda foi observado que a infecção por *A. phagocytophilum* foi 11 vezes mais alta nos carrapatos controle, com injeção de solução salina, comparados aos que receberam silenciamento de subolesina. Não houve diferença significativa da presença do *A. phagocytophilum*, somente na sua expressão nos intestinos dos carrapatos.

Em uma segunda fase do experimento, ninfas oriundas de camundongos imunizados contra subolesina, infestados com carrapato *I. scapularis* e experimentalmente infectados com *A. phagocytophilum* (sub + /Ap +) tiveram uma menor porcentagem de reações positivas para o hemoparasito quando comparadas com ninfas oriundas do tratamento sub- /Ap + (10% vs 40%) (DE LA FUENTE et al., 2006).

⁶ Resultados estimados de Figura (DE LA FUENTE et al., 2006)

A imunização de bovinos contra subolesina e o silenciamento da expressão desta proteína (efeito de *knockdown*) em larvas de *R. (B.) microplus* alimentadas em animais infectados com *A. marginale* e *B. bigemina* foi estudada por Merino et al. (2011). Estes autores observaram uma redução de 98% e 99%, respectivamente, de *A. marginale* e *B. bigemina*, quando carrapatos infestavam bovinos vacinados e de 97% e 99%, respectivamente, após intervenções por silenciamento da proteína. Os autores justificam que estes resultados se devem ao efeito da subolesina no tecido intestinal e das glândulas salivares e concomitante efeito negativo na infecção pelos *A. marginale* e *B. bigemina* no carrapato, reduzindo assim a habilidade do carrapato, primeiro, em produzir progênie viáveis e, segundo, em transmitir hemoparasitos aos hospedeiros.

Cabe aqui esclarecer que o uso da subolesina pode ser abordado de duas formas: como imunização de animais contra este antígeno ou *knockdown* desta proteína por meio da tecnologia de RNAi para tratamento de carrapatos. Como os parasitos precisam ser tratados individualmente para que a expressão da proteína seja reduzida por meio da técnica de RNAi, o uso do silenciamento de subolesina foi desenhado para programas de esterilização de machos e a liberação destes com a finalidade de controle populacional, a exemplo do que é realizado em programas de controle das populações da mosca da bicheira *Cochliomyia hominivorax* no México (KOUBA, 2003).

Outros antígenos para uso potencial em vacinas contra carrapatos

Serpina

A serpina, ou HLS2, é um inibidor de serino-protease descoberto na hemolinfa do carrapato *Haemaphysalis longicornis* e há evidências de que esta proteína esteja relacionada com tempo de coagulação e inibição da atividade da trombina. Coelho imunizados com HLS2 recombinante se mostraram mais protegidos contra a infestação por carrapatos, resultando em mortalidades de 44,6 e 43% em estádios de ninfa e adulto, respectivamente.

A porcentagem de oviposição foi de 42,8 e 15,7% em carrapatos alimentados em coelhos imunizados com HLS2 recombinante e controles (IMAMURA et al., 2005). Estes resultados corroboram aqueles de Andreotti et al. (2002) e Sugino et al. (2003) que trabalharam com outras proteínas relacionadas às serpinas (BmTI e HLS1, respectivamente) e que mostraram-se antígenos promissores para o controle do carrapato.

Haa86 e 64P

A proteína homóloga do Bm86 do *R. (B.) microplus* foi clonada e expressa para o carrapato *Hyalomma anatolicum anatolicum*, produzindo assim a Haa86. A forma recombinante foi utilizada para imunizar bovinos cruza *Bos taurus* x *Bos indicus* de 10-12 meses de idade. Após um desafio de 120 horas, esta proteína mostrou que 26% dos carrapatos eram ainda capazes de se alimentar nos animais imunizados. Resultados adicionais mostraram que fêmeas que se alimentavam em terneiros imunizados contra Haa86 recombinante tiveram uma redução de 49,6 mg no peso corporal e uma redução de 68,1 mg na massa de ovos, mostrando que este antígeno tinha potencial como vacina contra carrapatos (AZHAHANAMBI et al., 2009).

