

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO DA  
AQUAPORINA DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*  
CONTRA O CARRAPATO *Rhipicephalus sanguineus* SENSU  
LATO EM CÃES DOMÉSTICOS**

**Patricia Martinez Évora**

Médica Veterinária

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO DA  
AQUAPORINA DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*  
CONTRA O CARRAPATO *Rhipicephalus sanguineus* SENSU  
LATO EM CÃES DOMÉSTICOS**

**Patricia Martinez Évora**

**Orientador: Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de doutora em Medicina Veterinária – Área de concentração em Patologia Animal.

**2017**

E93a Évora, Patricia Martinez  
Avaliação do potencial imunogênico da aquaporina de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* contra o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato em cães domésticos / Patricia Martinez Évora.  
-- Jaboticabal, 2017  
xx, 96 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Gervásio Henrique Bechara

Banca examinadora: Gilson Pereira de Oliveira, Gustavo Seron Sanches, Beatriz Rossetti Ferreira, Maria Izabel Camargo Mathias  
Bibliografia

1. *Rhipicephalus sanguineus*. 2. Cão doméstico. 3. Aquaporina. 4. Imunidade. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

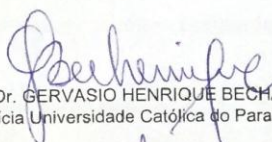
CDU 619:616.995.42:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
- Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

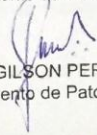
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

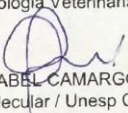
TÍTULO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO DA AQUAPORINA DE  
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* CONTRA O CARRA  
PATO *Rhipicephalus sanguineus* SENSU LATO EM CÃES DOMÉSTICOS  
AUTORA: PATRICIA MARTINEZ ÉVORA  
ORIENTADOR: GERVASIO HENRIQUE BECHARA

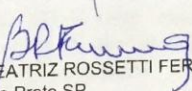
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA  
VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. GERVASIO HENRIQUE BECHARA  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná / Curitiba, PR

  
Pós-doutorando GUSTAVO SERON SANCHES  
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dr. GILSON PEREIRA DE OLIVEIRA  
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dra. MARIA IZABEL CAMARGO MATHIAS  
Biologia Celular e Molecular / Unesp Campus Rio Claro, SP

  
Prof. Dra. BEATRIZ ROSSETTI FERREIRA  
USP / Ribeirão Preto, SP

Jaboticabal, 23 de janeiro de 2017.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**PATRICIA MARTINEZ ÉVORA** – nascida em 01 de novembro de 1983, em Ribeirão Preto, São Paulo. Filha de Paulo Roberto Barbosa Évora e Yolanda Dora Martinez Évora. Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, em dezembro de 2008. Mestre em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal pelo programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal, concluindo-o em julho de 2012. Doutora em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal pelo programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal, concluindo-o em 2017 com a presente tese

***“A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais são tratados.”***

***(Mahatma Gandhi)***

***Aos animais que doam suas vidas à ciência, dedico este trabalho.***

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela vida e saúde. Sem Ele, nada seria possível.

Às pessoas que colaboraram com a realização desse trabalho, manifesto minha gratidão:

ao Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, pela orientação, sabedoria, disponibilidade, dedicação, competência e sobretudo pela amizade;

ao Dr. Gustavo Seron Sanches pela amizade, ensinamentos e contribuição no desenvolvimento deste trabalho;

à Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado pelo auxílio, orientação e sugestões para melhoria deste trabalho;

ao Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira pela contribuição no enriquecimento desta tese tanto no exame de qualificação quanto na defesa da mesma;

aos membros externos da minha banca de defesa de tese, Profa. Dra. Beatriz Rossetti Ferreira e Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias, por se deslocarem até Jaboticabal e pelas valiosas correções e sugestões para melhoria do trabalho;

aos meus pais, Paulo Roberto e Yolanda Dora pelo amor incondicional, carinho, apoio e incentivo à minha formação;

ao meu marido, João Paulo Guimarães da Costa, pela paciência e por estar sempre ao meu lado me incentivando;

à técnica de laboratório, Francisca Ardisson (Chica) pela colaboração nesse trabalho;

às colegas Mayara Carolina Rosolem e Leyriane Barbosa Alves de Oliveira pelo auxílio;

aos cães que participaram desse estudo, Mãe, Filha, Xica, Lobo, Rei, Nego, Branca, Cabeção, Cabecinha e Dunga, pela confiança, carinho e colaboração. Sem eles este trabalho não seria realizado;

finalmente, porém não menos importante, à FAPESP pela bolsa e auxílio



concedidos.

A todos que direta, ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho:  
meus sinceros agradecimentos!

## Sumário

	Página
<b>CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xvi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
2.1. Importância econômica e sanitária de carrapatos.....	23
2.2. Complexo <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	24
2.2.1. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	25
2.2.2. Biologia e ecologia do <i>R. sanguineus</i> .....	27
2.3. Interação carrapato-hospedeiro.....	28
2.4. Mecanismos de resistência do hospedeiro.....	29
2.5. Mecanismos de evasão do ectoparasito .....	33
2.6. Controle do <i>R. sanguineus</i> .....	34
2.6.1. Desenvolvimento de vacina anti-carrapato .....	35
2.6.1.1. Aquaporinas.....	40
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	43
3.1. Objetivo geral .....	43
3.2. Objetivos específicos .....	43
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
4.1. Carrapatos .....	44
4.2. Hospedeiros e grupos experimentais .....	44
4.3. Vacina anti-carrapato - recombinante de aquaporina de <i>R. (B.) microplus</i> - <i>RmAQP1</i> .....	45
4.4. Imunização, coleta de sangue e infestação desafio .....	46
4.5. Parâmetros biológicos dos carrapatos em condições laboratoriais.....	47
4.6. Histopatologia do sítio de fixação dos carrapatos .....	48

4.7. Ensaio imunoenzimático indireto- teste ELISA .....	49
4.8. Ensaio Imunohistoquímico .....	49
4.9. Histologia dos ovários de fêmeas de carrapatos ingurgitadas .....	51
4.10. Análise estatística .....	51
4.11. Aspectos éticos.....	51
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
5.1. Ensaio Imunoenzimático Indireto- Teste ELISA .....	53
5.2. Parâmetros biológicos dos carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> pós- infestação desafio .....	54
5.2.1. Parâmetros biológicos dos carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> adultos pós-infestação desafio .....	54
5.2.2. Parâmetros biológicos das larvas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> pós- infestação desafio.....	57
5.2.3. Parâmetros biológicos das ninfas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> pós- infestação desafio.....	58
5.3. Histopatologia do sítio de fixação dos carrapatos .....	60
5.3.1. Alterações gerais .....	60
5.3.2. Contagens celulares.....	61
5.3.2.1. Contagens celulares, global e diferencial, dos grupos imunizado (G1) e controle (G2).....	64
5.4. Ensaio Imunohistoquímico.....	68
5.5. Histologia dos ovários de fêmeas de carrapatos ingurgitadas.....	69
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>

**unesp**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 010221/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação comparativa da proteína ribossomal p0 e da aquaporina de *Rhipicephalus (B.) microplus* como potenciais antígenos vacinais contra o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae) em cães**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião extraordinária de 4 de junho de 2013.

Jaboticabal, 4 de junho de 2013.

**Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi**  
Coordenador - CEUA

## **AValiação DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO DA AQUAPORINA DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* CONTRA O CARRAPATO *Rhipicephalus sanguineus* SENSU LATO EM CÃES DOMÉSTICOS**

**RESUMO** - O controle de carrapatos à base de acaricidas químicos tem levado a seleção de ectoparasitos resistentes além de contaminação ambiental e de produtos de origem animal. Frente a isso, há crescente incentivo na busca por alternativas de controle do ectoparasito, como o desenvolvimento de vacinas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a utilização de uma proteína recombinante da aquaporina do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* como antígeno em uma vacina contra *R. sanguineus*, em cães domésticos. A investigação foi realizada em cooperação científica com o United States Department of Agriculture/Agricultural Research Service (USDA/ARS). Os efeitos da vacina foram avaliados nos diferentes estádios do ectoparasito em cães previamente vacinados com o antígeno + adjuvante (Montanide) (G1) e em animais de um grupo controle inoculados apenas como adjuvante (G2). Foram avaliados: i. potencial biótico (parâmetros biológicos) dos carrapatos; ii. Título de anticorpos séricos (IgG) de cães por meio do ensaio imunoenzimático indireto (Teste ELISA) pós imunização; iii. Avaliação histopatológica do sítio de fixação dos carrapatos em diversos momentos pós-fixação na pele dos hospedeiros, incluindo a contagem de células inflamatórias migradas para o foco inflamatório; iv. Histologia do ovário dos carrapatos para observação de possíveis danos causados pela ação do imunógeno; v. locais de ação do antígeno no corpo do carrapato por meio de ensaio imunohistoquímico. Os principais resultados obtidos foram: 1) O período de ingurgitamento das fêmeas adultas do grupo imunizado foi 12% menor que o do grupo controle; 2) as larvas do grupo imunizado apresentaram período de ingurgitamento 8,7% maior que as do grupo controle e pesaram 7,2% menos; 3) as ninfas do grupo imunizado apresentaram período de ingurgitamento 4,5% menor e pesaram 3,6% menos que as do grupo controle; 4) apesar de os animais apresentarem um aumento na titulação de anticorpos pós-segunda imunização, estes títulos rapidamente diminuíram; 5) As alterações histopatológicas gerais observadas incluíam espessamento da epiderme (hiperplasia), infiltração celular inflamatória, edema de derme e neovascularização, dentre outros, o que representa aspectos inespecíficos presentes em uma reação inflamatória; 6) processo inflamatório moderado foi observado nos animais do grupo imunizado em todos os tempos avaliados; 7) O infiltrado inflamatório presente no tegumento dos cães era composto majoritariamente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, seguido de neutrófilos, observando-se também a presença esporádica de eosinófilos e de raros mastócitos ainda íntegros, não degranulados; 8) Histologia dos ovários de fêmeas alimentadas em cães imunizados demonstrou maior quantidade de vacuolização em ovócitos II e III, e maior número de deformações em ovócitos IV e V em relação ao grupo controle; 9) Ensaio imunohistoquímico em carrapatos adultos mostrou resultado negativo, ou seja, nenhuma marcação foi evidenciada no tecido do ectoparasito. Os resultados, analisados em conjunto, indicam um baixo potencial imunogênico do *RmAQP1* contra carrapatos *R. sanguineus* adultos na dose testada e possível, ainda

que baixa, eficácia contra larvas e ninfas. Sugere-se que novos estudos sejam desenvolvidos com dose maior de *RmAQP1* para observação de seu potencial imunogênico contra *R. sanguineus* em cães.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Rhipicephalus sanguineus*; aquaporina; antígeno; imunidade; cão doméstico; infestação

## EVALUATION OF THE IMMUNOGENIC POTENTIAL OF *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* AQUAPORIN AGAINST THE *Rhipicephalus sanguineus* SENSU LATO TICK IN DOMESTIC DOGS

**ABSTRACT** - Tick control based on chemical acaricides has led to rapid selection of resistant ectoparasites as well as environmental and animal products contamination. Therefore, there is an increasing incentive in the search for alternatives to the parasite's control, such as the development of vaccines. This study aimed to evaluate the use of a recombinant aquaporin *R.(Boophilus) microplus* protein as antigen in a vaccine against *R. sanguineus* in domestic dogs. The research was conducted on scientific cooperation with the United States Department of Agriculture / Agricultural Research Service (USDA / ARS). The vaccine's effects were evaluated at different stages of the ectoparasite in dogs previously vaccinated with antigen + adjuvant (Montanide) (G1) and in animals of a control group inoculated only with adjuvant (G2). It was evaluated: i. biotic potential (biological parameters) of ticks; ii. serum antibodies (IgG) titers of the dogs after immunization, by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); iii. Histopathological evaluation of the tick's attachment site at various times post-fixation on the host's skin, including the inflammatory cell counts migrated into the inflammatory site; iv. Tick's ovarian histology for observation of possible damage caused by the action of the immunogen; v. possible antigen action sites in the tick's body by immunohistochemical assay. The main results were: 1) The engorgement period of adult females from the immunized group was 12% lower than the control group; 2) Larvae from the immunized group had 8.7% higher engorgement period than the control group and weighed 7.2% less; 3) Nymphs from the immunized group had 4.5% lower engorgement period and weighed 3.6% less than the control group; 4) Although the animals showed increased antibodies titer post-second immunization, these titers decreased rapidly; 5) The general histopathological changes observed included, among others, epidermal thickening (hyperplasia), inflammatory cell infiltration, edema and dermis neovascularization, all nonspecific aspects present in an inflammatory reaction; 6) Moderate inflammation was observed in animals from the immunized group in all time periods; 7) The inflammatory infiltrate in the tegument of the dogs was mostly comprised of lymphocytes, plasma cells and macrophages, followed by neutrophils, also presenting the sporadic presence of eosinophils and rare intact mast cells; 8) Histology of the ovaries of females fed on immunized dogs showed a higher amount of vacuolation in oocytes II and III, and higher presence of deformed oocytes IV and V when compared to the control group 9) Immunohistochemical test in adult ticks showed negative result meaning no immunolabeling was evidenced in ectoparasite tissue. The results, all together, indicate low immunogenic potential of the *RmAQP1* against adult *R. sanguineus* ticks, and possible, though subtle, efficacy against larvae and nymphs in the tested dose. It is suggested that further studies are developed with higher dose of *RmAQP1* to observe its possible immunogenic potential against *R. sanguineus* in dogs

**KEYWORDS.** *Rhipicephalus sanguineus*; aquaporin; antigen; immunity; domestic dog; infestation



## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas pós-infestação desafio.....	55
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros biológicos das larvas pós-infestação desafio.....	57
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros biológicos das ninfas pós-infestação desafio.....	59
<b>Tabela 4.</b> Contagens global e diferencial das células no ponto de fixação do <i>R. sanguineus</i> em diferentes tempos pós-liberação em cães imunizados. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão, Jaboticabal-SP, 2015.....	65
<b>Tabela 5.</b> Contagens global e diferencial das células no ponto de fixação do <i>R. sanguineus</i> em diferentes tempos pós-liberação em cães controle. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão, Jaboticabal-SP, 2015.....	65
<b>Tabela 6.</b> Comparação entre a contagem global das células da área de fixação do carrapato <i>R. sanguineus</i> em diferentes tempos pós-liberação em cães imunizados e controles. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão, Jaboticabal-SP, 2015.....	67

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Sequência de aminoácidos do fragmento de proteína de aquaporina clonado e produzido por expressão de <i>Pichia pastoris</i> . Aminoácidos da proteína de aquaporina de carrapato <i>R. (B.) microplus</i> estão sublinhados. Aminoácidos adicionais não originários do carrapato não estão sublinhados. Imagem adaptada de Guerrero e Pérez-de-Leon (2014).....	46
<b>Figura 2.</b> Delineamento experimental.....	47
<b>Figura 3.</b> Títulos de anticorpos anti- <i>RmAQP1</i> presentes em soro de cães domésticos em diferentes tempos pós-imunização medidos por ELISA indireto. O título de anticorpo de cada animal foi determinado como a última diluição de soro com densidade ótica média superior a três vezes a densidade ótica média do grupo controle negativo.....	53
<b>Figura 4.</b> Análise individual dos títulos de anticorpos anti- <i>RmAQP1</i> dos cães domésticos imunizados com proteína recombinante de aquaporina em diferentes tempos pós imunização em cães domésticos por Elisa indireto. O título de anticorpo de cada animal foi determinado como a última diluição de soro com densidade ótica média superior a três vezes a densidade ótica média do grupo controle negativo.....	54

- Figura 5.** Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de fêmeas de *R. sanguineus* alimentadas em cães controles e imunizados. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ )..... 56
- Figura 6.** Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de larvas de *R. sanguineus* alimentadas em cães controles e imunizados. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ )..... 58
- Figura 7.** Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de ninfas de *R. sanguineus* alimentadas em cães controles e imunizados. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ )..... 59
- Figura 8.** Cone de cimento presente na epiderme de cão infestado com *R. sanguineus*. Hematoxilina–eosina. Escala = 100 $\mu$ m..... 61
- Figura 9.** Ausência de reação inflamatória em pele de cão infestado com *R. sanguineus*. Hematoxilina-eosina. Escala = 100 $\mu$ m..... 62
- Figura 10.** Reação inflamatória leve em pele de cão infestado com *R. sanguineus*. Notar cone de cimento sobre a epiderme e fragmento do carrapato à direita. Hematoxilina-eosina. Escala = 100 $\mu$ m..... 62
- Figura 11.** Reação inflamatória moderada em pele de cão infestado com *R. sanguineus*. Hematoxilina-eosina. Escala = 100 $\mu$ m..... 63

- Figura 12.** Reação inflamatória intensa em pele de cão infestado com *R. sanguineus*. Notar copioso infiltrado celular dermal e espessamento da epiderme (seta). Hematoxilina-eosina. Escala = 100µm..... 63
- Figura 13.** Contagem global e diferencial das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus* em diferentes tempos pós-liberação em cães vacinados. (\*): médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )..... 66
- Figura 14.** Contagem global e diferencial das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus* em diferentes tempos pós-liberação em cães controles. (\*): médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )..... 67
- Figura 15.** Comparação entre a contagem global das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus* em diferentes tempos pós-liberação em cães imunizados (G1) e controles (G2). (\*): médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )..... 67
- Figura 16.** Fotomicrografia da técnica de imunohistoquímica com a contra coloração com Hematoxilina de Harris de carrapato *R. sanguineus* alimentado em animal vacinado. A- porção anterior do carrapato *R. sanguineus*; B- porção posterior do *R. sanguineus*. Escala = 100µm..... 68
- Figura 17.** Resumo esquemático da vitelogênese em secção ovariana de *Rhipicephalus sanguineus*. A= ovócito I, B= ovócito II, C= ovócito III, D= ovócito IV e E= ovócito V. vg, vesícula germinal; nu, nucléolo; gv, grânulos de vitelo; co, córion. Imagem adaptada de Oliveira et al. (2005b)..... 69

**Figura 18a.** A- Fotomicrografia de ovócitos II e III de ovário de fêmea alimentada em cão vacinado; B- Fotomicrografia de ovócitos II, III e IV de ovário de fêmea alimentada em cães não vacinados; II = ovócitos II; III= ovócitos III; V= ovócitos V; v= vacuolização. Escala: A= 50 $\mu$ m; B= 50 $\mu$ m..... 70

**Figura 18b.** Fotomicrografia de ovócitos IV de ovário de fêmea alimentada em cão vacinado, setas apontam deformações no córion dos ovócitos. Escala: 50 $\mu$ m..... 71

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS 2013), feita pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 44,3% dos domicílios possuem um cão. Esse número significa uma população de cães estimada em 52,2 milhões em residências brasileiras e mostra que, hoje, é possível dizer que o Brasil tem mais cães do que crianças uma vez que, segundo a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD) de 2013, o país tinha 44,9 milhões de crianças de 1 a 14 anos.

O negócio pet é um dos segmentos da economia que mais se destaca nos últimos anos sendo que, no mundo, esse mercado movimenta mais de U\$100 bilhões por ano. De acordo com dados da consultoria de pesquisa de mercado Euromonitor, em 2015, o Brasil foi o terceiro maior mercado pet do mundo, representando 5,3% do volume total de faturamento, que chegou a US\$102,2 bilhões, perdendo apenas para os Estados Unidos e Reino Unido que foram o primeiro e segundo colocados, respectivamente. Ademais, de acordo com previsões da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet, São Paulo/SP), o setor pet no Brasil deverá atingir um faturamento de R\$19,2 bilhões até o fim de 2016.