A proteína 64P é secretada no cimento⁷, que atua na apreensão do carrapato ao corpo do hospedeiro e que é produzida pelas glândulas salivares do carrapato *R. appendiculatus*. Foram desenhados seis peptídeos truncados contendo sequências parciais da proteína para avaliação individual destes peptídeos. Estes foram capazes de induzir resposta em animais imunizados (TRIMNELL et al., 2005) em várias espécies de hospedeiros desafiados com ampla variedade de carrapatos para testar a especificidade cruzada contra extratos de *Rhipicephalus sanguineus*, *I. ricinus*, *Amblyomma variegatum* e *R. (B.) microplus* por meio de *immunoblotting*.

⁷ Cimento: Substância que permite a fixação do carrapato na pele do hospedeiro, ao mesmo tempo que previne que o sistema imune do hospedeiro ataque o parasito durante sua alimentação.

As taxas de mortalidade do carrapato *R. sanguineus* foram mais altas para carrapatos alimentados em animais imunizados com 64TRP vs. controle imunizado ($p < 0,021$). Os porquinhos-da-Índia apresentaram respostas inflamatórias no local da inoculação do antígeno e no local da picada. Os resultados para os coelhos imunizados mostraram altas titulações de anticorpos, demonstrando uma reação imune do hospedeiro, exceto para uma das proteínas recombinantes (64TRP2). A hipótese é que o complexo anticorpo-antígeno no intestino do carrapato *R. sanguineus* alimentado em animais imunizados produz dano ao tecido, afetando a viabilidade dos carrapatos. No entanto, em outro trabalho, Trimnell et al. (2002) observaram que as proteínas 64TRP1 e 64TRP4 falharam em imunizar contra *R. appendiculatus*.

Vitelina

A vitelina é a proteína mais importante encontrada no ovo do carrapato. Acredita-se que ela seja sintetizada em fêmeas ingurgitadas com o objetivo de auxiliar no desenvolvimento do embrião (KUNKEL; NORDIN, 1985). Com o isolamento da vitelina do *R. (B.) microplus* foi possível realizar duas imunizações em ovinos (com quatro semanas de intervalo) e desafio com fêmeas adultas de *Boophilus*. Os resultados mostraram que a porcentagem de fêmeas ingurgitadas reduziu significativamente de 72% no controle para 42% em animais imunizados, a média de peso das fêmeas ingurgitadas de 246mg para 194mg e a conversão da massa de ovos produzidos por fêmeas ingurgitadas de 0,59 para 0,43 (TELLAM et al., 2002), conferindo uma eficácia de 68%.

Ferritina 2

O carrapato ingere grandes quantidades de ferro (Fe) do sangue dos hospedeiros enquanto infesta os mesmos e as ferritinas ajudam no armazenamento de Fe no organismo do carrapato (HAJDUSEK et al., 2009). A ferritina 2 foi testada como antígeno contra o *Ixodes ricinus* (IrfER2), em coelhos, e contra o *R. (B.) microplus* (RmFER2), em bovinos (HAJDUSEK et al., 2010).

Nestes últimos animais, a Bm86, antígeno já conhecido, foi usado como controle interno. As doses foram administradas três vezes nas semanas 1, 3 e 6 nos coelhos e 1, 4 e 6 nos bovinos, na concentração de 100µg/dose. Os coelhos foram desafiados com 25 pares de carrapatos *I. ricinus* (machos e fêmeas) e os bovinos com 10.000 larvas de *R. (B.) microplus* e de carrapato *Rhipicephalus annulatus*, em locais separados do corpo.

Os resultados mostraram que houve redução de 43% na infestação de coelhos imunizados com IrFER2. Houve ainda 31% de redução no peso nas fêmeas ingurgitadas, 71% menor oviposição e 85% menor fertilidade comparado aos controles, e uma eficácia calculada de 98% para este antígeno. A imunização dos bovinos contra RmFER2 promoveu a produção de anticorpos e houve uma redução nas infestações de *R. (B.) microplus* e de *R. annulatus* de 30% e 42%, de peso de teleóginas de 12% e 4%, de taxa de ovulação de 14% e 1%, e de fertilidade de 40% e 51%, respectivamente. Posteriormente, os resultados mostraram eficácias da imunização com RmFER2 de 64% e da Bm86 de 60% contra *R. (B.) microplus* e de 72% e 100%, respectivamente, para *R. annulatus*.

Metaloproteases

Metaloproteases putativas da família das reprotolisinas foram caracterizadas no carrapato *I. scapularis* e mostraram importante atividade anticoagulante da saliva do carrapato (FRANCISCHETTI et al., 2003). Estas proteínas produzidas na saliva do carrapato podem ser importantes candidatas para o desenvolvimento de vacinas contra estes parasitas.

Uma proteína reprotolisina de *R. (B.) microplus*, denominada de BrRmMP4 foi expressa, purificada, produzida como recombinante e utilizada na imunização de bovinos (ALI et al., 2015). Quatro doses da proteína recombinante BrRm-MP4 (rBrRm-MP4) foram usadas com 15 dias de intervalo para imunizar bovinos em idades de sobreano. Estes foram desafiados 10 dias após a última dose com 20.000 larvas de *R. (B.) microplus*.

Como resultado, foram observados altos níveis de anticorpos contra rBrRm-MP4 após a quarta imunização até o final do monitoramento, aos 100 dias. A presença de anticorpos foi correlacionada com a redução do número de carrapatos ($R^2 = 0,60$). A imunização reduziu o número de carrapatos em 42,9%, a eclodibilidade em 14,8%, a postura em 17,5%, atingindo uma proteção de 60% contra infestações por carrapato (ALI et al., 2015).

Estes resultados corroboram com os obtidos por Imamura et al. (2009) que encontraram aumento da taxa de mortalidade em ninfas (15,6%) e adultos (14,6%) de *H. longicornis* em coelhos imunizados. Imunizações contra metaloproteases de *I. ricinus* reduziram o peso vivo de fêmeas ingurgitadas (126,7mg vs 269,6 para os controles) e as taxas de oviposição (48% vs 86,6% nos controles) deste ectoparasito em coelhos imunizados, no entanto, não reduziram a taxa de sobrevivência ou o tempo de alimentação dos carrapatos (DECREM et al., 2008).

Aquaporina

Estudos do transcriptoma⁸ do intestino do *R. (B.) microplus* indicaram proteínas denominadas de aquaporinas como potencial candidato a antígeno vacinal. A aquaporina (AQP) atua no metabolismo da regulação osmótica e dele fazem parte proteínas do canal de condutores de água. Estas atuam na redução do volume de sangue do hospedeiro no intestino dos carrapatos, haja vista que os carrapatos ingerem grandes quantidades de sangue enquanto se alimentam, sendo que a água é transportada para a saliva, a qual é injetada de volta nos hospedeiros (GUERRERO et al., 2014).

O uso da aquaporina de *R. (B.) microplus*, RmAQP1, como vacina foi testado por Guerrero et al. (2014). Bovinos com idade entre 1 e 2 anos receberam 100µg da proteína recombinante, em três doses com intervalos de duas semanas, e foram desafiados com 15.000 larvas de *R. (B.) microplus* (3 doses de 5.000), 21 dias após a imunização.

⁸ Transcriptoma: Conjunto total de genes (e proteínas) produzido por determinado organismo em determinado tecido.

Foram realizados dois testes, e os níveis de eficiência foram de 75% e 68%, respectivamente, ou seja, com potencial uso como candidato para vacina contra carrapato.

Outra aquaporina, a RmAQP2, foi silenciada em carrapatos *R. (B.) microplus* e estes infestaram bovinos jovens infectados (ou não) com *B. bovis*. Os resultados mostraram que a eclodibilidade foi de 50% no grupo que se alimentava em bovinos infectados com *B. bovis* vs 81,2% no grupo que se alimentava em bovinos livres de *B. bovis*. Os níveis de eclodibilidade de cada um dos controles, com AQP não silenciada, foi de 90,2% e 97,7%, respectivamente (HUSSEIN et al., 2015). Mais impressionante foi a porcentagem de sobrevivência das larvas dos carrapatos com AQP silenciada e se alimentando em bovinos infectados por *B. bovis* (0%) contra os demais grupos (100%). O peso de fêmeas ingurgitadas foi maior nos grupos com RmAQP2 vs controles. Os autores sugerem que parasitos com AQP silenciada possam reter mais líquidos.

Discussão

Os resultados apresentados na secção anterior mostram que vários dos antígenos testados possuem tanto potencial para vacinas quanto o Bm86, anteriormente usado em vacinas comerciais, inclusive testados no Brasil (GUERRERO et al., 2014). No entanto, uma forma de otimizar resultados seria unir esforços para o desenvolvimento de uma vacina multiantigênica, capaz de aumentar a eficácia de antígenos individuais (DE LA FUENTE; CONTRERAS, 2015; WILLADSEN, 2008). Os últimos autores ainda sugerem o uso de vacinas com novos adjuvantes ou de metodologias que usam técnicas de silenciamento para reduzir o número de carrapatos da mesma forma como acontece com o uso de acaricidas.