Esse cenário comprova a mudança de estilo das famílias, com estreitamento de laços afetivos com os animais. Conseqüentemente, a busca por qualidade e bem-estar desses animais proporcionou um avanço significativo na Medicina Veterinária, tanto em tecnologias quanto em tratamentos.

Um importante segmento do mercado pet é o de antiparasitários. Os transtornos causados pelas infestações com carrapatos são relevantes, visto que cães residem em ambientes domésticos e, apesar de ter como hospedeiro principal o cão, carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* também podem parasitar outros animais, inclusive humanos. Ademais, algumas linhagens destes ectoparasitos são vetores de babesiose canina e erliquiose monocítica canina, dentre outras doenças.

O uso indiscriminado e por muito tempo de acaricidas químicos culmina com a seleção de linhagens resistentes dos carrapatos e, conseqüentemente, gera crescente necessidade de buscas por alternativas de controle dos mesmos. Cientes que nos dias atuais uma vacina contra o carrapato do cão, *R. sanguineus*, não está

disponível no mercado, o presente trabalho, em colaboração com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – Agricultural Research Service (USDA-ARS), objetivou avaliar uma proteína recombinante, obtida através da expressão em *Pichia pastoris*, de um cDNA que codifica uma aquaporina do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, como antígeno contra o *Rhipicephalus sanguineus*, em cães.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Importância econômica e sanitária de carrapatos

Carrapatos são ectoparasitos hematófagos obrigatórios pertencentes ao filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari e ordem Ixodida (KRANTZ; WALTER, 2009). Até o momento, três famílias são reconhecidas, sendo elas: Ixodidae (carrapatos duros), Argasidae (carrapatos moles) e a família mais recentemente identificada, Nuttalliellidae (GUGLIELMONE et al., 2010).

Além de causar danos mecânicos aos hospedeiros, carrapatos podem ser vetores de patógenos de importância em sanidade animal e saúde pública. De fato, estes ectoparasitos estão entre os mais importantes vetores de patógenos que afetam o gado, animais de companhia e seres humanos (OLIVER, 1989; RAOULT; ROUX, 1997; AZAD; BEARD, 1998; PAROLA; RAOULT, 2001; JONGEJAN; UILENBERG, 2004; LABUDA; NUTTALL, 2004; PAROLA; PADDOCK; RAOULT, 2005; DANTAS-TORRES, 2007), apesar de apenas 10% das espécies serem implicadas na transmissão de diferentes tipos de agentes patogênicos, tais como vírus, bactérias, nematóides e protozoários (OLIVER, 1989; JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

Em bovinos, infestações por carrapatos podem causar paralisia, reações alérgicas, desvalorização da pele e do couro, queda na produção de leite, septicemia, infecção bacteriana secundária, diminuição no ganho de peso, diminuição da produção de leite, entre outros (DE CASTRO, 1997; ALIM et al., 2012).

*Rhipicephalus sanguineus* podem ser encontrados parasitando diversos animais domésticos e silvestres, incluindo humanos, apesar de ter como principal hospedeiro o cão doméstico (DANTAS-TORRES; FIGUEIREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006; GUGLIELMONE et al., 2003; SZABÓ et al., 2008; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2016). Embora infestações com *R. sanguineus* em animais de companhia não resultem em perdas econômicas relevantes quando comparado a animais de produção, os transtornos causados pelas infestações são marcantes, visto que cães residem em ambientes domésticos. Ademais, algumas linhagens destes



ectoparasitos são vetores de agentes patogênicos como *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, agentes etiológicos de babesiose canina e erliquiose monocítica canina, respectivamente. Também se suspeita que este carrapato esteja envolvido na transmissão de outros importantes patógenos, como *Leishmania (Leishmania) infantum* [sin. *Leishmania chagasi*], agente etiológico da leishmaniose visceral (BLANC; CAMINOPETROS, 1930; COUTINHO et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2011; MEDEIROS-SILVA et al., 2015).

A transmissão de patógenos por *R. sanguineus* para humanos também é bem documentada. Estes carrapatos são vetores de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa das Montanhas Rochosas no México (MARIOTTE; BUSTAMANTE; VARELA, 1944; BUSTAMANTE; VARELA, 1947) e no leste do Arizona (DEMMA et al., 2005). Há vários registros de humanos picados por *R. sanguineus* em países Neotropicais, principalmente Argentina, Brasil, Chile, Sul do México, Panamá, Peru, Porto Rico, Venezuela e Uruguai (GUGLIELMONE et al., 2003). Além de vetores, *R. sanguineus* são reservatórios de *Rickettsia conorii*, agente etiológico da febre exantemática do Mediterrâneo (MATSUMOTO et al., 2005), na região Mediterrânea. *Ehrlichia canis* ou espécies relativamente próximas foram isoladas de humanos na Venezuela (PEREZ; RIKISHA; WEN, 1996) e as evidências sugeriram que *R. sanguineus* seria o vetor (UNVER et al., 2001). Nos Estados Unidos, casos de humanos picados por carrapatos variam de acordo com a região estudada (ESTRADA-PEÑA; JONGEJAN, 1999). Na África, *R. sanguineus* é predominantemente ectoparasito do cão doméstico, mas também infesta humanos (WALKER; KEIRANS; HORAK, 2000).

## **2.2. Complexo *Rhipicephalus sanguineus***

O gênero *Rhipicephalus* abrange aproximadamente 84 espécies de carrapatos, quase todas com origem na região Afrotropical, dentre as quais estão incluídas o “carrapato vermelho do cão”, *R. sanguineus*, e o carrapato bovino, *R. (B.) microplus* (GUGLIELMONE et al., 2010; APANASKEVICH; HORAK; MULUMBA-MFUMU, 2013; HORAK et al., 2013). Dentro do gênero *Rhipicephalus* encontra-se o complexo *Rhipicephalus sanguineus*, constituído de 17 espécies morfológicamente semelhantes e cuja posição taxonômica ainda é considerada incerta para alguns

pesquisadores, a saber: *R. sanguineus* sensu lato; *R. turanicus* Pomerantsev, 1936; *R. rossicus* Yakimov and Kol-Yakimova, 1911; *R. pumilio* Schulze, 1935; *R. leporis* Pomerantsev, 1946; *R. schulzei* Olenev, 1929; *R. pusillus* Gil Collado, 1936; *R. sulcatus* Neumann, 1908; *R. guilhoni* Morel e Vassiliades 1936; *R. moucheti* Morel, 1965; *R. bergeoni* Morel e Balis, 1976; *R. camicasi*, *R. ramachandrai* Dhanda, 1966; *R. tetracornus* Kitaoka and Suzuki, 1983; *R. ziemanni* Neumann, 1904; *R. aurantiacus* Neumann, 1907 e *R. boueti* Morel, 1957 (CAMICAS et al., 1998). No entanto, não há um consenso e as similaridades morfológicas presentes entre os espécimes do gênero *Rhipicephalus* torna difícil sua identificação exata (GRAY et al., 2013)

### 2.2.1. *Rhipicephalus sanguineus*

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* foi inicialmente descrita em 1806 por Latreille como *Ixodes sanguineus*. De acordo com a descrição original, *R. sanguineus* sensu stricto (s.s.) englobaria carrapatos vermelho-sangue, posteriormente pontuados, com três linhas impressas e nenhuma região torácica distinta antero-dorsalmente (WALKER et al., 2000). No entanto, não há definição de base morfológica para a espécie uma vez que seu espécime tipo foi perdido. Enquanto Hoogstraal (1956) a considerou uma espécie típica da África, Feldman-Muhsam (1967), Morel e Vassiliades (1963) e Pomerantsev et al. (1940) a consideraram uma espécie do Mediterrâneo. De acordo com Guglielmone et al. (2014), o *R. sanguineus* (s.s) é Paleártico e todos os outros registros desses carrapatos são considerados especulativos. Além disso, segundo Guglielmone et al. (2014), a partir do conhecimento atual das espécies, é impossível determinar suas ecorregiões. Na América do Sul, acredita-se que o *R. sanguineus* sensu lato tenha sido introduzido por diferentes rotas envolvidas na colonização, sendo reconhecido no Brasil no início do século XX por Rohr (1909), na Argentina em 1938 (ROVEDA, 1954) e no Chile em 1974 (TAGLE, 1976).

Até o início do século XXI, a espécie *R. sanguineus* era reconhecida como um único táxon na região Neotropical. No entanto, vários estudos vêm demonstrando que o táxon inicialmente definido como *R. sanguineus* é formado por pelo menos duas linhagens diferentes nesta região biogeográfica (SZABÓ et al.,

2005; MORAES-FILHO et al., 2011; NAVA et al., 2012; DANTAS-TORRES et al., 2013; SANCHES et al., 2016).

De fato, análise de DNA mitocondrial de duas linhagens do carrapato (Rafaela, Argentina e Jaboticabal, Brasil) revelou uma estreita relação filogenética do *R. sanguineus* da Argentina com o *R. sanguineus* e *R. turanicus* da França, e do *R. sanguineus* do Brasil com o *R. turanicus* da África do Sul (SZABÓ et al., 2005). Ademais, estudo comparativo da morfologia das duas populações de carrapatos mostrou diferenças no tamanho do idiossoma, formato do poro genital e morfologia das estruturas sensoriais (OLIVEIRA et al., 2005a). No entanto, independente das diferenças apresentadas entre populações de *R. sanguineus* da Argentina e do Brasil, estudo comparativo sobre aquisição de resistência de cães domésticos às duas linhagens revelou que cães não adquirem resistência a nenhuma das cepas (ÉVORA et al., 2015).

Análise filogenética baseada em sequências mitocondriais 16S rDNA que foram geradas a partir de espécimes do complexo *Rhipicephalus sanguineus*, coletados em 29 localidades entre os 9 países latino-americanos, foi conduzida por Moraes-Filho et al. (2011). Neste estudo observou-se que sequências da América Latina geraram seis diferentes haplótipos (A, B, C, D, E e F) e concluiu-se que os espécimes de *R. sanguineus* do Novo Mundo estão divididos em dois subtipos distintos, um representado por populações tropicais e subtropicais (linhagens tropicais), e outro representado por linhagens "temperadas" devido a sua distribuição na porção sul da América do Sul (MORAES-FILHO et al., 2011). Uma vez que não há espécies de *Rhipicephalus* nativas do Novo Mundo, propôs-se que a "linhagem temperada" seja derivada de carrapatos introduzidos na região mediterrânea, enquanto que a "linhagem tropical" é derivada de carrapatos introduzidos na África subsaariana (SZABÓ et al., 2005, MORAES-FILHO et al., 2011).

Estudo recente demonstrou que representantes da linhagem temperada de *R. sanguineus* s.l. na América Latina apresentaram taxas de sobrevivência significativamente maiores do que os carrapatos que representam a linhagem tropical quando os carrapatos ingurgitados (larvas, ninfas e fêmeas) e ovos foram incubados em temperaturas mais baixas, simulando as estações de inverno

(“inverno do Rio Grande do Sul” e “inverno extremo”) de muitas partes do sul da América do Sul, onde a espécie temperada está presente. Esses resultados sugerem que a ausência de populações de espécies tropicais em áreas temperadas da América do Sul está relacionada à baixa capacidade das espécies tropicais de sobreviver ao inverno nessas áreas (LABRUNA et al., 2016).

Finalmente, estudo visando avaliar a competência vetorial de diferentes linhagens neotropicais de *R. sanguineus* para *E. canis* demonstrou que, das espécies de *R. sanguineus* presentes na América do Sul, apenas carrapatos do Estado de São Paulo (linhagem tropical) são susceptíveis à infecção por *E. canis*, sendo espécimes do Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai (linhagem temperada) refratários à infecção pela bactéria (MORAES-FILHO et al., 2015).

Levando em conta essas diferenças entre linhagens de *R. sanguineus*, uma avaliação mais acurada poderia contribuir para o melhor entendimento de diferenças regionais na epidemiologia de doenças veiculadas, bem como de variações na susceptibilidade a acaricidas.

### **2.2.2. Biologia e ecologia do *R. sanguineus***

*Rhipicephalus sanguineus* passam por quatro estádios de desenvolvimento: ovo, larva, ninfa e adulto. São carrapatos trioxenos, ou seja, cada estágio ativo de desenvolvimento se alimenta em um hospedeiro, que pode ser o mesmo ou diferente, sofrendo ecdise no ambiente (DANTAS-TORRES, 2008).

*Rhipicephalus sanguineus* utiliza suas quelíceras para perfurar a pele do hospedeiro, inserir o seu hipostômio e quelíceras na epiderme do mesmo, e durante sua fixação secreta o cimento, que forma um cone na superfície da epiderme e que o auxilia a ficar fixado à mesma por vários dias (SZABÓ; BECHARA, 1999).

Fêmeas de *R. sanguineus* se alimentam no hospedeiro por cinco a 21 dias e, uma vez ingurgitadas, se desprendem do mesmo para digerirem o sangue e oviporem em local seguro. A oviposição, por sua vez, é precedida por um período de pré-oviposição que varia de três a 14 dias (PETROVA-PIONTKOVSKAYA, 1947; KOCH, 1982; SWEATMAN, 1967; PEGRAM et al., 1987; BECHARA et al., 1995; JITTAPALAPONG et al., 2000), sendo a duração média do período de oviposição entre 16-18 dias (PETROVA-PIONTKOVSKAYA, 1947; KOCH, 1982; BECHARA et

al., 1995). Após a oviposição, as fêmeas morrem.

O período de incubação dos ovos, influenciado pela temperatura, varia de seis a 23 dias (PETROVA-PIONTKOVSKAYA, 1947; KOCH, 1982; PEGRAM et al., 1987; BECHARA et al., 1995; JITTAPALAPONG et al., 2000). Após o período de incubação, pequenas larvas eclodem dos ovos e imediatamente procuram um hospedeiro para se alimentarem. As larvas alimentam-se por três a 10 dias e se desprendem do hospedeiro para sofrerem ecdise para ninfas. O período de muda da larva em ninfa varia de cinco a 15 dias (PETROVA-PIONTKOVSKAYA, 1947; PEGRAM et al., 1987; BECHARA et al., 1995).

Ninfas alimentam-se no hospedeiro por um período de três a 11 dias e se desprendem para tornarem-se adultos, sendo que a muda ocorre entre nove e 47 dias (PETROVA-PIONTKOVSKAYA, 1947; PEGRAM et al., 1987; BECHARA et al., 1995).

### **2.3. Interação carrapato-hospedeiro**

A interação entre carrapatos e seus hospedeiros está baseada na habilidade dos ectoparasitos de interferir nas reações anti-hemostática e inflamatória do seu hospedeiro vertebrado (AROCHA-PIÑANGO et al., 1999).

Trager (1939a, 1939b) iniciou os primeiros estudos referentes à aquisição de resistência a carrapatos. Neles, observou que cobaias, após serem infestadas uma única vez com larvas de *Demacantor variabilis*, desenvolviam imunidade sistêmica, observando com isso que as reações cutâneas no sítio de alimentação dos carrapatos nesses hospedeiros eram caracterizadas por hiperplasia epidérmica, edema e infiltrados inflamatórios granulocíticos. Através da vacinação com extrato de carrapatos adultas ou infestação experimental, Trager (1939a, 1939b) sugeriu que a resistência adquirida era devida à resposta imuno-mediada. Essa sugestão foi posteriormente confirmada por Riek (1956) após observar intensa reação da pele em bovinos previamente sensibilizados, pós-inoculação de extrato de carrapato. Desde então, inúmeros trabalhos confirmaram a aquisição de resistência em cobaias e coelhos por meio de infestações sucessivas ou de vacinação com extratos do ectoparasito (ALLEN, 1973; WIKEL; ALLEN, 1976a; ASKENASE, 1977; BECHARA et al., 1994; SZABÓ et al., 1995a).

A rejeição aos carrapatos em animais considerados resistentes é frequentemente baseada em reações de hipersensibilidade cutânea (BROWN; BARKER; ASKENASE, 1984). De fato, reação de hipersensibilidade cutânea do tipo basofílica foi detectada por Szabó e Bechara (1999) em cobaias pré-sensibilizadas pelo carrapato *R. sanguineus* via infestações sucessivas com adultos dessa espécie.

Ademais, estudos conduzidos por Szabó, Morelli Junior e Bechara (1995b) demonstraram que o cão doméstico desenvolve apenas reação de hipersensibilidade do tipo imediata (imunidade humoral), enquanto a cobaia apresenta reações imediata e tardia (imunidade celular), frente à injeção intradérmica de extrato de carrapato *R. sanguineus* adulto. Assim, a resposta imune celular parece desempenhar papel fundamental no mecanismo de resistência ao carrapato.

Estudo conduzido por Veronez et al. (2010) demonstrou que *R. sanguineus* alimentados em hospedeiro resistentes apresentam várias alterações histológicas como por exemplo inchaço das células epiteliais dos túbulos de Malpighi, aumento no teor de guanina secretada por esses túbulos e vacuolização de ovócitos, em comparação com carrapatos alimentados em cães.

Além disso, Menten-Dedoyart et al. (2011) demonstraram que a alimentação do carrapato interfere na resposta do sistema imune do hospedeiro pela inibição da diferenciação de células B maduras em plasmócitos, no local de fixação do ectoparasito.

#### **2.4. Mecanismos de resistência do hospedeiro**

A rejeição do ectoparasito é demonstrada por meio de interferências na sua alimentação, prolongamento no tempo de ingurgitamento, redução do peso das fêmeas ingurgitadas e da massa de ovos, diminuição da viabilidade dos ovos e, em alguns casos, até morte do ectoparasito (WAGLAND, 1975). De acordo com Wikel e Allen (1982), os achados acima enumerados podem ser exclusivamente devidos à nutrição deficiente dos carrapatos.

Riek (1962) descreveu dois tipos de mecanismos de resistência do hospedeiro ao carrapato: a) *resistência inata*: presente em algumas espécies ou subespécies de hospedeiros, estando geneticamente associada a diversos fatores, tais como tipo de pelagem, espessura da pele, número de mastócitos, oleosidade da pele, riqueza de

vasculatura cutânea e até mesmo odor exalado do animal dentre outros (BROWN, 1988); e b) *resistência adquirida ou adaptativa*: aquisição de resistência após algumas infestações do animal por carrapatos.

Bovinos indianos, por exemplo, co-evoluíram milhares de anos com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (THIESEN, 1979; LEMOS, 1986) enquanto o gado europeu, de acordo com Penna (1990), teve pouco contato com o ectoparasito. Assim, estes dados podem justificar o fato de os bovinos *Bos indicus* serem mais resistentes ao ectoparasito que os bovinos *Bos taurus*. Além disso, o número de anastomoses arteriovenosas na vasculatura dermal, mais rica em *Bos indicus*, favorece neles uma resposta inflamatória local mais acentuada e exuberante (AMAKIRI, 1976).

Um importante componente no processo de resistência ao carrapato é o processo de autolimpeza realizado pelos animais considerados resistentes. Mediadores imunológicos induzidos pelos antígenos inoculados pelos carrapatos na pele do hospedeiro contribuem para que a região apresente prurido (ALEXANDER, 1986) e, na tentativa de livrar-se do ectoparasito, o animal lambe a área parasitada ou coça-se em superfícies ásperas (ROCHA, 1976).

Ao se alimentar, o carrapato ativa a via regulatória e efetora do sistema imune do hospedeiro, envolvendo anticorpos, complemento, citocinas, células apresentadoras de antígenos e linfócitos T (WILLADSEN, 1980; BROSSARD, 1982; WIKEL; ALLEN, 1982; WIKEL; RAMACHANDRA; BERGMAN, 1994).