Em termos gerais, a redução do número de fêmeas ingurgitadas em animais imunizados após o desafio é de aproximadamente 50% com a vacina comercial de 100 μ g de Bm86. O efeito combinado no aumento da mortalidade e de redução da fertilidade das fêmeas é capaz de reduzir o número de larvas no campo em até 90% (SCHETTERS et al., 2016).

O propósito mais amplo de uma vacina contra carrapatos seria combater o artrópode e também a transmissão dos agentes da tristeza parasitária bovina. No entanto, isto talvez tenha que ser obtido combinando antígenos contra carrapato e contra *Babesia* spp. e *A. marginale* em uma mesma vacina. Almazán et al. (2012) testaram antígenos de *R. microplus* e de *major surface protein-1* (MSP-1) de *A. marginale*. Foram testadas as seguintes proteínas: Bm95-MSP-1; Subolesina (Sub)-MSP1; elongation fator 1a (EF1a)-MSP-1 e ubiquitina (UBN)-MSP-1. Apenas o efeito contra o carrapato foi verificado. Sub-MSP-1 e Bm95-MSP-1 foram protetivas, com eficácias de 64 a 81%. Apesar de o efeito protetor contra *A. marginale* não ter sido testado, o estudo mostrou ser possível o uso de proteínas recombinantes químéricas, provenientes de organismos filogeneticamente distintos, tais como *R. (B.) microplus* e *A. marginale*, sem que a eficácia vacinal contra o carrapato seja afetada, pois os autores demonstraram, pelo menos para Bm95-MSP-1, índices de proteção similares à Bm95 pura. Adicionalmente, como observado no tópico acima, vários autores têm demonstrado que a imunização contra antígenos de carrapato tem efeito não só sobre a biologia/reprodução do artrópode, mas também em sua capacidade de se tornar infectado com *Babesia* spp. e *A. marginale*. O ideal seria que uma vacina protegesse os bovinos contra o carrapato, mas também os imunizasse contra os agentes da TPB, no intuito de evitar populações imunizadas contra o carrapato, mas sensíveis contra os hemoparasitos.

As recentes descobertas de antígenos têm gerado resultados promissores, no entanto alguns não foram capazes de conferir proteção a animais vacinados.

Por exemplo, a 5'-nucleotidase, enzima localizada, principalmente, nos túbulos de Malpighi do carrapato *R. (B.) microplus*, que foi clonada e expressa na forma recombinante em *Escherichia coli*, foi testada em bovinos e ovinos (HOPE et al., 2010). Embora os ovinos não tenham problema com carrapato, estes animais foram usados como modelos experimentais, mais econômicos do que testar com bovinos. Os grupos foram separados e vacinados com enzima recombinante, com Bm86 e controle, e depois testados após desafio com infestação de carrapatos. A enzima 5'-nucleotidase conferiu proteção em ovinos, ainda que menor do que o encontrado com Bm86. No entanto, os resultados da 5'-nucleotidase não conferiram proteção em bovinos, o que mostra que, pelo menos neste estudo, ovinos não foram um bom modelo para testar vacinas contra carrapato dos bovinos.

O parâmetro comparativo tem sido os resultados da Bm86 testadas como vacinas contra carrapato, no entanto nem todos os trabalhos provêm todas as características necessárias para uma profunda comparação de resultados. Além disso, a maioria dos experimentos acima descritos foram testados em um número reduzido de hospedeiros, uma vez que o custo com o animal experimental, o bovino, é alto, e vários modelos de hospedeiro têm sido usados. O baixo número experimental da maioria dos trabalhos (3-6 animais por grupo de comparação) causa preocupação, e certamente limita as análises estatísticas daqueles experimentos que mostrem alta variabilidade de resultados.