De fato, Allen (1973) verificou que no sítio de alimentação dos carrapatos, as cobaias desenvolviam reações cutâneas que consistiam principalmente de basófilos e eosinófilos, sendo que infiltrados cutâneos ricos em basófilos são respostas de linfócitos T (DVORAK, 1970) e a reação de hipersensibilidade tardia é mediada pelos linfócitos Th1 (MOSMANN; COFFMAN, 1989). Uma vez que a administração de soro anti-basofílico resultou em redução da expressão de resistência adquirida (BROWN et al., 1982), concluiu-se que os basófilos aparentemente estão relacionados com a limitação da alimentação dos carrapatos (WIKEL, 1996).

O infiltrado basofílico desencadeia a liberação de mediadores como a histamina, que aumenta a permeabilidade vascular, com conseqüente formação de edema (RIBEIRO, 1989). Assim, a vasodilatação dos capilares locais possivelmente

altera o microclima da pele, tornando-o, assim, inadequado para o carrapato (OBEREM, 1984). Segundo Willadsen, Wood e Riding (1979), o teor de histamina presente na pele está diretamente relacionado com o grau de resistência expressada. Estudo revelou que a administração de drogas anti-histamínicas em bovinos acarreta aumento significativo na produção de fêmeas ingurgitadas por animal (TATCHELL; BENNETT, 1969), pois reduz a expressão de resistência. Outro estudo conduzido por Wikel e Allen (1982) demonstrou que o nível de histamina presente no sítio de alimentação de *Dermacentor andersoni* em cobaias resistentes era mais elevado que em animais susceptíveis. Além disso, a administração de anti-histamínicos anti-h1 e anti-h2 reduziu a expressão de resistência enquanto a administração isolada de agonistas não alterou significativamente a resistência a carrapatos.

O aumento do fluxo de sangue no sítio de fixação do carrapato também pode contribuir para maior distribuição de antígenos às células imunocompetentes e/ou facilitar o tráfego de células no local, principalmente em animais resistentes (WIKEL; WHELEN, 1986).

Os mastócitos podem carrear anticorpos de superfície, e talvez ajam como a primeira linha de defesa contra carrapatos, induzindo também a vasodilatação ao liberar fatores vasoativos (BROWN, 1988). Assim, pesquisadores sugeriram que os mastócitos, ao invés dos basófilos, são importantes para a imunidade adquirida a carrapatos em camundongos, uma vez que basófilos não foram detectados no sítio de alimentação dos carrapatos e que os camundongos deficitários em mastócitos não adquiriram resistência (MATSUDA et al., 1985; 1987; 1990). Contrariamente, outra equipe de pesquisadores relatou que a mesma estirpe de camundongos deficientes em mastócitos desenvolveu resistência a outras espécies de carrapatos (DENHOLLANDER; ALLEN, 1985; STEEVES; ALLEN, 1991).

Células de Langerhans também são importantes na resistência adquirida, (ALLEN; KHALIL; WIKEL, 1979a; NITHIUTHAI; ALLEN, 1984a; 1984b; 1984c; 1985). Estas diminuem em quantidade na epiderme durante a infestação primária e aumentam no sítio de alimentação de carrapatos durante a fase inicial da segunda infestação, quando a resistência se expressa (NITHIUTHAI; ALLEN, 1984a). Durante as primeiras infestações, acredita-se que as células de Langerhans aprisionam



antígenos de glândulas salivares dos carrapatos e aparentemente são drenadas para os linfonodos onde apresentam os antígenos aos linfócitos pré-sensibilizados (ALLEN et al., 1979b). Estes, por sua vez, secretam fatores quimiotáticos para basófilos, que já se encontram ligados a anticorpos na circulação.

Shapiro, Voigt e Fujisaki (1986) sugeriram que a resistência de cobaias a *R. appendiculatus* parece ser mediada por anticorpos. De acordo, ao experimentalmente administrarem ciclofosfamida a cobaias resistentes a carrapatos, Wikel e Allen (1976b) observaram que houve bloqueio da expressão de resistência, demonstrando que anticorpos também desempenham papel na expressão de resistência de alguns hospedeiros.

Segundo Wikel (1996), anticorpos contribuem para a expressão da resistência, porém muitos provavelmente não reagem com as moléculas envolvidas em processos que influenciam na biologia do carrapato. O autor ainda sugeriu que a importância relativa das respostas de Th1 e Th2 durante a aquisição e expressão de resistência deveria ser determinada e que maior atenção deveria ser dada aos imunógenos originados na glândula salivar que estimulam os linfócitos T durante a infestação.

As células Th1 produzem IFN- $\gamma$  enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-13, IL-5 e IL-10 (MOSMANN; COFFMAN, 1989; MOSMANN; SAD 1996; KOBAYASHI; KANEDA; KASAMA, 2001). Citocinas associadas às células Th1 estão envolvidas na reação de hipersensibilidade do tipo tardia, assim como na ativação de macrófagos. Já as citocinas associadas às células Th2 estão envolvidas na elevação do número de mastócitos e eosinófilos, assim como na estimulação da produção de anticorpos. Além disso, produtos de células Th1 e Th2 podem regular negativamente a atividade e/ou produção um do outro (MOSMANN; MOORE, 1991).

Finalmente, características da espécie hospedeira e do ectoparasito (CHABAUD, 1950) também determinam a resistência inata, assim como características raciais e individuais (densidade do pelo, quantidade de glândulas sebáceas, número de mastócitos na pele, espessura da pele, número de linfócitos circulantes, comportamento, dentre outras).

## 2.5. Mecanismos de evasão do ectoparasito

Enquanto infestações por carrapatos são frequentemente caracterizadas no hospedeiro pelo desenvolvimento de resposta imune celular e humoral a uma variedade de antígenos do ixodídeo, este, por sua vez, desenvolve meios de evadir-se da resposta do hospedeiro (WIKEL; RAMACHANDRA; BERGMAN, 1994). Assim, embora algumas espécies hospedeiras desenvolvam resistência a carrapatos, nem sempre podemos observar tal acontecimento.

Uma incapacidade imunológica do hospedeiro ou a capacidade de evasão do ectoparasito podem determinar a falha no desenvolvimento de imunidade efetivamente protetora (RIBEIRO, 1989). Assim, a incapacidade imunológica do hospedeiro pode ser devida à expressão antigênica imprópria para a indução da resposta imune efetiva, ou então ser devida a não utilização dos componentes parasitários corretos (MORRISON, 1987).

Já um mecanismo de evasão importante do ectoparasito parece estar associado às suas glândulas salivares. Os componentes dessas glândulas atuam no sentido de opor-se aos mecanismos de defesa apresentados pelo hospedeiro em resposta à fixação do carrapato (BOWMAN et al., 1997). Suas principais funções incluem a absorção de vapor de água proveniente de ar insaturado por carrapatos em vida livre, excreção do excesso de fluído (para concentrar o sangue ingerido), e a secreção de proteínas bioativas e componentes lipídicos durante a sua alimentação (SAUER; ESSENBERG; BOWMAN, 2000). Como exemplo pode-se citar a saliva de carrapatos *Ixodes ricinus*. Esta exerce atividade anti-inflamatória, anti-hemostática, inibidora da atividade da bradicinina, de anafilotoxinas, desativadora de neutrófilos (RIBEIRO et al., 1985; RIBEIRO; WEIS; TELFORD, 1990; RIBEIRO; SPIELMAN, 1986) e anticoagulante (LIMO et al., 1991, RIBEIRO et al., 1985).

Segundo estudo conduzido por Walker e Fletcher (1990), as glândulas salivares dos carrapatos são capazes de responder seletivamente a diferentes condições no sítio de fixação, aumentando assim as chances de sobrevivência do ectoparasito.

## 2.6. Controle do *R. sanguineus*

Sabendo-se que em média 95% dos carrapatos encontram-se no ambiente e apenas 5% nos hospedeiros, uma estratégia de controle integrado para eliminação da população de carrapatos tanto do animal, quanto do ambiente é necessária (DANTAS-TORRES, 2008).

Cães e o ambiente podem ser tratados com uma série de formulações químicas. Assim, acaricidas são amplamente utilizados para eliminar e prevenir a reinfestação por um determinado período. No entanto, o uso abusivo de tratamentos a base de acaricidas sintéticos culmina com populações resistentes de carrapatos além de contaminação ambiental e de produtos de origem animal.

A resistência do ectoparasito aos acaricidas é obtida através da seleção genética dos mesmos, ou seja, alguns exemplares de uma população sobrevivem após exposição continuada a uma família ou grupo químico carrapaticida (letais para a maioria), e com o tempo, toda a população é resistente a este princípio ativo (FURLONG, 1998). Assim, há crescente incentivo pela busca por alternativas de controle do ectoparasito.

O controle biológico é um método alternativo ao controle químico. Como exemplo, fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* têm demonstrado potencial para controlar populações de certas espécies de carrapatos, incluindo *R. sanguineus* (KIRKLAND; WESTWOOD; KEYHANI, 2004; SAMISH; GINSBERG; GLAZER, 2004).

Sonenshine (2006), por sua vez, focou em técnicas de controle de carrapato assistidas por feromônios para se evitar problemas relacionados com a dependência por acaricidas. Feromônios fazem parte de uma classe conhecida como semioquímicos, os quais servem para guiar o comportamento de organismos, facilitando atividades como a agregação no meio ambiente, encontro de alimento, cópula e outras atividades vitais (SONENSHINE, 1991; 2006). Assim, técnicas de controle de carrapatos por meio de feromônios incluem a aplicação de componentes dos mesmos associados a um acaricida na vegetação (ALLAN; SONENSHINE; BURRIDGE, 2001; SONENSHINE 2006; SONENSHINE; ROE, 2014). O desenvolvimento de uma isca contendo feromônios e acaricida, que é usada para atrair e matar os machos antes da cópula (HAMILTON; SONENSHINE 1989;

SONENSHINE; HAMILTON; LUSBY, 1992; ABDEL-RAHMAN; FAHMY; AGGOUR, 1998), também pode ser utilizada, entre outros.

### **2.6.1. Desenvolvimento de vacina anti-carrapato**

Uma opção considerada sustentável é a combinação de produtos químicos com vacina para o controle de carrapatos e das possíveis doenças transmitidas pelos mesmos (GHOSH; AZHAHIANAMBI; YADAV, 2007; SPRONG et al., 2014).

O desenvolvimento de vacinas anti-carrapatos representa uma das alternativas mais promissoras ao controle químico dos ectoparasitos, com a vantagem de serem de fácil administração e de não colocarem em risco a saúde humana, além de não oferecerem risco ambiental (WIKEL, 1996). Além disso, com a redução de infestação por carrapatos, a vacina conseqüentemente auxiliaria a diminuir infecções por patógenos transmitidos pelos ectoparasitos (DE LA FUENTE; KOCAN; CONTRERAS, 2015).

A hipótese que embasa a ação de vacinas anti-carrapato é que o ectoparasito, ao se alimentar em hospedeiro imunizado, ingeriria anticorpos específicos para o antígeno-alvo que poderá, por sua vez, interferir nos parâmetros biológicos do mesmo e/ou interagir com epítomos de outras proteínas, resultando numa diminuição da performance alimentar, reprodutiva e talvez até vetorial do ectoparasito (DE LA FUENTE et al., 2011; MERINO et al., 2011; BENSACI et al., 2012; MORENO-CID et al., 2013).

Diferentes tipos de antígenos “ocultos” – aqueles não apresentados ao hospedeiro numa infestação natural - foram utilizados na tentativa de se produzir imunógenos visando a produção de vacinas, sendo os imunógenos contra carrapatos os que apresentaram melhores resultados dentre os artrópodes (OPDEBEECK, 1994).

Antígenos de carrapatos estudados até o momento têm demonstrado impactos múltiplos em carrapatos quando utilizados em um formato de vacina. Dentre estes impactos estão a diminuição de infestações de carrapatos e fertilidade dos mesmos, diminuição de infecção por patógeno transmitido pelos ectoparasitos e da capacidade vetorial dos mesmos para a transmissão de agentes patogênicos, entre outros (DE LA FUENTE; KOCAN; CONTRERAS, 2015)

Em estudo conduzido por Willadsen et al. (1989), isolou-se e purificou-se uma glicoproteína da superfície de membranas das células digestivas que mimetizava as alterações biológicas induzidas no *R. (B.) microplus* em inoculações com extratos brutos de carrapato em bovinos. Essa proteína foi denominada Bm86 e posteriormente constatou-se que se encontrava em pequena quantidade no intestino do carrapato, estando presente em larvas, ninfas e adultos. Outras proteínas, como a Bm91, foram isoladas, porém constatou-se que estas não conferiam imunidade satisfatória quando usadas isoladamente (WIKEL, 1996).

A sequência de fragmentos peptídicos da Bm86 foi determinada por meio do isolamento, purificação e homogeneização de clones de cDNA da glicoproteína e a recombinação gênica, inicialmente expressa em *Escherichia coli* (RAND et al., 1989). Posteriormente, a Bm86 também foi recombinada em baculovírus (RICHARDSON et al., 1993) e nos fungos *Aspergillus niger* e *A. nidulans* (TURNBULL et al., 1990). Em Cuba, Rodriguez et al. (1994) isolaram e amplificaram o gene que codifica a Bm86, expressando-o na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, entre outros.

Os antígenos recombinantes diferem dos nativos tanto na configuração quanto no processo de glicosilação (WILLADSEN; MCKENNA, 1991). Tal expressão da Bm86 com diferentes características foi utilizada para se desenvolver as vacinas TickGard™, TickGardPlus™ (produzidas na Austrália por Byothec Austrália em conjunto com o CSIRO) e a Gavac™ (produzida por Hebercan em Cuba).

O antígeno recombinante da Bm86 induz a formação de anticorpos e de outros componentes séricos, que mediam a resposta imune dos bovinos. Os anticorpos específicos fixam-se à superfície de membrana das células digestivas de *R. (B.) microplus*, e quando o sangue do animal vacinado é ingerido pelo carrapato adulto, ocasiona severos danos morfofisiológicos (AGBEDE; KEMP, 1986; KEMP et al., 1986). Estas vacinas induzem resposta imune que causa ruptura celular, interferindo nos processos de alimentação, com redução no número e tamanho das fêmeas alimentadas e redução da oviposição, fertilidade dos ovos e do potencial reprodutivo dos carrapatos em gerações sucessivas, levando ao decréscimo das populações nas pastagens. Com o tempo, o uso das vacinas poderia reduzir o número de ectoparasitos que sobrevivem entre as diferentes gerações.

Entretanto, considerando-se a genética dos bovinos, inclusive dentro de uma mesma raça, há uma considerável variação no número de animais que respondem à vacinação com a Bm86. De fato, estudo conduzido por Mora Hernández (1996) em que a vacina Gavac<sup>TM</sup> foi testada em bovinos mestiços demonstrou que entre animais da raça Holandesa a vacina não causou efeito de forma regular, sendo que havia animais que não responderam à vacinação e que apresentaram carga considerável de carrapato, especialmente vacas idosas, debilitadas e no puerpério. Assim, estes animais poderiam contribuir para o restabelecimento da população de carrapatos.

Além disso, Garcia-Garcia et al. (1999) demonstraram que existem populações de *R. (B.) microplus* que apresentam baixa susceptibilidade à resposta imune elicitada pela vacinação com Bm86, possivelmente decorrente de variações no locus da Bm86. No entanto, até o momento não se tem evidência de que isto seja um mecanismo de resistência induzido pela seleção de populações submetidas ao controle imunológico por esta glicoproteína.

Justamente em decorrência à baixa susceptibilidade de algumas populações de carrapatos à Bm86, Garcia-Garcia et al. (2000) conduziram um estudo onde clonaram e expressaram uma outra proteína, a Bm95. Estes pesquisadores acreditam que a Bm95 é o antígeno intestinal mais prevalente nas diversas populações de carrapatos distribuídas pelo mundo, ou seja, é o maior contribuinte para a eficácia da Bm86 em cepas onde as vacinações anteriores foram ineficazes, permitindo ainda mais um controle imunológico do *R. (B.) microplus*. Trabalhos referentes à Bm95 realizados pelos mesmos pesquisadores com carrapatos resistentes à vacinação com Bm86 demonstraram que vacinações baseadas na Bm95 foram eficazes na proteção contra infestações de cepas resistentes e sensíveis à Bm86.

Perez-Perez et al. (2010) investigaram a eficiência do antígeno recombinante Bm86 no potencial biótico de *R. sanguineus*, através da imunização de cães domésticos seguida de infestação desafio com carrapatos. A vacinação com o antígeno Bm86 induziu uma resposta imune potente e específica nos cães domésticos ao diminuir a taxa de recuperação dos diferentes ínstares de carrapatos,

peso das teleóginas e da massa de ovos, e a capacidade de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos.

Ademais, estudo conduzido por Rodriguez-Mallon et al. (2013) demonstrou que cães domésticos infectados com *Babesia canis* ou *Ehrlichia canis* que foram vacinados com o antígeno Bm86 apresentaram altos títulos de anticorpos anti-Bm86 que, apesar de não interferir com as infecções, reduziram a transmissão dos patógenos para carrapatos “naive” que se alimentaram nos cães. Assim, esse achado sugere que a vacina tem potencial para controlar doenças transmitidas pelo carrapato através da redução de sua capacidade vetorial.

Estudo mais recente descreveu a proteína ATAQ, uma homóloga da Bm86 com similaridades nas estruturas primárias e secundárias (AGUIRRE et al., 2016), como antígeno promissor no desenvolvimento de uma vacina anti-carrapato. A proteína ATAQ está presente no intestino e túbulos de Malpighi em todos os ínstares dos carrapatos *R. (B.) microplus*, *R. annulatus*, *R. decoloratus* e *R. evertsi evertsi* (NIJHOF et al., 2010). Apesar de não ter sido identificada em *R. sanguineus*, análise *in silico* identificou sequências similares à ATAQ nas outras espécies, sugerindo que esta proteína também exista no *R. sanguineus* (GEER et al., 2010).

Outros modelos de imunógenos que podem ser eficazes contra carrapato são os peptídeos sintéticos, a proteína 64P do cimento, subolesina/akirina, ferritina 2, a proteína P0, o antígeno SILK e aquaporinas (PATARROYO et al., 2002; TRIMNELL et al., 2005; ALMAZÁN et al., 2003; DE LA FUENTE et al., 2011; HAJDUSEK et al., 2010; RODRIGUEZ-MALLON et al., 2012; MERINO et al., 2013; BELLGARD et al., 2012; GUERRERO et al., 2014)

No Brasil, Patarroyo et al. (2002) desenvolveram três peptídeos sintéticos (SBm4912, SBm7462 e SBm19733), derivados da glicoproteína Bm86 do intestino de *R. (Boophilus) microplus*, que foram utilizados para imunizar o gado de uma área isentas de ácaros. Os resultados deste estudo indicaram que o peptídeo sintético SBm7462 possui alta eficácia em relação aos outros, demonstrando a eficiência da resposta imune provocada por peptídeos sintéticos para controlar o carrapato *R. (B.) microplus*.

Extratos purificados de proteínas de cimento a partir de glândulas salivares de carrapatos são imunogênicos e imunoprotetores (BROWN; BARKER; ASKENASE,

1984, MULENGA et al., 1999; BISHOP et al., 2002). Assim, uma proteína de 15 kDa, a 64P, foi identificada numa biblioteca de expressão preparada a partir de glândulas salivares de fêmeas adultas de *R. appendiculatus*, e foi classificada como sendo uma proteína de cemento. A vacinação com proteína recombinante 64P induziu respostas imunes humoral e mediada por células em animais de laboratório, e soros imunes apresentaram reatividade antigênica cruzada com extratos de carrapatos de *R. sanguineus*, *Ixodes ricinus*, *Amblyomma variegatum* e *R. (B.) microplus*, sugerindo seu potencial para desenvolvimento de uma vacina anti-carrapato (TRIMNELL et al., 2005). Entretanto, soros de cobaias que adquiriram imunidade natural pós-infestações com *R. appendiculatus* não reagiram com a proteína (TRIMNELL; HAILS; NUTTALL, 2002).

A subolesina, uma proteína descoberta como um antígeno protetor de carrapato em camundongos em infestações com *Ixodes scapularis*, foi considerada uma possível candidata a antígeno anti-carrapato (ALMAZÁN et al., 2003; DE LA FUENTE et al., 2011). Estudos referentes à imunização com subolesina e seu ortólogo em insetos, a akirina, demonstraram sua eficácia no controle das infestações por carrapatos, mosquitos, flebotomíneos, ácaros e piolhos (DE LA FUENTE et al., 2013). Os efeitos da vacina foram observados na redução no número de ectoparasitos, peso, massa de ovos e capacidade reprodutiva dos ectoparasitos (DE LA FUENTE et al., 2011). Ademais, quimeras contendo epítomos protetores de subolesina/akirina foram desenvolvidas e tais vacinas, contendo o antígeno Q38, demonstraram redução em 69% de infestação com *R. (B.) microplus* e redução do nível de infecção de DNA com *Anaplasma marginale* e *Babesia bigemina* em 40%-50% em bovinos imunizados, em comparação com os do grupo controle (MERINO et al., 2013). Entretanto, resultados de estudo com vacina contendo akirina recombinante de *Aedes albopictus* não demonstrou efeito significativo da proteína ortóloga de subolesina do mosquito contra infestações de *R. sanguineus* em cães (CANALES et al., 2009).

Ferritina 2 é uma molécula secretada expressa em intestino de carrapato cuja função é o transporte inter-tecido de ferro não-heme originário do repasto sanguíneo (HAJDUSEK et al., 2009). Estudo com vacinação de coelhos com ferritina-2 de *I. ricinus* expressa em *E.coli* demonstrou que a vacina forneceu proteção contra *I.*



*ricinus*, sendo a recuperação de fêmeas ingurgitadas 43% menor (HAJDUSEK et al., 2010). Ademais, a ferritina-2 homóloga de *R. (B.) microplus* com adjuvante Montanide ISA 50 V também induziu proteção quando utilizada em vacinação de gado infestado com *R. (B.) microplus* (redução de 30% de fêmeas ingurgitadas e diminuição da fertilidade dos carrapatos, demonstrando 64% de eficiência total) (HAJDUSEK et al., 2010).

Rodriguez-Mallon et al. (2012) identificaram uma região imunogênica não muito conservada da proteína ribossômica de P0 (proteína essencial para a montagem da subunidade ribossômica 60S) de carrapatos *Rhipicephalus sp.*, e com um peptídeo sintético de 20 aminoácidos dessa proteína formularam uma vacina contra *R. sanguineus* que foi testada em coelhos. Como resultado, observaram uma eficácia de aproximadamente 90%, sugerindo seu potencial para o desenvolvimento de uma vacina para controle de carrapatos.

Um antígeno SILK de *R. (B.) microplus* foi utilizado para vacinação de bovinos e, como resultado, foi observado diminuição de 58% do número de fêmeas ingurgitadas e uma eficiência total de 62% pois também apresentou algum efeito na oviposição (MERINO et al., 2013).

Como parte de um estudo do genoma de *R. (B.) microplus* visando transcrições que produzem antígenos eficazes para uma vacina contra o carrapato bovino, estudos focados no genoma (GUERRERO et al., 2010), transcriptoma (GUERRERO et al., 2005), e proteoma (RACHINSKY; GUERRERO; SCOLES, 2007; 2008), em *R. (B.) microplus*, levaram à identificação de genes e regiões codificadoras de genes que codificam proteínas com funções fundamentais no carrapato (BELLGARD et al., 2012). Uma dessas regiões codificadoras de genes foi descoberta para codificar proteínas cujos aminoácidos fossem significativamente semelhantes às aquaporinas.

#### **2.6.1.1. Aquaporinas**

As aquaporinas, também denominadas “canais de água”, permitem a regulação do transporte de água através da bicamada lipídica altamente hidrofóbica de membranas celulares. Os membros da família aquaporina são encontrados desde em mamíferos (ROJEK et al., 2008) até em bactérias (FU et al., 2000), e são muito

comuns em certos tipos de células, como os eritrócitos (DENKER et al., 1988). A estrutura das aquaporinas é tal que duas constrições na proteína atuam como filtros cuja seletividade para a água, glicerol, ureia, e outras moléculas pequenas, é determinada pelo tamanho e carga do poro de constrição (BEITZ et al., 2006). Um total de 13 membros de aquaporinas foram identificados até o momento e são classificados em dois subconjuntos: os que são permeados por água e os que são permeados por água e outras pequenas moléculas (BORGNIJA et al., 1999; GONEN; WALZ, 2006).

Devido ao fato de os carrapatos bovinos ingerirem grandes volumes de sangue em relação ao seu tamanho e peso corporal, eles são obrigados a concentrar os componentes do sangue e ter mecanismos eficientes de transporte de água. Assim, as aquaporinas dos carrapatos, porquanto fundamentais em sua fisiologia, aparentariam ser boas candidatas a antígeno em uma vacina contra esse artrópode (GUERRERO et al., 2014).

Neste contexto, um cDNA que codifica uma aquaporina do carrapato bovino, *R. (B.) microplus*, foi isolado a partir do transcriptoma de fêmeas ingurgitadas e expresso como uma proteína recombinante em *Pichia pastoris*. Esta, por sua vez, denominada *RmAQP1*, foi purificada em condições nativas, emulsionada com adjuvante Montanide, e utilizada como vacina em bovinos, por via intramuscular. Como resultado, a proteína recombinante forneceu 76% e 73% de eficácia em dois ensaios, respectivamente, mostrando-se promissora como antígeno em vacinas contra infestações com *R. (B.) microplus* (GUERRERO et al., 2014).

Ademais, este grupo de pesquisadores também identificou outras duas aquaporinas, denominadas *RmAQP2* e *RmAQP3*. Enquanto estudo de expressão de genes específicos para tecidos demonstrou que a *RmAQP1* é altamente expressa nos gânglios nervosos do carrapato, a *RmAQP2* é encontrada nas glândulas salivares (HUSSEIN et al., 2015).

Finalmente, considerando-se que os carrapatos do cão doméstico e dos bovinos pertencem ao mesmo gênero (*Rhipicephalus*), como demonstrado em estudos de filogenia molecular (BEATI; KEIRANS, 2001; MURRELL; BARKER, 2003), o presente estudo investigou a eficácia imunogênica da proteína

recombinante de aquaporina de *R. (B.) microplus*, *RmAQP1*, contra ínstares do *R. sanguineus* em cães domésticos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

- Avaliar o potencial imunogênico de uma proteína recombinante, *RmAQP1*, de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, como antígeno contra o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, em cães.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Comparar a mortalidade e recuperação de larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus* entre os grupos controle e vacinado;
- Comparar a capacidade reprodutiva das teleóginas entre os grupos controle e vacinado;
- Determinar o título de anticorpos séricos (IgG) de cães por meio do ensaio imunoenzimático indireto (Teste ELISA) pós imunização;
- Analisar a histologia de ovário das fêmeas de carrapatos ingurgitadas para observação de possíveis danos causados pela ação do imunógeno;
- Localizar os sítios de ação do antígeno no corpo do carrapato por meio de ensaio imunohistoquímico.
- Caracterizar a lesão de fixação dos carrapatos em diferentes momentos pós-fixação na pele dos hospedeiros, incluindo a contagem de células inflamatórias migradas para o foco inflamatório.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Carrapatos

No experimento foram utilizados carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* (linhagem tropical), provenientes de colônia de carrapatos do Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

Para a manutenção da colônia, os diversos ínstares (larvas, ninfas e adultos) foram alimentados em coelhas fornecidas pelo Biotério Central da UNESP, campus de Botucatu, que receberam ração e água “*ad libitum*” e foram mantidas em gaiolas apropriadas individuais. Os carrapatos foram liberados nos hospedeiros no interior de câmaras plásticas transparentes, especialmente desenhadas por Bechara et al. (1995), afixadas com cola sintética Brascoplast® aos seus dorsos tricotomizados. Para facilitar a metamorfose dos ínstares ingurgitados, bem como para sua simples manutenção, os ácaros, uma vez desprendidos dos hospedeiros, foram colocados em tubos plásticos transparentes com tampa perfurada, para permitir aeração adequada, e acondicionados em estufa BOD (modelo CD347, FANEM) à temperatura de 27°C, umidade de 80% e fotoperíodo de 12 horas. As coelhas utilizadas para tal fim eram livres de contato prévio com carrapatos.

### 4.2. Hospedeiros e grupos experimentais

Cães machos e fêmeas (n=10), sem raça definida, de 1 a 2 anos de idade foram utilizados como hospedeiros na infestação-desafio por larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus*. Estes animais foram mantidos em boxes individuais no Canil Experimental do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, Jaboticabal, com rígido controle de ectoparasitos, incluindo carrapatos. Ressalte-se que, como o referido projeto de pesquisa visava, dentre outros objetivos, mensurar o nível de anticorpos IgG presente no soro dos cães dos grupos imunizado e controle por meio do teste Elisa, e tendo-se em vista que a concentração de IgG do soro do cão aparentemente não é idade-dependente

(SCHREIBER et al., 1992; HOGENESCH et al., 2004; BLOUNT; PRITCHARD; HEATON, 2005), os cães utilizados não devem ter prejudicado ou interferido com a proposta do projeto por não serem filhotes. Além disso, em se tratando de um estudo cuja finalidade era avaliar um novo antígeno contra *R. sanguineus*, não há real necessidade de os animais serem comprovadamente “naive” previamente ao início do mesmo pois, no cotidiano, os proprietários muitas vezes procuram soluções para controle de carrapatos somente quando seus animais já estão infestados, e não apenas como método preventivo. Os animais foram previamente vacinados contra parvovirose, cinomose, leptospirose, hepatite, parainfluenza e raiva, assim como vermifugados, e receberam ração apropriada e água “*ad libitum*”.

Os cães foram distribuídos em dois grupos experimentais com 5 animais cada: G1-vacinado com *RmAQP1* mais adjuvante (Montanide ISA61VG, Seppic, Paris) e G2-controle inoculado apenas com o adjuvante.

#### **4.3. Vacina anti-carrapato - recombinante de aquaporina de *R. (B.) microplus*- *RmAQP1***

A vacina, gentilmente fornecida pelos Drs. Felix D. Guerrero e Adalberto Pérez de León, do United States Department of Agriculture- Agricultural Research Service (USDA-ARS), foi testada a partir de acordo de cooperação científica assinada pelas partes (UNESP/USDA-ARS).

A sequência de aminoácidos do fragmento de proteína de aquaporina clonado e produzido por expressão de *Pichia pastoris* está representada na **Figura 1** e o desenvolvimento do *RmAQP1* detalhado em artigo publicado por Guerrero et al. (2014).

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNN  
 GLLFINTTIIASIAAKEEGVSLEKREAEAEFMKIENLLIRQLINEFLGTMILITIGDSIMAIIG  
DNESLAACVGPLGWGVAIYVAVQISGGVSSHLNPAVTLAQASVRKFPIAKVPLYFAAQYLG  
GFVGAALVFATYKDAIEHFDQGIROVTGEKATAGIFATYPRPHVSTLTCFIDQVIATGIMM  
VCVEAIGDTRNFGGIPPHIHPICLGLMIMAIIFSAYNCMCPAAASFLEQKLISEEDLNSAVD  
 HHHHHH\*

**Figura 1.** Sequência de aminoácidos do fragmento de proteína de aquaporina clonado e produzido por expressão de *Pichia pastoris*. Aminoácidos da proteína de aquaporina de carrapato *R. (B.) microplus* estão sublinhados. Aminoácidos adicionais não originários do carrapato não estão sublinhados. Imagem adaptada de Guerrero e Pérez-de-Leon (2014).

#### 4.4. Imunização, coleta de sangue e infestação desafio

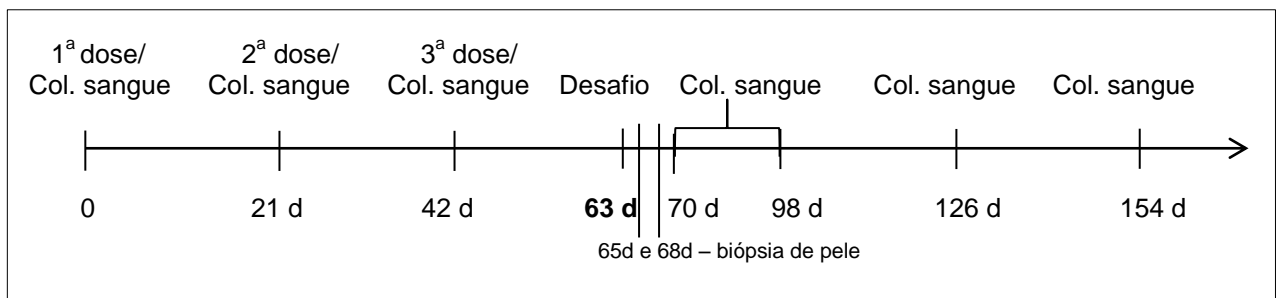
O delineamento experimental está demonstrado na **Figura 2**.

Imediatamente antes de cada vacinação e a cada 28 dias após a última imunização, durante 12 semanas, foi colhida amostra (3 mL) de sangue de cada animal para determinação do título de anticorpos (teste ELISA). O sangue foi depositado em recipiente sem anticoagulante e centrifugado a 3.400 rpm por 15 minutos a 25°C. Finalmente, o soro foi separado e armazenado a -20°C para utilização no teste ELISA.

Seguindo método similar ao de Guerrero et al. (2014), o G1 foi vacinado, por via intramuscular, com 1 mL contendo 10 µg da proteína recombinante (*RmAQP1*) mais adjuvante (Montanide ISA61VG, Seppic, Paris) no início das semanas 1, 4 e 7. Os animais do G2 receberam pela mesma via e nos mesmos tempos, volume igual do adjuvante.

Vinte e um dias após a última vacinação, cada animal do G1 e G2 foi desafiado com 20 casais de adultos, 100 larvas e 100 ninfas de carrapatos *R. sanguineus*, linhagem Jaboticabal. Os carrapatos foram liberados em três câmaras de alimentação plásticas, uma para cada instar do ectoparasito, e afixadas com cola Brascoplast® no dorso previamente tricotomizado dos cães, 24 horas antes da infestação. Colares Elizabetanos de restrição foram utilizados para evitar a remoção das câmaras-de-alimentação pelos hospedeiros. Conforme as fêmeas ingurgitadas se destacaram, eram recolhidas uma vez ao dia, pesadas e acondicionadas

separadamente e colocadas à temperatura de 27°C, umidade de 80% e fotoperíodo de 12 horas em estufa BOD até completa oviposição. Larvas e ninfas destacadas eram recolhidas, contadas, pesadas e acondicionadas em lotes diários. A massa de ovos de cada fêmea era pesada e incubada nas mesmas condições de temperatura, umidade e fotoperíodo em estufa BOD para permitir a eclosão das larvas e determinação de sua porcentagem.



**Figura 2.** Delineamento experimental.

#### 4.5. Parâmetros biológicos dos carrapatos em condições laboratoriais

A interferência do antígeno de aquaporina no potencial biótico dos diferentes estádios do *R. sanguineus* foi avaliada através das diferenças entre os grupos vacinado e controle no que diz respeito a: i. Taxa de recuperação dos carrapatos adultos (RecA), das larvas (RecL) e das ninfas (RecN); ii. Período de ingurgitamento de fêmeas (PIF), larvas (PIL) e ninfas (PIN); iii. Peso médio de fêmeas ingurgitadas (PMI); iv. Período de pré-oviposição (PPO); v. Peso médio da massa de ovos (PMO); vi. Taxa de conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos (taxa de eficiência reprodutiva) (IECO); vii. Taxa de eclodibilidade de larvas (ECLO); viii. Peso médio de larvas ingurgitadas (PML); ix. Taxa de ecdise de larva para ninfa (EcdN); x. Peso médio de ninfas ingurgitadas (PMN); xi. Taxa de ecdise de ninfa para adulto (EcdA), onde:

PIF, PIL e PIN = número de dias decorridos desde a liberação dos carrapatos adultos, larvas e ninfas, respectivamente, sobre o hospedeiro até o seu ingurgitamento e desprendimento;

PPO = número de dias decorridos desde o desprendimento da fêmea até o início



da ovipostura;

$$\text{IECO (\%)} = \frac{\text{PMO (mg)} \times 100}{\text{PFI (mg)}}$$

ECLO (%) = média da avaliação visual, obtida por três pessoas, da massa de larvas que eclodiram, segundo Szabó et al. (1995);

$$\text{Rec (\%)} = \frac{\text{número de fêmeas, larvas ou ninfas ingurgitadas} \times 100}{\text{número de fêmeas, larvas ou ninfas liberadas}}$$

$$\text{EcdN (\%)} = \frac{\text{número de larvas alimentadas ingurgitadas que sofreram muda} \times 100}{\text{número de larvas recuperadas}}$$

$$\text{EcdA (\%)} = \frac{\text{número de ninfas alimentadas ingurgitadas que sofreram muda} \times 100}{\text{número de ninfas recuperadas}}$$

A massa de ovos de cada fêmea foi pesada 15 dias após sua liberação do hospedeiro.

#### **4.6. Histopatologia do sítio de fixação dos carrapatos**

Fragmentos de pele dos locais de fixação dos carrapatos foram colhidos em diferentes tempos (72 e 120 horas) pós-liberação dos mesmos, com auxílio de um instrumento saca-bocado (“punch”) de 4 mm de diâmetro, sob anestesia local com cloridrato de lidocaína a 2% (Bravet Ltda). Essas biópsias incluíam as peças bucais do ácaro para facilitar a localização do local de penetração de seu hipostômio no tegumento cutâneo dos hospedeiros. Os fragmentos obtidos foram fixados por 24 horas em formalina tamponada com fosfatos, pH 7,0, em seguida processados segundo técnica histológica de rotina, incluídos em parafina e seccionados em micrótomo rotatório para obtenção de secções de 4 µm de espessura. As amostras foram seccionadas serial e integralmente e coradas pelas técnicas da Hematoxilina- Eosina e May-Grünwald e Giemsa, respectivamente

para observação de aspectos gerais da reação inflamatória do hospedeiro e contagem de células inflamatórias infiltradas.

#### **4.7. Ensaio imunoenzimático indireto- teste ELISA**

Resumidamente, as placas de microtitulação foram revestidas com antígeno recombinante de aquaporina (100 µL/poço de uma solução de 10 µg de antígeno/mL em tampão de recobrimento), e incubadas “overnight” em câmara úmida a 4°C. Os poços foram lavados três vezes com PBS + 0,05% Tween-20 (PBST) e bloqueados com leite desnatado 5% em PBST e incubados por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Após nova lavagem com PBST, foram adicionados, por poço, 100 µL dos soros a serem testados, diluídos 1:50, seguindo diluições seriadas 1:2 de A a H, com posterior incubação de 1 hora e 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Foi realizada nova lavagem como descrita anteriormente e adicionada a cada poço 100 µL de IgG anti-cão conjugada à fosfatase alcalina na diluição 1:10.000. Após incubação de 1 hora e 30 minutos seguida de lavagem, foi adicionado a cada poço 100 µL de substrato para a fosfatase alcalina, o P-nitrofenilfosfato, diluído em tampão dietanolamina (1 mg/mL). Após incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, as medidas de densidade ótica foram realizadas em um leitor de Elisa MRX™ de alta performance (DYNEX Technologies, Chantilly-VA, USA) a 405 nm.

A concentração ideal do antígeno foi determinada pelos seus fornecedores e a diluição ideal do soro dos cães foi determinada após testes preliminares com diluições 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400.