Em se tratando de antígenos com potencial de vacina, cabe conferir se estes foram patenteados pelos grupos de pesquisa que as descobriram, sob pena de infringir direitos de desenvolvimento de produtos a serem comercializados no futuro. Dos antígenos com potencial de vacina, citamos a subolesina e a voraxina. O gene da subolesina foi patentado, portanto futuros estudos com esta proteína estão limitados. O mesmo é válido para a aquaporina (GUERRERO et al., 2014) e Bm86 com subolesina (INTERVET, 2014).

Embora muitos destes antígenos sejam promissores, muitas vezes a eficiência vacinal gira em torno dos 40-60%. Para o produtor, este valor pode parecer insuficiente. Porém, conforme demonstrado, muitos dos antígenos agem não só diretamente no carrapato que se alimenta no animal vacinado, mas também na eficiência reprodutiva da espécie, o que a médio/longo prazo contribui para a redução dos níveis de infestação das pastagens.

Outro aspecto prático que deve ser levado em conta é a velocidade de ação do produto. Ao contrário do que ocorre com os acaricidas que agem imediatamente, vacinas contra carrapatos estimulam o sistema imunológico a produzir anticorpos que terão efeito nos carrapatos que se alimentarem nos animais vacinados. Este processo leva ao menos uma a duas semanas para ocorrer e, conforme mencionado, parte do resultado vacinal é efeito reprodutivo nos carrapatos. Como os ovos levam cerca de 21 dias para eclodir, o esperado é que o efeito visível da vacina leve pelo menos um mês para começar a ser observado. Assim, veterinários de campo devem pensar em programas combinados de controle ao carrapato e a vacina contra carrapatos entra como apenas mais uma ferramenta, sem se descartar o uso de produtos químicos, nem tampouco das importantíssimas ferramentas de manejo no combate ao carrapato.

Citamos como exemplos os tratamentos estratégicos de carrapaticidas no início da primavera em campos muito infestados por carrapatos ou em épocas de invernos amenos, ou, inversamente, de aguardar o aparecimento dos carrapatos em propriedades com baixa infestação de carrapatos para a aplicação do carrapaticida ou, ainda, pelo menos uma vez por ano, enviar teleóginas para o laboratório para realizar o teste de biocarrapaticidograma. Aliar a possibilidade de uma mesma vacina imunizar contra os agentes da tristeza parasitária bovina, ao mesmo tempo que imuniza contra carrapatos, será, não somente necessária, mas altamente vantajosa para as criações de gado em áreas onde ocorrem problemas recorrentes de carrapato, *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp.

Referências

ALI, A.; PARIZI, L. F.; GUIZZO, M. G.; TIRLONI, L.; SEIXAS, A.; DA SILVA VAZ JR, I.; TERMIGNONI, C. Immunoprotective potential of a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* metalloprotease. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 1, p. 107-114, Jan. 2015.

ALLEN, J. R.; HUMPHREYS, S. J. Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. **Nature**, v. 280, n. 5722, p. 491-493, Aug. 1979.

ALMAZÁN, C.; KOCAN, K. M.; BERGMAN, D. K.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; DE LA FUENTE, J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. **Vaccine**, v. 21, n. 13-14, p. 1492-1501, Mar. 2003.

ALMAZÁN, C.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; DE LA FUENTE, J. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. **Vaccine**, v. 23, n. 46-47, p. 5294-5298, Nov. 2005.

ALMAZÁN, C.; MORENO-CANTÚ, O.; MORENO-CID, J. A.; GALINDO, R. C.; CANALES, M.; VILLAR, M.; DE LA FUENTE, J. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 265-272, Jan. 2012.

ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K. C.; SASAKI, S. D.; SAMPAIO, C. A. M.; TANAKA, A. S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 4, p. 557-563, Mar. 2002.