#### **4.8. Ensaio Imunohistoquímico**

Foram utilizadas secções de 4 µm de espessura de carrapatos inteiros semi-ingurgitados, colhidos em diferentes tempos (72 e 120 horas) pós-fixação, em cada infestação, com auxílio de um instrumento saca-bocado (“punch”) de 4mm de diâmetro, sob anestesia local com cloridrato de lidocaína a 2% (Bravet Ltda). O material foi fixado por 24 horas em formalina tamponada com fosfatos, pH 7,0 e em seguida processado segundo técnicas histológicas de rotina sendo os blocos de parafina contendo os carrapatos seccionados em micrótomo rotatório para obtenção de secções de 4 µm de espessura.

Resumidamente, as lâminas contendo secções dos carrapatos foram primeiramente desparafinadas durante 1 hora em estufa a 60°C, embebidas em xilol 100% durante 20 minutos e reidratadas em graduações decrescentes de álcool etílico (100%, 100%, 95% e 80%) sendo, finalmente, lavadas dez vezes com água destilada. Para a recuperação antigênica, tampão de recuperação Tris EDTA foi adicionado sobre cada secção e, após incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, as lâminas foram aquecidas sob pressão durante aproximadamente 35 minutos. Após esse processo, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos e em seguida lavadas durante 5 minutos em água destilada e 5 minutos em Tris HCl pH 7,4. O bloqueio da peroxidase endógena I foi realizado durante 1 hora com peróxido de hidrogênio a 10% diluído em metanol, em câmara escura. Novas lavagens de 5 minutos cada com água destilada e Tris HCl pH 7,4, respectivamente, foram feitas e o bloqueio da peroxidase endógena II foi realizado com "Dual Endogenous Enzyme Block (Dako, USA)" por 1 hora em câmara escura. Após novas lavagens com água destilada e Tris HCl foi realizado o bloqueio de proteína inespecífica I com "Protein Block Serum-Free (Dako, USA)" durante 1 hora. Para bloqueio das proteínas inespecíficas II foi utilizado leite desnatado a 8%, incubando as lâminas "overnight" (18 horas) a 4°C. Após esta etapa as lâminas foram lavadas várias vezes com água destilada e Tris HCl. Para incubação de anticorpo secundário foi utilizado 100 µL de "Advanced HRP (Dako Cytomation)" por corte e, após incubação durante 30 minutos em câmara úmida e escura, foi adicionado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) para marcação de possíveis regiões imunopositivas, durante 3 minutos. Bloqueou-se então o DAB com água destilada e realizou-se a contra coloração com hematoxilina de Harris por 3 minutos para que as estruturas não marcadas também pudessem ser observadas sob microscópio. Finalmente as lâminas foram mantidas em água corrente durante 10 minutos e montadas para análise, ou seja, foram desidratadas em bateria de álcool com concentração crescente (95%, 100%, 100%, 100%), 50:50 álcool/xilol, e depois retirou-se o álcool em bateria de xilol 100%. Por fim, montou-se a lamínula sobre o tecido com Entellan (Merck®), para conservação da amostra.

#### **4.9. Histologia dos ovários de fêmeas de carrapatos ingurgitadas**

Para a realização da histologia dos ovários, foram utilizadas três fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* advindas de cada grupo. As fêmeas foram colocadas em placas de Petri contendo solução salina tamponada com fosfatos (PBS) (NaCl 7,5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,38 g/L e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,72 g/L) e dissecadas, sob estereomicroscópio, com auxílio de pinças entomológicas de dissecação e microtesouras, para a retirada dos ovários, que foram então colocados em solução fixadora de paraformaldeído 4% durante 24 horas. Em seguida, os ovários foram novamente transferidos para PBS por 24 horas e desidratados em banhos de 15 minutos cada, em série crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95%). Após desidratadas, as amostras foram embebidas em historesina Leica e incluídas no mesmo material adicionado de catalisador, em moldes plásticos. Os blocos foram então colados em suportes de madeira para secção em micrótomo rotatório, obtendo-se secções com espessura de 3 µm que foram posteriormente dispostos em lâminas de vidro previamente limpas. Após secarem, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) conforme rotina histológica e montadas com bálsamo do Canadá em lamínula, para posterior observação e documentação fotográfica sob microscópio de luz.

#### **4.10. Análise estatística**

Os dados dos parâmetros biológicos, histopatológicos e do teste ELISA obtidos dentro de cada grupo foram comparados com o auxílio do software estatístico GraphPad Prism 5.1. O teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett, considerando-se  $p < 0,05$ , foi utilizado na análise dos resultados do teste ELISA. Para comparação dos parâmetros biológicos e histopatológicos empregou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

#### **4.11. Aspectos éticos**

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de

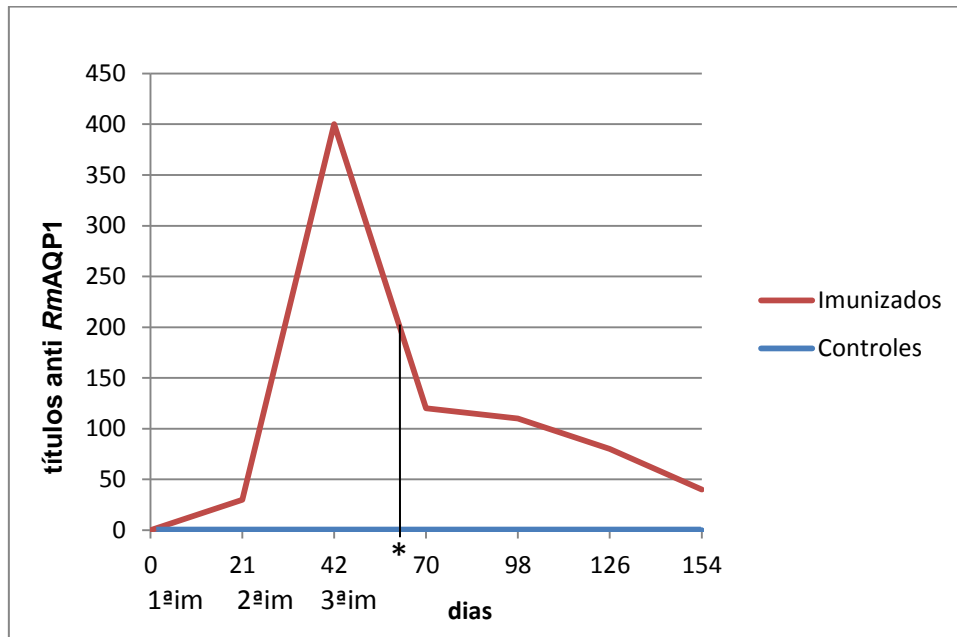
Animais (CEUA) da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal (Protocolo 010221/13, de 04/06/2013).

## 5. RESULTADOS

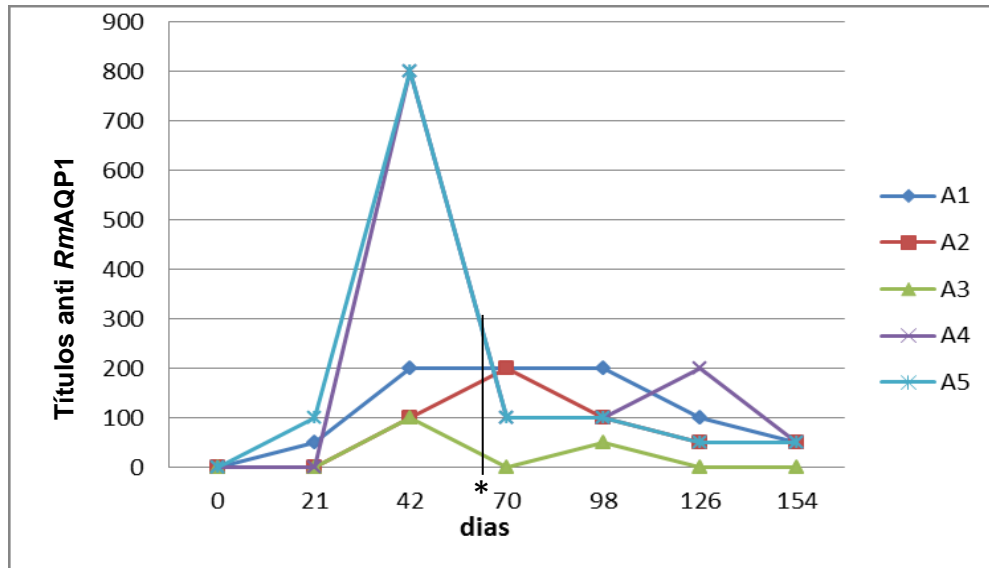
### 5.1. Ensaio Imunoenzimático Indireto- Teste ELISA

O teste Elisa revelou que os animais do G1 apresentaram aumento nos títulos de anticorpos anti-*RmAQP1* pós-primeira e segunda imunização, porém esses títulos começaram a decair após a terceira imunização (**Figura 3**).

Análise individual de cada animal do G1 demonstrou que dois animais apresentaram maior titulação de anticorpos pós-segunda imunização (**Figura 4**). No entanto, os títulos começaram a diminuir logo após a terceira imunização e, assim como os demais animais, diminuíram até o último tempo analisado.



**Figura 3.** Títulos de anticorpos anti- *RmAQP1* presentes em soro de cães domésticos em diferentes tempos pós-imunização medidos por ELISA indireto. O título de anticorpo de cada animal foi determinado como a última diluição de soro com densidade ótica média superior a três vezes a densidade ótica média do grupo controle negativo. (\*) dia 63, data da infestação desafio.



**Figura 4.** Análise individual dos títulos de anticorpos anti- *RmAQP1* dos cães domésticos imunizados com proteína recombinante de aquaporina em diferentes tempos pós imunização em cães domésticos por Elisa indireto. O título de anticorpo de cada animal foi determinado como a última diluição de soro com densidade ótica média superior a três vezes a densidade ótica média do grupo controle negativo. (\*) dia 63, data da infestação desafiadora.

## 5.2. Parâmetros biológicos dos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* pós-infestação desafiadora

### 5.2.1. Parâmetros biológicos dos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* adultos pós-infestação desafiadora

Os resultados dos parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas obtidos após infestação desafiadora estão apresentados na **Tabela 1** e **Figura 5**.

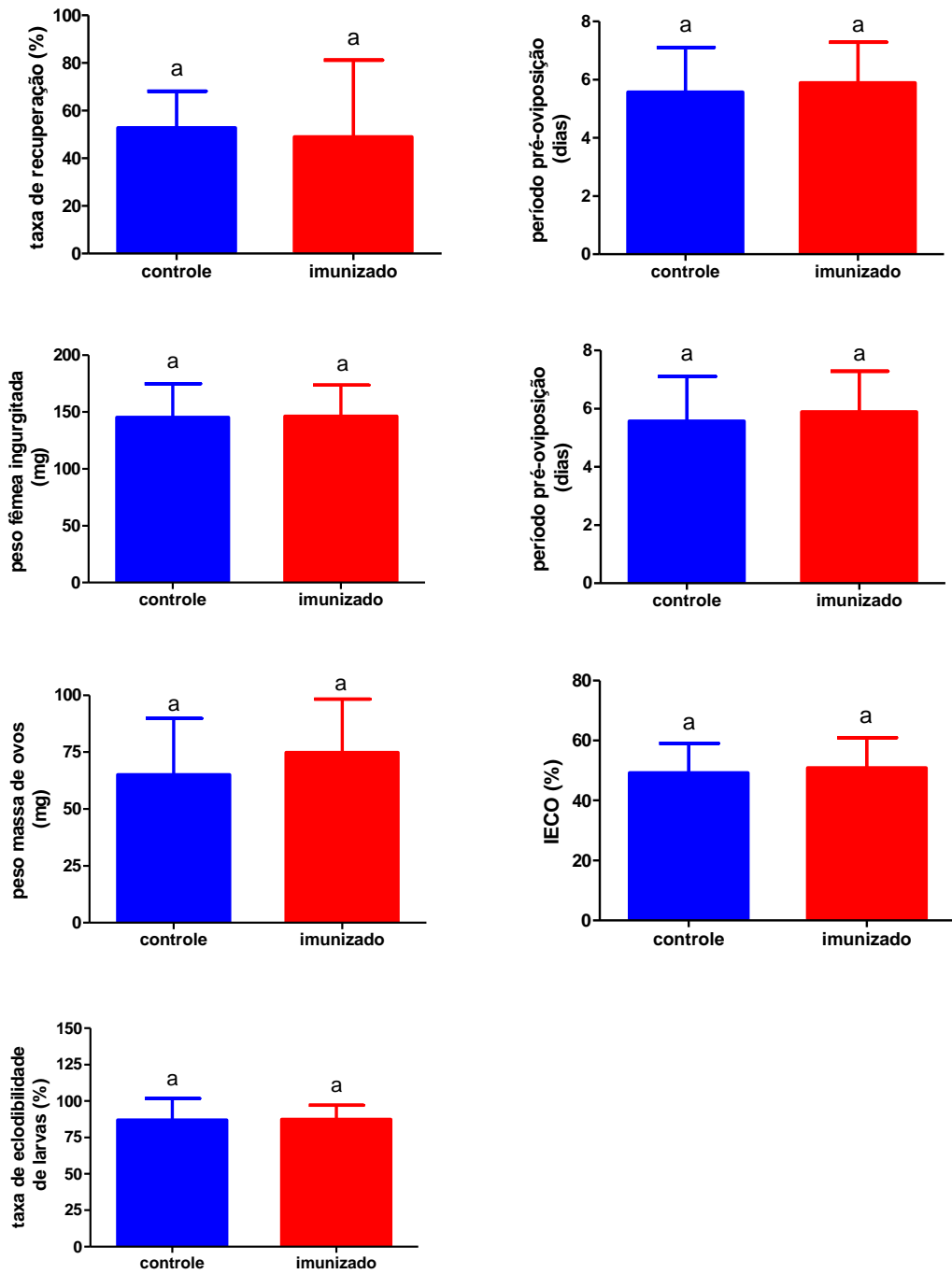
Apenas o período de ingurgitamento das fêmeas apresentou-se estatisticamente diferente, sendo o do grupo imunizado 12% menor que o do grupo controle.

**Tabela 1.** Parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas pós-infestação desafio. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>IMUNIZADO</b>
<b>Rec (%)</b>	52,8 $\pm$ 6,86 <sup>a</sup>	49,00 $\pm$ 16,11 <sup>a</sup>
<b>PIF (dias)</b>	9,11 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	7,98 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>
<b>PFI (mg)</b>	145,40 $\pm$ 4,05 <sup>a</sup>	146,40 $\pm$ 4,07 <sup>a</sup>
<b>PPO (dias)</b>	5,57 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	5,89 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
<b>PMO (mg)</b>	65,08 $\pm$ 4,58 <sup>a</sup>	74,85 $\pm$ 3,96 <sup>a</sup>
<b>IECO (%)</b>	49,25 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup>	50,92 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup>
<b>ECLO (%)</b>	87,07 $\pm$ 2,69 <sup>a</sup>	87,47 $\pm$ 1,68 <sup>a</sup>

Rec, taxa de recuperação das fêmeas ingurgitadas; PIF, período de ingurgitamento das fêmeas; PFI, peso das fêmeas ingurgitadas; PPO, período pré- oviposição; PMO, peso da massa de ovos; IECO, taxa de eficiência das fêmeas em converterem suas reservas alimentares em ovos; ECLO, taxa de eclosão das larvas. Médias em uma mesma linha seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ).





**Figura 5.** Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de fêmeas de *R. sanguineus* alimentadas em cães controles e imunizados. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ).

### 5.2.2. Parâmetros biológicos das larvas de *Rhipicephalus sanguineus* pós-infestação desafio

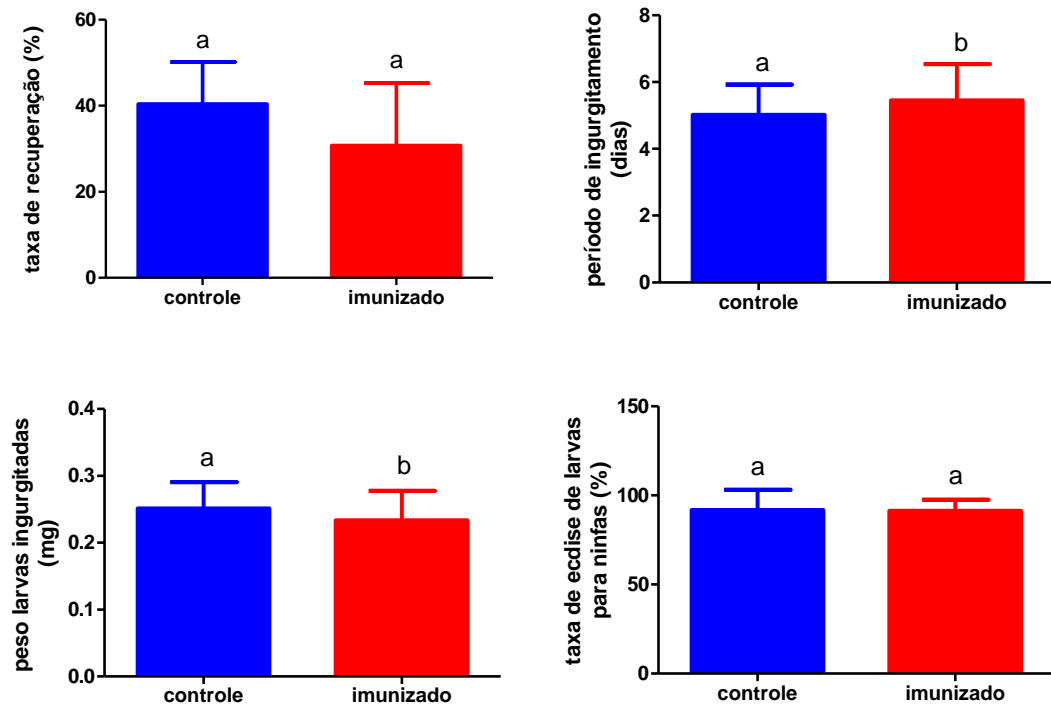
Os resultados dos parâmetros biológicos das larvas ingurgitadas pós- infestação desafio estão apresentados na **Tabela 2** e **Figura 6**.

Os resultados das larvas apresentaram-se estatisticamente diferentes nos grupos imunizado e controle quanto ao período de ingurgitamento e peso pós-ingurgitamento. Apesar de as larvas do grupo imunizado apresentarem período de ingurgitamento 8,7% maior que as do grupo controle, elas pesaram 7,2% menos.

**Tabela 2.** Parâmetros biológicos das larvas pós-infestação desafio. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>IMUNIZADO</b>
<b>Rec (%)</b>	40,40 $\pm$ 4,34 <sup>a</sup>	30,75 $\pm$ 7,28 <sup>a</sup>
<b>PIL (dias)</b>	5,01 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	5,45 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>
<b>PLI (mg)</b>	0,2512 $\pm$ 0,0028 <sup>a</sup>	0,2234 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>
<b>EcdN (%)</b>	91,76 $\pm$ 5,03 <sup>a</sup>	91,27 $\pm$ 3,17 <sup>a</sup>

Rec, taxa de recuperação das larvas; PIL, período de ingurgitamento das larvas; PLI, peso das larvas ingurgitadas; EcdN, taxa de ecdise de larva para ninfa. Médias em um a mesma linha seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ).



**Figura 6.** Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de larvas de *R. sanguineus* alimentadas em cães controles e imunizados. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ).