- AZHAHIANAMBI, P.; DE LA FUENTE, J.; SURYANARAYANA, V. V. S.; GHOSH, S. Cloning, expression and immunoprotective efficacy of rHaa86, the homologue of the Bm86 tick vaccine antigen, from *Hyalomma anatolicum anatolicum*. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 3, p. 111-122, Mar. 2009.
- BASTOS, R. G.; UETI, M. W.; KNOWLES, D. P.; SCOLES, G. A. The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute *Babesia bovis* infection. **Parasites & Vectors**, v. 3, Nov. 2010. Article 111.
- DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; BLOUIN, E. F.; NARANJO, V.; KOCAN, K. M. Reduction of tick infections with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* by targeting the tick protective antigen subolesin. **Parasitology Research**, v. 100, n. 1, p. 85-91, Dec. 2006.
- DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; BLOUIN, E. F.; NARANJO, V.; KOCAN, K. M. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. **Parasitology Research**, v. 96, n. 3, p. 137-141, June 2005.
- DE LA FUENTE, J.; ALMAZÁN, C.; CANALES, M.; PÉREZ DE LA LASTRA, J. M.; KOCAN, K. M.; WILLADSEN, P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 1, p. 23-28, June 2007.
- DE LA FUENTE, J.; CONTRERAS, M. Tick vaccines: current status and future directions. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 10, p. 1367-1376, Aug. 2015.
- DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. **Expert Review of Vaccines**, v. 2, n. 4, p. 583-594, Aug. 2003.
- DE LA FUENTE, J.; RODRÍGUEZ, M.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; GARCÍA-GARCÍA, J.; MÉNDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDÉS, M.; ENRIQUEZ, A.; CANALES, M. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac™ against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 16, n. 4, p. 366-373, Feb. 1998.
- DECREM, Y.; MARILLER, M.; LAHAYE, K.; BLASIOLI, V.; BEAUFAYS, J.; BOUDJELTIA, K. Z.; VANHAEVERBEEK, M.; CÉRUTTI, M.; BROSSARD, M.; VANHAMME, L. The impact of gene knock-down and vaccination against salivary metalloproteases on blood feeding and egg laying by *Ixodes ricinus*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 549-560, Apr. 2008.
- FRANCISCHETTI, I. M. B.; MATHER, T. N.; RIBEIRO, J. M. C. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, n. 4, p. 869-875, June 2003.

GARCÍA-GARCÍA, J. C.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; VARGAS, M.; CANALES, M.; BOUE, O.; RODRIGUEZ, M.; JOGLAR, M.; MACHADO, H.; GONZÁLEZ, I. L.; VALDÉS, M. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 18, n. 21, p. 2275-2287, Apr. 2000.

GUERRERO, F. D.; ANDREOTTI, R.; BENDELE, K. G.; CUNHA, R. C.; MILLER, R. J.; YEATER, K.; DE LEÓN, A. A. P. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. **Parasites & Vectors**, v. 7, Oct. 2014. Article 475.

HAJDUSEK, O.; ALMAZÁN, C.; LOOSOVA, G.; VILLAR, M.; CANALES, M.; GRUBHOFFER, L.; KOPACEK, P.; DE LA FUENTE, J. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. **Vaccine**, v. 28, n. 17, p. 2993-2998, Apr. 2010.

HAJDUSEK, O.; SOJKA, D.; KOPACEK, P.; BURESOVA, V.; FRANTA, Z.; SAUMAN, I.; WINZERLING, J.; GRUBHOFFER, L. Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 4, p. 1033-1038, Jan. 2009.

HOPE, M.; JIANG, X.; GOUGH, J.; CADOGAN, L.; JOSH, P.; JONSSON, N.; WILLADSEN, P. Experimental vaccination of sheep and cattle against tick infestation using recombinant 5'-nucleotidase. **Parasite Immunology**, v. 32, n. 2, p. 135-142, Feb. 2010.

HUSSEIN, H. E.; SCOLES, G. A.; UETI, M. W.; SUAREZ, C. E.; ADHAM, F. K.; GUERRERO, F. D.; BASTOS, R. G. Targeted silencing of the Aquaporin 2 gene of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* reduces tick fitness. **Parasites & Vectors**, v. 8, Dec. 2, 2015. Article 618.

IMAMURA, S.; SILVA VAZ, I. da; KONNAI, S.; YAMADA, S.; NAKAJIMA, C.; ONUMA, M.; OHASHI, K. Effect of vaccination with a recombinant metalloprotease from *Haemaphysalis longicornis*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 48, n. 4, p. 345-358, Aug. 2009.

IMAMURA, S.; JUNIOR, I. D. S. V.; SUGINO, M.; OHASHI, K.; ONUMA, M. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. **Vaccine**, v. 23, n. 10, p. 1301-1311, Jan. 2005.

INTERVET. Theodorus Petrus Maria Schettters; Theodorus Jansen. **Vaccine against *Rhipicephalus* ticks**. Int. A61P33/14. U.S. 9579369 B2. 28 mar. 2014.