### 5.2.3. Parâmetros biológicos das ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* pós-infestação desafio

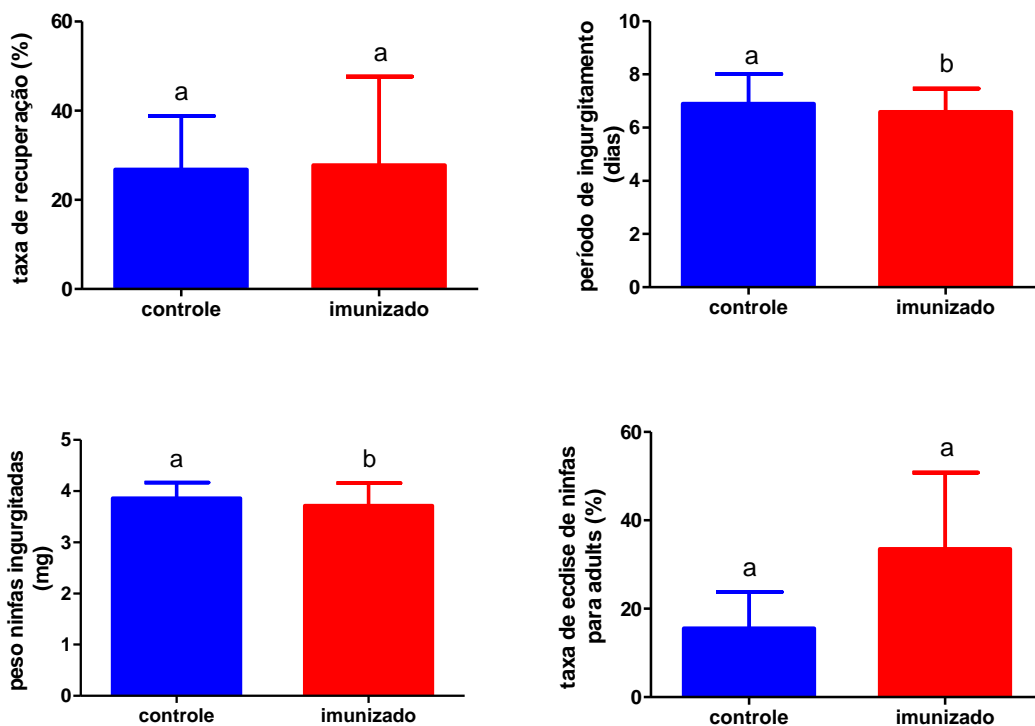
Os resultados dos parâmetros biológicos das ninfas ingurgitadas pós-infestação desafio estão apresentados na **Tabela 3** e **Figura 7**.

Os resultados das ninfas apresentaram-se estatisticamente diferentes nos grupos imunizado e controle quanto ao período de ingurgitamento e peso após ingurgitamento. As ninfas do grupo imunizado apresentaram período de ingurgitamento 4,5% menor e pesaram 3,6% menos que as do grupo controle.

**Tabela 3.** Parâmetros biológicos das ninfas pós-infestação desafio. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

PARÂMETROS	CONTROLE	IMUNIZADO
Rec (%)	26,80 $\pm$ 5,38 <sup>a</sup>	27,75 $\pm$ 9,94 <sup>a</sup>
PIN (dias)	6,90 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	6,59 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>
PNI (mg)	3,86 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	3,72 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
EcdA (%)	15,60 $\pm$ 3,69 <sup>a</sup>	33,53 $\pm$ 8,64 <sup>a</sup>

Rec, taxa de recuperação das ninfas; PIN, período de ingurgitamento das ninfas; PNI, peso das ninfas ingurgitadas; EcdA, taxa de ecdise de ninfa para adulto. Médias em uma mesma linha seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ).



**Figura 7.** Comparação das médias dos parâmetros biológicos obtidos de ninfas de *R. sanguineus* alimentadas em cães controles e imunizados. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ).

### 5.3. Histopatologia do sítio de fixação dos carrapatos

#### 5.3.1. Alterações gerais

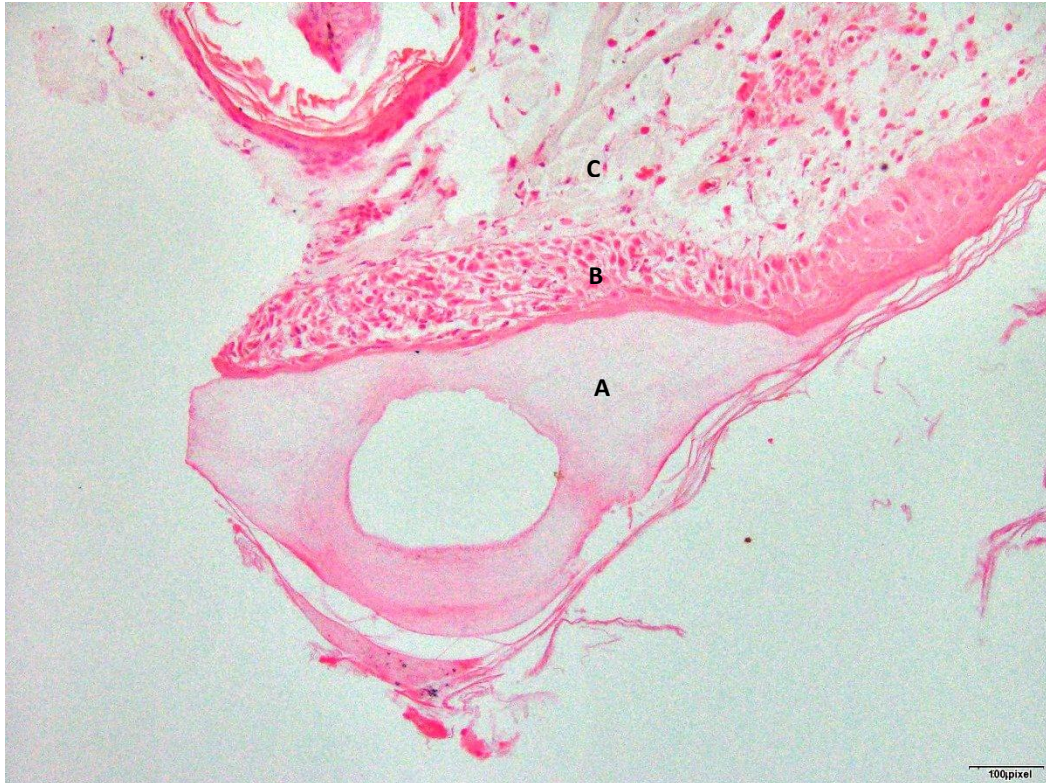
O exame histopatológico das secções de pele dos cães parasitados pelo carrapato *R. sanguineus* evidenciou as camadas do tegumento do hospedeiro, (epiderme, derme e hipoderme) e revelou alterações nas mesmas em ambos os grupos experimentais.

As alterações relatadas estão relacionadas como processo inflamatório desencadeado no local de fixação do carrapato, onde se pode observar infiltração de células inflamatórias de vários tipos e tamanhos [polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN)], além da dissociação de fibras do tecido conjuntivo (edema), hemorragia e hiperemia de vasos dérmicos.

Algumas secções evidenciaram também a presença do cone de cimento no local de fixação dos carrapatos (**Figura 8**). Este é constituído de uma massa eosinofílica em forma de sino, que tem sua base instalada na superfície da epiderme e cuja função é promover melhor adesão do carrapato à pele do hospedeiro e garantir sua alimentação por vários dias.

Ademais, espessamento da epiderme também foi observado em determinados cortes (**Figura 12**).

O infiltrado inflamatório presente no tegumento dos cães era composto majoritariamente por células MN linfócitos, plasmócitos e macrófagos, seguido de PMN neutrófilos, observando-se também a presença esporádica de PMN eosinófilos e de raros mastócitos ainda íntegros, não degranulados.

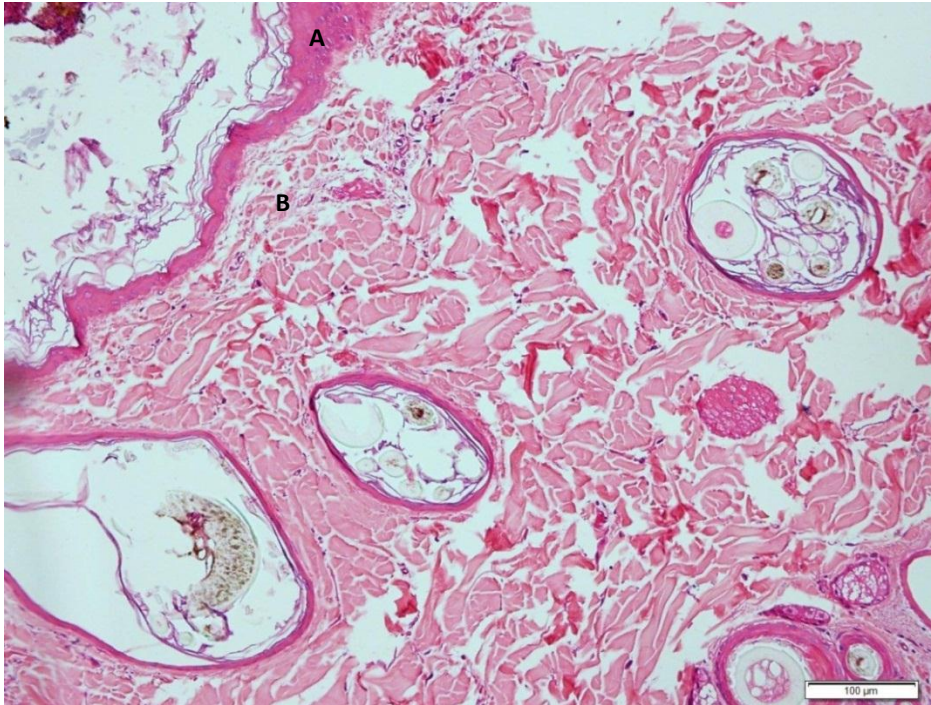


**Figura 8.** Cone de cimento presente na epiderme de cão infestado com *R. sanguineus*. Hematoxilina–eosina. A= cone de cimento, B= epiderme, C= derme. Escala = 100 $\mu$ m

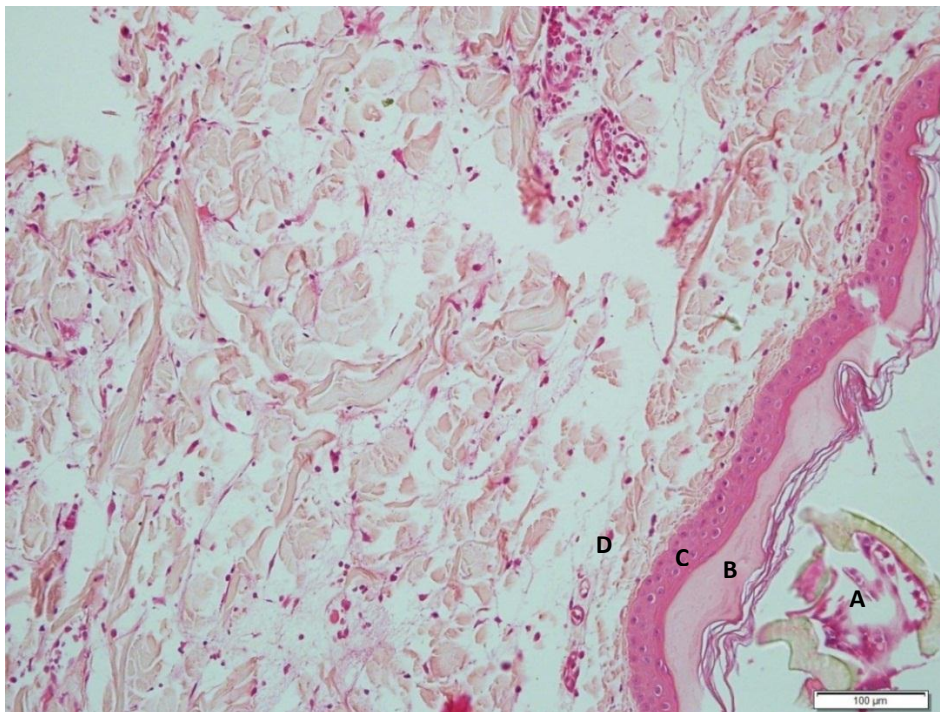
### 5.3.2. Contagens celulares

Os tipos celulares foram identificados e contados por meio de uma quadrícula (Austria/PK 6,3x mn,) com área equivalente a 0,0625 mm<sup>2</sup>, acoplada à ocular do microscópio de luz sob objetiva 40x. Foram realizadas contagens em três campos, preferencialmente abaixo do cone de cimento, e as médias dessas contagens (global e diferencial) utilizadas para análise de resultados. A reação inflamatória presente em cada amostra foi classificada em ausente, discreta, moderada ou intensa de acordo com o número de células inflamatórias observadas (**Figuras 9, 10, 11 e 12**). Finalmente, sinais de processo inflamatório estiveram ausentes em algumas seções, possivelmente por se situarem mais distantes do cone de cimento.



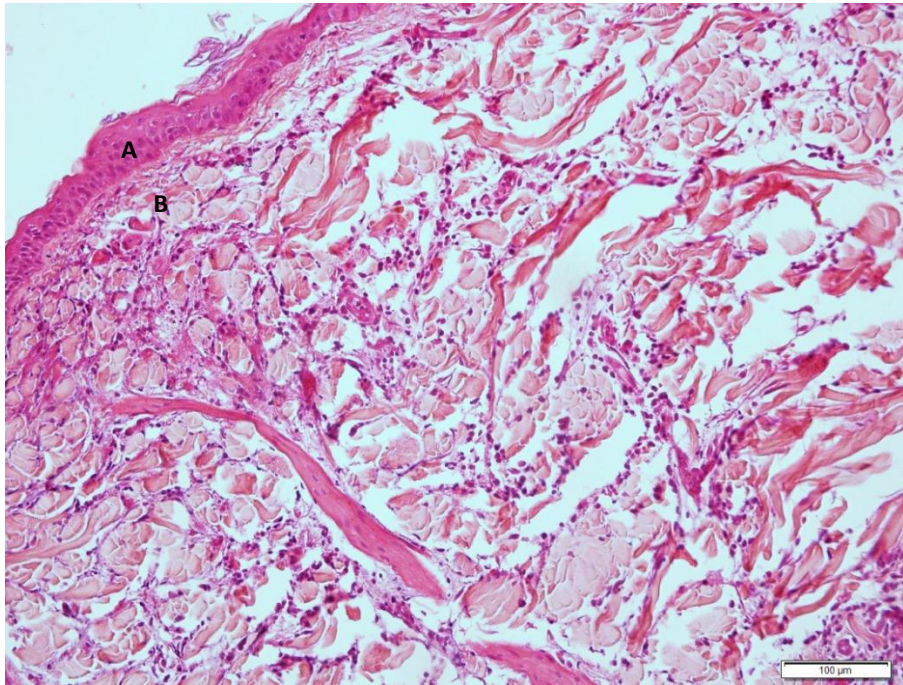


**Figura 9.** Ausência de reação inflamatória em pele de cão infestado com *R. sanguineus*. Hematoxilina-eosina. A= epiderme, B= derme. Escala = 100μm

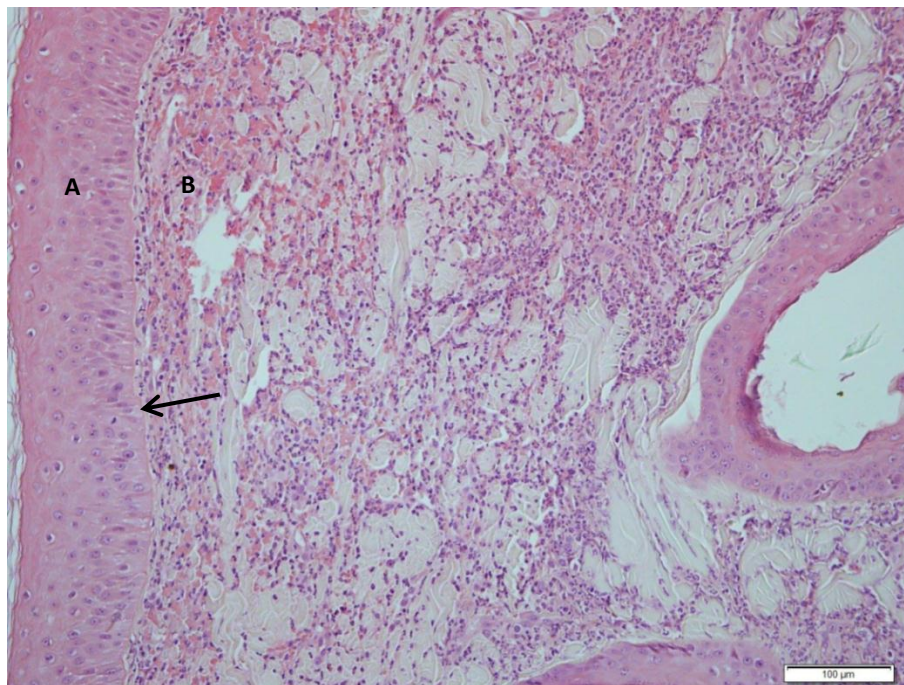


**Figura 10.** Reação inflamatória discreta em pele de cão infestado com *R. sanguineus*. A= *R. sanguineus*, B= cone de cimento, C= epiderme, D= derme. Hematoxilina-eosina. Escala = 100μm





**Figura 11.** Reação inflamatória moderada em pele de cão infestado com *R. sanguineus*. Hematoxilina-eosina. A= epiderme, B= derme. Escala = 100μm



**Figura 12.** Reação inflamatória intensa em pele de cão infestado com *R. sanguineus*. Notar copioso infiltrado celular dermal e espessamento da epiderme (seta). A= epiderme, B= derme. Hematoxilina-eosina. Escala = 100 μm



### 5.3.2.1. Contagens celulares, global e diferencial, dos grupos imunizado (G1) e controle (G2)

Os animais do G1 apresentaram moderada reação inflamatória 72 horas pós- liberação dos carrapatos, com predomínio de células mononucleares e menor número de neutrófilos, raros mastócitos e ausência de eosinófilos (**Tabela 4**). Maior número de neutrófilos foi observado apenas no interior de vasos sanguíneos em algumas secções.

Análise individual das secções referentes ao tempo 120 horas pós-liberação dos carrapatos mostrou aumento do número de células inflamatórias presentes no tegumento de todos os animais do G1, porém em apenas um animal a reação inflamatória foi classificada como intensa e estatisticamente diferente do primeiro tempo analisado (**Figura 13**). Ademais, somente neste animal foi observado grande predomínio de infiltrados neutrófilos e menor número de células mononucleares.

Em dois animais do G2 observou-se ausência de reação inflamatória 72 horas após liberação dos carrapatos, havendo em um deles uma discreta inflamação com predomínio de células mononucleares, menor número de neutrófilos, raros mastócitos e ausência de eosinófilos (**Tabela 5**).

Análise individual dos cortes referentes ao tempo 120 horas pós-liberação dos carrapatos demonstrou que processo inflamatório discreto foi desencadeado nos dois animais que não apresentaram qualquer reação no tempo 72 horas. Ademais, houve aumento do número de células inflamatórias presentes no tegumento do animal cuja reação inflamatória havia sido discreta no primeiro tempo analisado, passando a moderada no tempo 120 horas e diferindo estatisticamente do tempo 72 horas (**Figura 14**).

Comparação entre a contagem global das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus* em diferentes tempos pós-liberação em cães imunizados (G1) e controles (G2) revelou diferença estatisticamente significativa entre os resultados observados no tempo 72 horas (**Figura 15**).

**Tabela 4.** Contagens global e diferencial das células no ponto de fixação do *R. sanguineus* em diferentes tempos pós-liberação em cães imunizados. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, Jaboticabal-SP, 2015.