- KOUBA, V. History of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) eradication in the Eastern Hemisphere. **Historia Medicinae Veterinariae**, v. 29, n. 2, p. 43-53, Jan. 2003.
- KUMAR, B.; GHOSH, S. Cloning and molecular analysis of voraxin- α gene of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 1, p. 184-188, Mar. 2016.
- KUNKEL, J. G.; NORDIN, J. H. Yolk proteins. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon, 1985. v. 1, p. 83-111.
- MERINO, O.; ALMAZÁN, C.; CANALES, M.; VILLAR, M.; MORENO-CID, J. A.; GALINDO, R. C.; DE LA FUENTE, J. Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. **Vaccine**, v. 29, n. 47, p. 8575-8579, Nov. 2011.
- PAPPAS, P. J.; OLIVER, J. H. Reproduction in ticks (Acari: Ixodoidea) 2. Analysis of the stimulus for rapid and complete feeding of female *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Medical Entomology**, v. 9, n. 1, p. 47-50, Mar. 1972.
- PIPANO, E.; ALEKCEEV, E.; GALKER, F.; FISH, L.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Immunity against *Boophilus annulatus* induced by the Bm86 (Tick-GARD) vaccine. **Experimental and Applied Acarology**, v. 29, n. 1, p. 141-149, Jan. 2003.
- SAHLI, R.; GERMOND, J. E.; DIEHL, P. A. *Ornithodoros moubata*: spermateleosis and secretory activity of the sperm. **Experimental Parasitology**, v. 60, n. 3, p. 383-395, Dec. 1985.
- SCHETTERS, T.; BISHOP, R.; CRAMPTON, M.; KOPÁ EK, P.; LEW-TABOR, A.; MARITZ-OLIVIER, C.; MILLER, R.; MOSQUEDA, J.; PATARROYO, J.; RODRIGUEZ-VALLE, M. Cattle tick vaccine researchers join forces in CATVAC. **Parasites & Vectors**, v. 9, Feb. 2016. Article 105.
- SHEPHERD, J.; OLIVER JUNIOR, J. H.; HALL, J. D. A polypeptide from male accessory glands which triggers maturation of tick spermatozoa. **International Journal of Invertebrate Reproduction**, v. 5, n. 3, p. 129-137, 1982.
- SUGINO, M.; IMAMURA, S.; MULENGA, A.; NAKAJIMA, M.; TSUDA, A.; OHASHI, K.; ONUMA, M. A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. **Vaccine**, v. 21, n. 21-22, p. 2844-2851, June 2003.
- TELLAM, R. L.; KEMP, D.; RIDING, G.; BRISCOE, S.; SMITH, D.; SHARP, P.; IRVING, D.; WILLADSEN, P. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 1-2, p. 141-156, Jan. 2002.

- TELLAM, R. L.; SMITH, D.; KEMP, D. H.; WILLADSEN, P. Vaccination against ticks. In: YONG, W. (Ed.). **Animal parasite control utilizing biotechnology**. Boca Ratón: CRC, 1992. p. 303-331.
- TRIMNELL, A. R.; DAVIES, G. M.; LISSINA, O.; HAILS, R. S.; NUTTALL, P. A. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. **Vaccine**, v. 23, n. 34, p. 4329-4341, July 2005.
- TRIMNELL, A. R.; HAILS, R. S.; NUTTALL, P. A. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. **Vaccine**, v. 20, n. 29-30, 3560-3568, Oct. 2002.
- WEISS, B. L.; KAUFMAN, W. R. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 16, p. 5874-5879, Apr. 2004.
- WEISS, B. L.; STEP CZYNSKI, J. M.; WONG, P.; KAUFMAN, W. R. Identification and characterization of genes differentially expressed in the testis/vas deferens of the fed male tick, *Amblyomma hebraeum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 7, p. 785-793, July 2002.
- WILLADSEN, P. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 164-167, Apr. 2008.
- WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G. S.; HUNGERFORD, J. Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v. 110, p. S43-S50, 1995. Supplement.
- YAMADA, S.; KONNAI, S.; IMAMURA, S.; ITO, T.; ONUMA, M.; OHASHI, K. Cloning and characterization of *Rhipicephalus appendiculatus* voraxin- α and its effect as anti-tick vaccine. **Vaccine**, v. 27, n. 43, p. 5989-5997, Oct. 2009.

Embrapa

Pecuária Sul

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**



CGPE 14145