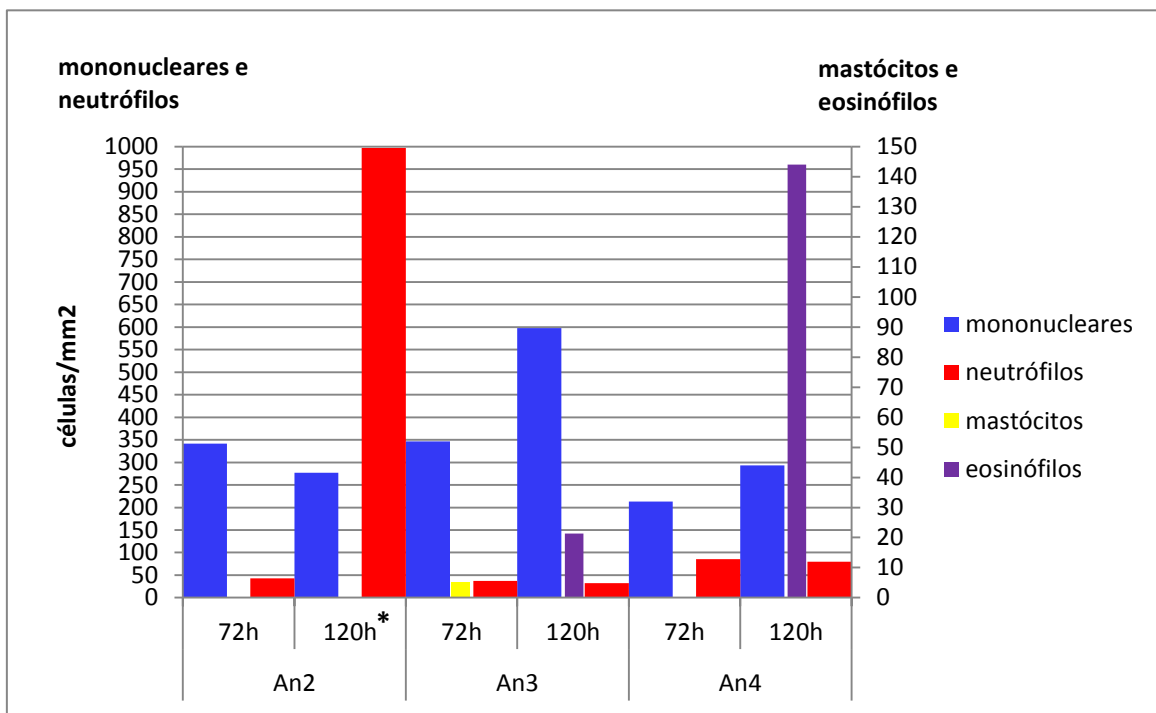
Tempo (h)	neutrófilos	mononucleares	mastócitos	eosinófilos	Total de células por mm <sup>2</sup>
<b>72 (n=3)</b>	55,09 $\pm$ 26,28 <sup>a</sup>	300,43 $\pm$ 75,52 <sup>a</sup>	1,76 $\pm$ 3,05 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	357,28 $\pm$ 50,92 <sup>a</sup>
<b>120 (n=3)</b>	369,76 $\pm$ 544,98 <sup>a</sup>	389,28 $\pm$ 180,31 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	55,09 $\pm$ 77,73 <sup>a</sup>	814,13 $\pm$ 404,27 <sup>a</sup>

n= número de amostras; Médias em uma coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

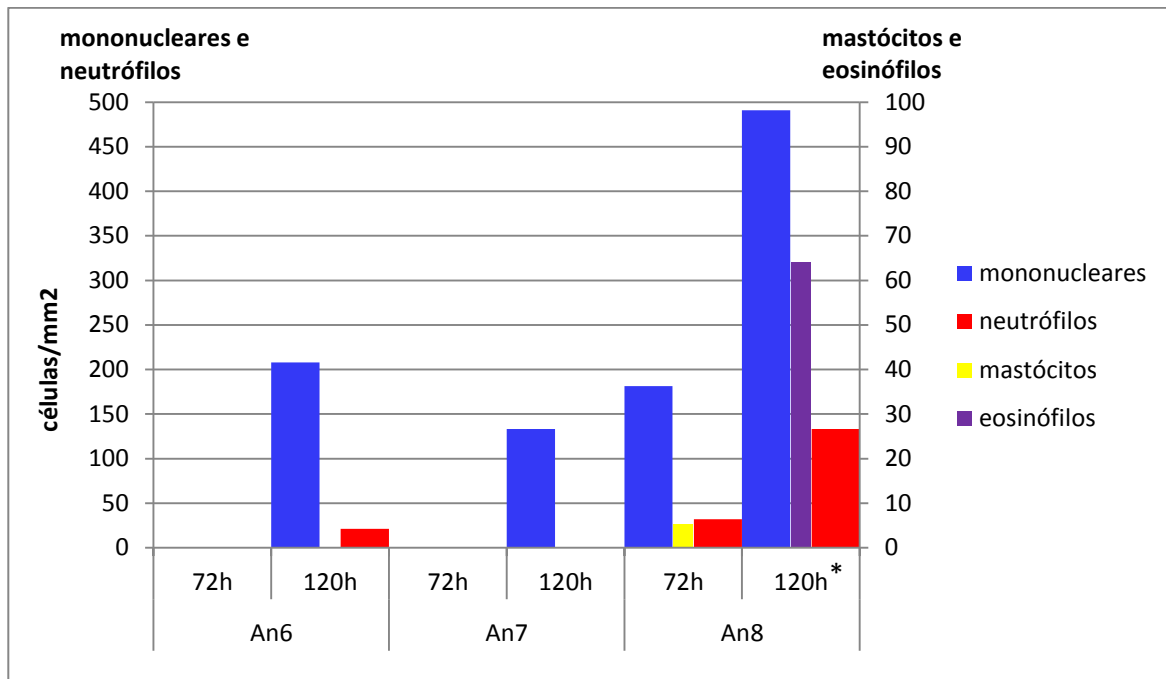
**Tabela 5.** Contagens global e diferencial das células no ponto de fixação do *R. sanguineus* em diferentes tempos pós-liberação em cães controle. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, Jaboticabal-SP, 2015.

Tempo (h)	neutrófilos	mononucleares	mastócitos	eosinófilos	Total de células por mm <sup>2</sup>
<b>72 (n=3)</b>	10,67 $\pm$ 18,47 <sup>a</sup>	60,43 $\pm$ 104,67 <sup>a</sup>	1,76 $\pm$ 3,05 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	72,85 $\pm$ 126,18 <sup>a</sup>
<b>120 (n=3)</b>	51,52 $\pm$ 71,70 <sup>a</sup>	277,33 $\pm$ 188,54 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	21,33 $\pm$ 36,95 <sup>a</sup>	350,19 $\pm$ 296,47 <sup>a</sup>

n=número de amostras; Médias em uma coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ )



**Figura 13.** Contagem global e diferencial das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus* em diferentes tempos pós-liberação em cães vacinados. (\*): médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

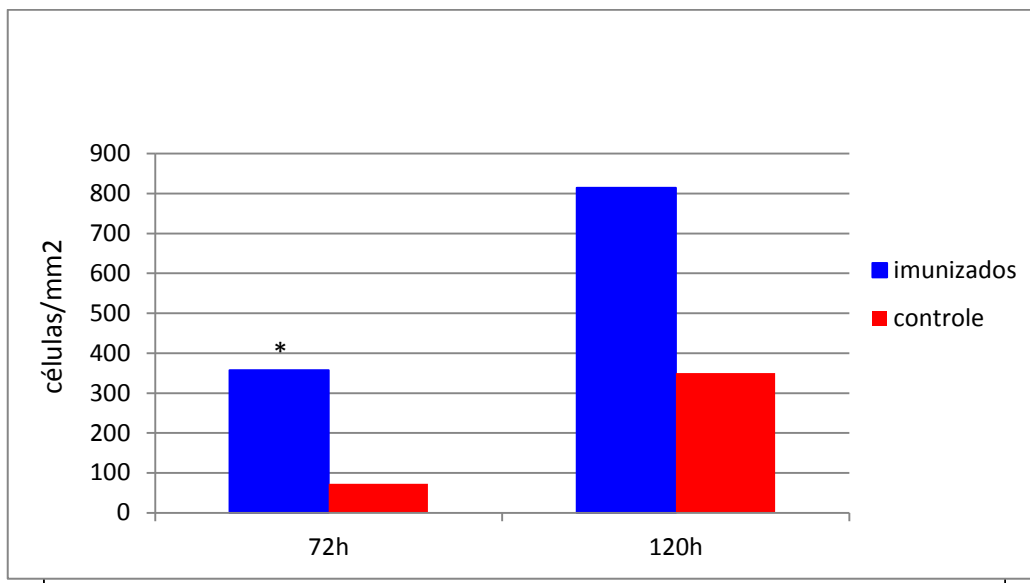


**Figura 14.** Contagem global e diferencial das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus* em diferentes tempos pós-liberação em cães controles. (\*): médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6.** Comparação entre a contagem global das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus* em diferentes tempos pós-liberação em cães imunizados e controles. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, Jaboticabal-SP, 2015

Tempo (h)	Total de células/mm <sup>2</sup> grupo imunizado	Total de células/mm <sup>2</sup> grupo controle
72 (n=3)	357,28 $\pm$ 50,92 <sup>a</sup>	72,85 $\pm$ 126,18 <sup>b</sup>
120 (n=3)	814,13 $\pm$ 404,27 <sup>a</sup>	350,19 $\pm$ 296,47 <sup>a</sup>

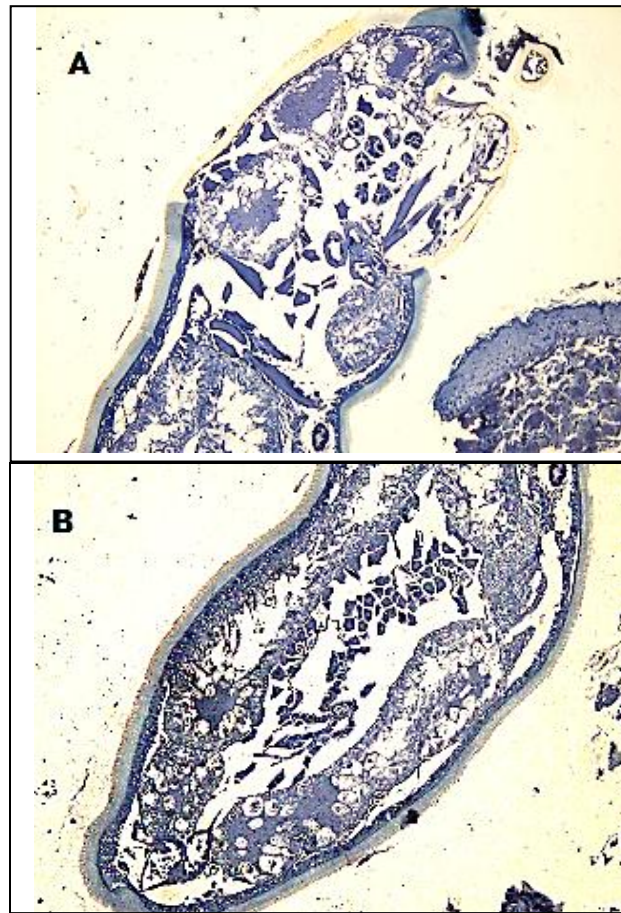
n= número de amostras; Médias em uma linha seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).



**Figura 15.** Comparação entre a contagem global das células da área de fixação do carrapato *R. sanguineus* em diferentes tempos pós-liberação em cães imunizados (G1) e controles (G2). (\*): médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4. Ensaio Imunohistoquímico

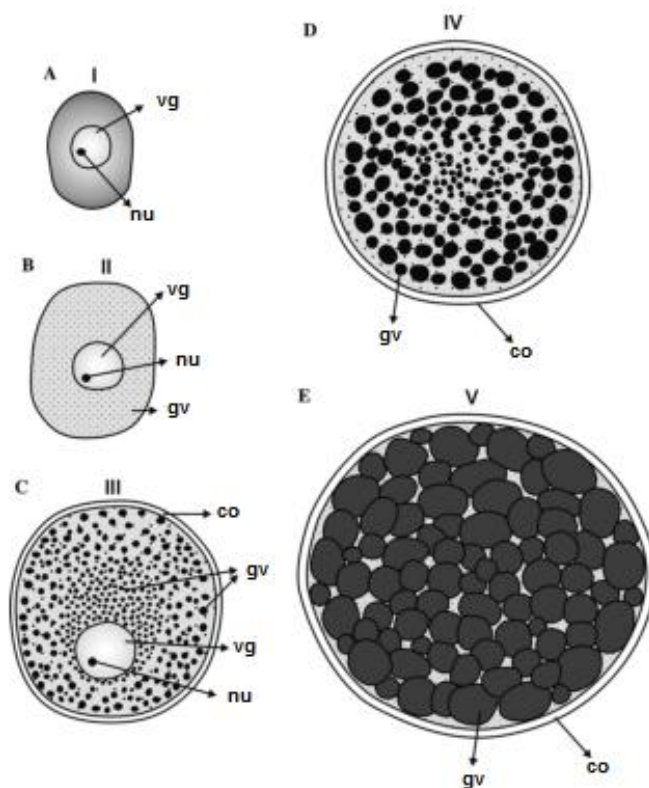
O ensaio imunohistoquímico foi realizado para identificar possíveis sítios antigênicos no tecido dos carrapatos alimentados em animais vacinados. No entanto, os resultados obtidos foram negativos, ou seja, nenhuma imunomarcção evidente foi observada, conforme demonstrado na **Figura 16**.



**Figura 16.** Fotomicrografia da técnica de imunohistoquímica com a contra coloração com hematoxilina de Harris de carrapato *R. sanguineus* alimentado em animal vacinado. A- porção anterior do carrapato *R. sanguineus*; B- porção posterior do *R. sanguineus*. Escala = 100 $\mu$ m.

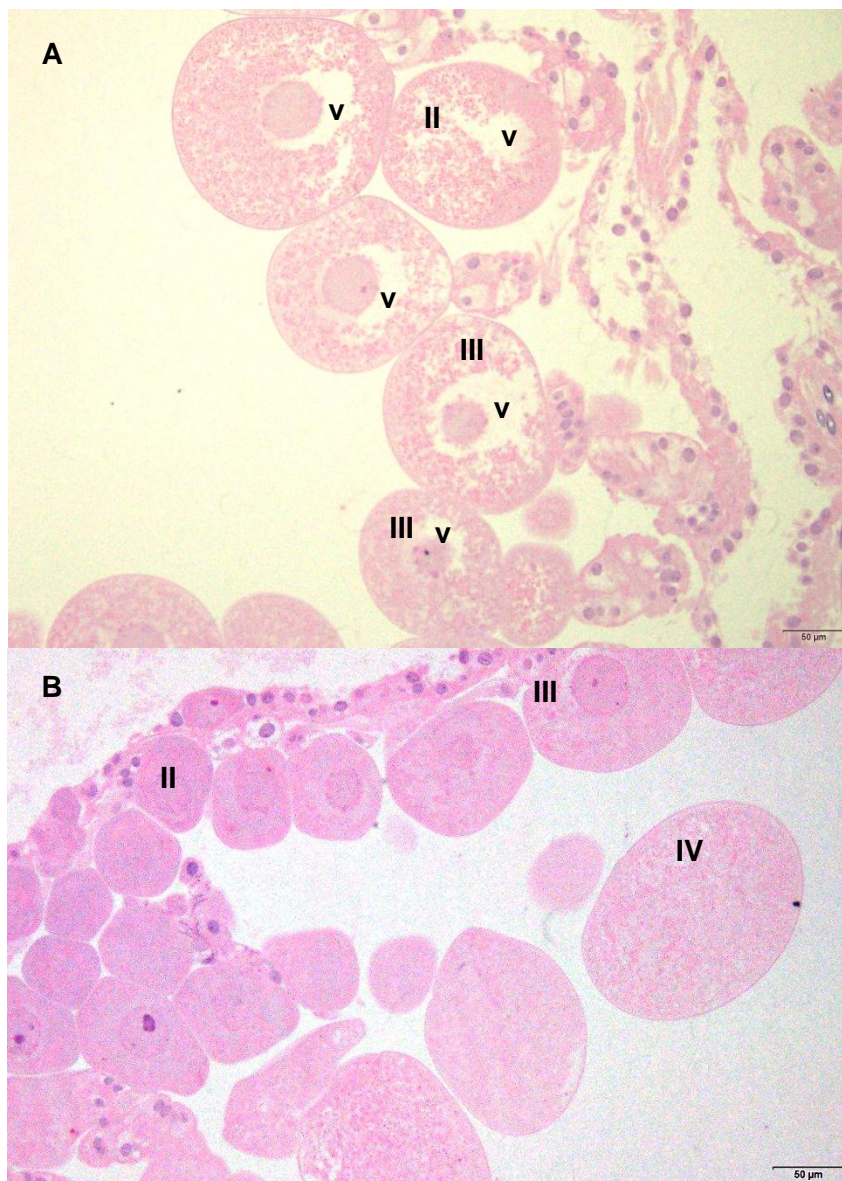
### 5.5. Histologia dos ovários de fêmeas de carrapatos ingurgitadas

Análise histológica dos ovários de fêmeas de carrapatos ingurgitadas demonstrou maior quantidade de vacuolização em ovócitos II e III dos ovários de fêmeas alimentadas em animais vacinados, em comparação aos de animais não vacinados (**Figura 17a**). Também foi observado maior número de deformações em ovócitos IV e V em ovários de fêmeas alimentadas em animais imunizados (**Figura 17b**).



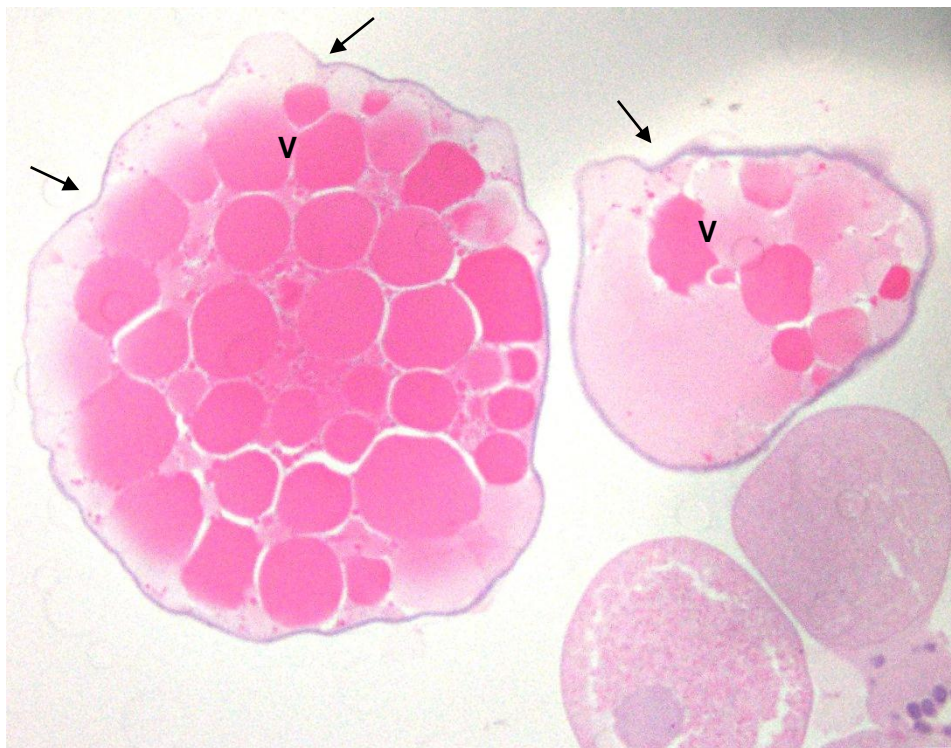
**Figura 17.** Resumo esquemático da vitelogênese em secção ovariana de *Rhipicephalus sanguineus*. A= ovócito I, B= ovócito II, C= ovócito III, D= ovócito IV e E= ovócito V. vg, vesícula germinal; nu, nucléolo; gv, grânulos de vitelo; co, córion. Imagem adaptada de Oliveira et al. (2005b).





**Figura 18a.** A- Fotomicrografia de ovócitos II e III de ovário de fêmea alimentada em cão vacinado; B- Fotomicrografia de ovócitos II, III e IV de ovário de fêmea alimentada em cães não vacinados; II = ovócitos II; III= ovócitos III; IV= ovócitos IV; v= vacuolização. Escala: A= 50µm; B= 50µm





**Figura 18b.** Fotomicrografia de ovócitos V de ovário de fêmea alimentada em cão vacinado, setas apontam deformações no córion dos ovócitos. Escala: 50 $\mu$ m.

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar em cães domésticos uma proteína recombinante de aquaporina do carrapato do boi *R. (B.) microplus*, a *RmAQP1*, como antígeno em uma vacina contra o carrapato do cão *R. sanguineus*. A avaliação incluiu: 1) Comparações entre o potencial biótico de carrapatos alimentados em animais imunizados; 2) Determinação do título de anticorpos séricos (IgG) por meio do Teste ELISA; 3) Avaliação histopatológica do sítio de fixação dos carrapatos na pele dos cães; 4) Avaliação histopatológica dos ovários de carrapatos alimentados em cães vacinados e não vacinados, e; 5) Localização dos sítios de ligação do antígeno no corpo do carrapato por meio de ensaio imunohistoquímico.

Dentre os parâmetros biológicos analisados no presente estudo, os carrapatos adultos apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos imunizado e controle somente no que se refere ao período de ingurgitamento, sendo o do grupo imunizado 12% menor que o do grupo controle. Assim, os resultados obtidos sugerem baixo potencial imunogênico do antígeno em cães contra carrapatos adultos, na dose utilizada. Resultados diferentes foram observados por Guerrero et al.(2014) em estudo conduzido em Campo Grande, MS, utilizando-se a proteína recombinante de aquaporina *RmAQP1* contra *R. (B.) microplus* em bovinos. Neste estudo os pesquisadores observaram grande diminuição na taxa de recuperação de carrapatos dos animais imunizados, sendo esta equivalente a 29% do que foi recuperado no grupo controle. Os resultados obtidos indicaram eficácia de 76% e 73% da vacina nos dois ensaios realizados, respectivamente, independente de os efeitos sobre a produção e eclodibilidade de ovos terem sido insignificantes. A fórmula utilizada para cálculo da eficiência da vacina neste estudo foi:  $100 \times [1 - (NFA \times PTOF \times Ecl)]$ , onde NFA = número de fêmeas adultas; PTOF = peso total dos ovos de cada fêmea; e Ecl = % de ovos eclodidos.

Em outro estudo, uma aquaporina de *I. ricinus*, *IraQP1*, foi avaliada quanto à sua eficácia em ensaios de alimentação in vivo, seguido por interferência por dsRNA,

e seu efeito manifestado por meio de redução de peso significativo em carrapatos tratados, devido à redução do repasto sanguíneo. Entretanto, reduções na mortalidade carrapato adulto não foram observados. (CAMPBELL et al., 2010).

As divergências apresentadas entre os diferentes estudos com estas aquaporinas podem ser devido a inúmeros fatores, entre eles: a) no presente estudo foi utilizada uma proteína de aquaporina de *R. (B.) microplus* contra *R. sanguineus* enquanto no trabalho de Guerrero et al. (2014), esta proteína foi utilizada contra o próprio *R. (B.) microplus*; e b) a dose da proteína utilizada no presente estudo pode ter sido insuficiente para gerar imunidade em cães; c) as proteínas de aquaporina de *R. (Boophilus) microplus* e *I. ricinus* testadas podem pertencer a diferentes famílias uma vez que elas apresentam diferentes padrões de expressão nos tecidos do carrapato.

Em relação aos parâmetros biológicos das larvas e ninfas analisados no presente trabalho, observou-se que estas apresentaram diferenças significativas entre os grupos no que se refere aos seus períodos de ingurgitamento e no peso pós-ingurgitamento. Apesar de as larvas do grupo imunizado apresentarem período de ingurgitamento 8,7% maior que as do grupo controle, elas pesaram 7,2% menos. Já as ninfas do grupo imunizado apresentaram período de ingurgitamento 4,5% menor e pesaram 3,6% menos que as do grupo controle. Estes resultados sugerem um possível efeito do antígeno contra larvas e ninfas de *R. sanguineus*, na dose utilizada.

A análise histopatológica do sítio de fixação dos carrapatos nos cães foi realizada por meio de microscopia de luz para avaliação dos aspectos gerais da lesão e contagem global/diferencial das células inflamatórias infiltrantes, e assim possivelmente fornecer indícios dos mecanismos envolvidos na indução de imunidade, ou não, nos animais vacinados com a proteína *RmAQP1*. As alterações gerais observadas incluíram espessamento da epiderme (hiperplasia), infiltração celular inflamatória, edema de derme e neovascularização, dentre outros, o que na verdade representam aspectos inespecíficos presentes em uma reação inflamatória. Estes achados podem ser justificados, em parte, pela ruptura da epiderme decorrente da fixação do carrapato, assim como pela inoculação de enzimas líticas, como esterases,

presentes na saliva do ectoparasito (KEMP et al., 1982) e pelo antígeno inoculado. Os tipos celulares identificados e contados por meio de uma quadrícula acoplada à ocular do microscópio foram os neutrófilos e eosinófilos, mastócitos, e os macrófagos, plasmócitos e linfócitos, estes últimos englobados em um único grupo e computados apenas como mononucleares (MN) devido à dificuldade de identificação exata desses tipos celulares através das técnicas adotadas (SZABÓ, 1995).

De forma geral, processo inflamatório moderado foi observado nos animais do grupo imunizado em todos os tempos avaliados. Contrariamente, os animais analisados do grupo controle apresentaram, de forma geral, ausência de reação inflamatória ou discreta infiltração celular no sítio de fixação dos carrapatos. De todos os animais analisados, apenas um apresentou reação inflamatória intensa (no tempo 120hr pós-fixação) com predomínio de neutrófilos, sendo este pertencente ao grupo imunizado. Ademais, diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos experimentais ao se comparar a contagem global de células inflamatórias presentes no sítio de fixação dos carrapatos 72 horas pós-liberação dos mesmos. Estes achados sugerem que, apesar de os animais imunizados apresentarem maiores reações inflamatórias à infestação por carrapatos, quando comparados com os animais controle, essas reações não pareceram interferir com a alimentação e reprodução dos ectoparasitos adultos.

Na contagem diferencial das células infiltrantes no processo inflamatório desencadeado pela infestação com carrapatos observou-se predomínio de células MN, menor número de neutrófilos, presença esporádica de eosinófilos e raros mastócitos. Ressalte-se que apenas o animal do grupo imunizado que apresentou intensa reação inflamatória no tempo 120hr apresentou intenso infiltrado neutrofílico. Assim, os elevados desvios padrão observados na contagem diferencial das células evidenciam a variação individual de cada animal. Resultados contrários ao do presente estudo foram observados por Szabó (1995) e Szabó e Bechara (1999) que, ao analisar os sítios de fixação de *R. sanguineus* em cães, constataram grande predominância de neutrófilos no tecido lesionado até 96 horas pós-fixação do ectoparasito, independente do número de infestações realizadas. Destaque-se, todavia, que as condições

experimentais (infestações sucessivas) diferiam das do presente trabalho (infestação desafio pós-vacinação). Finalmente, o elevado número de células mononucleares e fibroblastos, além de neoformação vascular (neovasos) encontradas no presente trabalho podem ser indicativos de que a reação inflamatória presente na pele dos animais já encontrava-se em processo de resolução (McKAY; SEDGWICK,1985; GILROY; DE MAEYER, 2015).

Para realização do teste Elisa, concentração ótima de diluição dos soros foi estabelecida testando-se soros a 1:50,1:100,1:200 e 1:400,sendo a diluição 1:50 a escolhida. A concentração do antígeno testado (10 µg de antígeno/mL), por sua vez, foi determinada pelos seus fornecedores.

No grupo imunizado, a análise da média dos títulos de anticorpos referentes à última diluição de soro com densidade ótica média maior do que três vezes a média do grupo controle negativo revelou que, apesar de os animais apresentarem um aumento na titulação de anticorpos pós-segunda imunização, estes títulos rapidamente diminuíram. Ademais, análise individual de cada cão imunizado demonstrou que apenas dois dos cinco animais testados de fato apresentaram considerável aumento na titulação de anticorpos pós-segunda imunização, que decaiu pós-terceira imunização. Estes resultados sugerem baixa eficácia do antígeno, na dose utilizada. No entanto, resultados diferentes foram observados em teste Elisa realizado no estudo conduzido por Guerrero et al. (2014). Neste, os animais imunizados com o antígeno de aquaporina de *R. (B.) microplus* apresentaram maior elevação nos títulos de anticorpos, e estes se mantiveram elevados pós terceira imunização.

O ensaio imunohistoquímico foi realizado com a finalidade de possivelmente identificar componentes antigênicos no tecido dos carrapatos alimentados em animais vacinados. No entanto, os resultados obtidos foram negativos, sugerindo que, na dose utilizada, o *RmAQP1* foi ineficaz contra carrapatos adultos.

Análise histológica dos ovários de carrapatos alimentados em animais vacinados e não vacinados evidenciou maior presença de vacuolização em ovócitos II e III e maior número de ovócitos IV e V deformados em ovários de carrapatos alimentados em cães vacinados, em comparação com os de animais não vacinados. Entretanto,

esses achados não comprometeram o potencial biótico dos carrapatos alimentados em animais imunizados, demonstrando mais uma vez que o *RmAQP1* não conferiu imunidade aos cães.

No estudo conduzido por Guerrero et al. (2014) em que se testou o potencial imunogênico da proteína recombinante de aquaporina contra *R. (B.) microplus* em bovinos, foi administrado, em cada animal, 2 mL contendo 100 µg de *RmAQP1* + Montanide. Para adequação da dose do antígeno para o tamanho do hospedeiro, no presente estudo foi administrado em cada cão apenas 1 mL, por imunização, contendo 10 µg de *RmAQP1*, o que aparentemente pode ter sido uma dose ineficiente para induzir eficácia do mesmo no controle de carrapatos adultos apesar de alterações encontradas nos ovários de fêmeas alimentadas em animais vacinados. Destaque-se ainda que resultados significativos foram encontrados em larvas e ninfas através de análise de seus parâmetros biológicos, indicando possível eficácia do antígeno nesses instares.

Pelos resultados expostos, sugere-se que novos estudos sejam realizados empregando-se dose maior do antígeno *RmAQP1*, para uma melhor avaliação de seu potencial imunogênico contra *R. sanguineus* em cães.

## 7. CONCLUSÕES

- Os parâmetros biológicos analisados indicaram que o antígeno *RmAQP1* apresentou baixo potencial imunogênico contra carrapatos *R. sanguineus* adultos em cães domésticos, na dose utilizada;
- Os parâmetros biológicos analisados indicaram que o antígeno *RmAQP1* apresentou eficácia, embora baixa, contra larvas e ninfas de *R. sanguineus* em cães domésticos, na dose utilizada;
- Avaliação histopatológica do sítio de fixação dos carrapatos evidenciou aspectos inespecíficos presentes em uma reação inflamatória;
- Teste Elisa demonstrou que os cães apresentaram aumento de títulos de anticorpos pós-segunda imunização, porém estes títulos rapidamente diminuíram;
- Ensaio imunohistoquímico apresentou resultados negativos sugerindo que, na dose utilizada, o *RmAQP1* foi ineficaz contra carrapatos adultos;
- Análise da histologia de ovários de fêmeas alimentadas em cães imunizados demonstrou maior número de vacuolizações em ovócitos II e III e maior número de deformações no córion de ovócitos IV e V, porém, sem interferir com a capacidade reprodutiva das carrapatos;
- As análises realizadas indicam que, na dose utilizada, o *RmAQP1* foi ineficaz contra carrapatos *R. sanguineus* em cães domésticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, M. S.; FAHMY, M. M.; AGGOUR, M. Trials for control of ixodid ticks using pheromone acaricide tick decoys. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, v. 28, p. 551–57, 1998.
- AGBEDE, R. I. S.; KEMP, D. H. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: histopathology of ticks feeding on vaccinated cattle. **Intern. J. Parasitol.**, v.16, n.1, p.35-41, 1986.
- AGUIRRE; A. A. R.; LOBO, F. P.; CUNHA, R. C.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R. Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. **Veterinary Parasitology**, v. 221, p. 30-38, 2016.
- ALLAN, S. A.; SONENSHINE, D. E.; BURRIDGE, M. J. Tick pheromones and uses thereof. *U.S. Patent No.* 6331297, 2001.
- ALEXANDER, JO´D. The physiology of itch. **Parasitol. Today**. v. 2, p. 345-51, 1986.
- ALLEN, J. R. Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. **Int. J. Parasitol.**, v. 3, p.195-200, 1973.
- ALLEN, J. R.; KHALIL, H. M.; WIKEL, S. K. Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick-resistant guinea pigs. **J. Immunol.**, v. 122, p. 563-65, 1979a.
- ALLEN, J. R.; HUMPHEYS, S. J. Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. **Nature**, v. 280, p. 491-3, 1979b.
- ALIM, M. A.; DAS, S.; ROY, K.; MASUDUZZAMAN, M.; SIKDER, S.; HASSAN M. M.; SIDDIKI, A. Z.; HOSSAIN, M. A. Prevalence of hemoprotozoan diseases in cattle population of Chittagong division, Bangladesh. **Pakistan Vet. J.**, v. 32, n. 2, p. 221–224, 2012.
- 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, p. 1492–1501, 2003.
- AMAKIRI, S. F. Arteriovenous anastomoses in the skin of tropical cattle. **Acta Anat.**, Basel, v. 96, p. 285-300, 1976.



- APANASKEVICH, D. A.; HORAK, I. G.; MULUMBA-MFUMU, L. K. A new species of *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae), a parasite of red river hogs and domestic pigs in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 3, p. 479-484, 2013.
- AROCHA-PIÑANGO, C. L.; MARCHI, R.; CARVAJAL, Z.; GUERRERO, B. Invertebrate compounds acting on the hemostatic mechanism. **Blood Coag Fibrinolysis**, v. 10, p. 43-68, 1999.
- ASKENASE, P. W. Role of basophils, mast cells and vasoamines in hypersensitivity reaction with a delayed time course. **Progressin Allergy**, v. 23, p. 199-320, 1977.
- AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, p. 179-186, 1998.
- BEATI, L.; KEIRANS, J. E. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12s ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **J. Parasitol.**, v.87, p. 32-48, 2001.
- BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; MUKAI, L. S.; ROSA, P. C. S. Immunization of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unfed adult tick extracts. **Vet. Parasitol.**, v. 52, p. 79-90, 1994.
- BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J.; FERREIRA, B. R.; GARCIA, M. V.; *Rhipicephalus sanguineus* in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 4, n. 2, p. 61-66, 1995.
- BEITZ, E.; WU, B.; HOLM, L. M.; SCHULTZ, J. E.; ZEUTHEN, T. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, p. 269-274, 2006.
- BELLEGARD, M.; MOOLHUIJZEN, P. M.; GUERRERO, F. D.; SCHIBECI, D.; RODRIGUEZ-VALLE, M.; PETERSON, D. G.; DOWD, S. E.; BARRERO, R.; HUNTER, A.; MILLER, R. J.; LEW -TABOR, A. E. Cattle Tick Base: An integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Int. J. Parasitol.**, v. 42, p. 161-169, 2012.
- BENSACI, M.; BHATTACHARYA, D.; CLARK, R.; HU, L. T. Oral vaccination with vaccinia virus expressing the tick antigen subolesin inhibits tick feeding and transmission of *Borrelia burgdorferi*. **Vaccine**, v. 30, p. 6040-6046, 2012.

BISHOP, R.; LAMBSON, B.; WELLS, C.; PANDIT, P.; OSASO, J.; NKONGE, C.; MORZARIA, S.; MUSOKE, A.; NENE, V. A cement protein of the tick *Rhipicephalus appendiculatus*, located in the secretory cell granules of the type III salivary gland acini, induces strong antibody responses in cattle. **Int J Parasitol.**, v. 32, p. 833–842, 2002.

BLANC, G.; CAMINOPETROS, J. La transmission du Kala – Azar mériditerranéen par une tique: *Rhipicephalus sanguineus*. **C. R. Acad. Sci.**, v. 191, p. 1162–1164, 1930.

BORGNIA, M.; NIELSEN, S.; ENGEL, A.; AGRE, P. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. **Annu Rev Biochem.**, v. 68, p. 425-58, 1999.

BLOUNT, D. G.; PRITCHARD, D. I.; HEATON, P. R. Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.108, n. 3–4, p. 399–407, 2005.

BOWMAN, A. S.; COONS, L. B.; NEEDHAM, G. R.; SAUER, J. R. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p. 227–85, 1997.

BROWN, S. J.; GALLI, S. J.; GLEICH, G. J.; ASKENASE, P. W. Ablation of immunity to *Amblyomma americanum* by anti-basophil serum: cooperation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in guinea pigs. **J. Immunol.**, v. 129, p. 790-96, 1982.

BROWN, S. J.; BARKER, R. W.; ASKENASE, P. W. Bovine resistance to *Amblyomma americanum* ticks: An acquired immune response characterized by cutaneous basophil infiltrates. **Veterinary Parasitology**, v. 16, p. 147-65, 1984.

BROWN, S. J. Western blot analysis of *Amblyomma americanum*-derived stage specific and shared antigens using serum from guinea-pigs expressing resistance. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 28, p. 163-171, 1988.

BROSSARD, M. Rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L.: effects of mepyramine on acquired resistance. **Experientia**, v. 38. p. 702-704, 1982.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsiosis en Mexico. **Rev. Inst. Salub. Enferm. Trop.**, v. 8, p. 3–14, 1947.

CAMICAS, J. L.; HERVY, J. P.; ADAM, F.; MOREL, P. C. **Les Tiques du Monde**. Paris: Éditions de l'Orstom, Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, 223p., 1998.

CAMPBELL, E.M.; BURDIN, M.; HOPPLER, S.; BOWMAN, A.S. Role of an aquaporin in the sheep tick *Ixodes ricinus*: Assessment as a potential control target. **Int J Parasitol.**, v. 40, p. 15-23, 2010.

CANALES, M.; NARANJO, V.; ALMAZÁN, C.; MOLINA, R.; TSURUTA, S. A.; SZABÓ, M. P. J.; MANZANO-ROMAN, R.; PÉREZ DE LA LASTRA, J. M.; KOCAN, K. M.; JIMÉNEZ, M. I.; LUCIENTES, J.; VILLAR, M.; DE LA FUENTE, J.. Conservation and immunogenicity of the mosquito ortholog of the tick protective antigen, subolesin. **Parasitol. Res.**, v. 105, p. 97–111, 2009.

CHABAUD, A. G. L'infestation par des ixodidés provoque-t-elle une immunité chez l'hôte (2me note). **Ann. Parasit. Hum. Comp.**, v. 25, p. 474–479, 1950.

COUTINHO, M. T.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: *Ixodidae*) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol.**, v. 128, p. 149–155, 2005.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: *Ixodidae*), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Rocky Mountain spotted fever. **Lancet Infect. Dis.**, v. 7, p. 724–732, 2007.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: *Ixodidae*): From taxonomy to control. **Vet Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, 2008.

DANTAS-TORRES F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends Parasitol.**, v. 27, p. 155–159, 2011.

DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M. S.; ANNOSCIA, G.; GIANNELLI, A.; PARISI, A.; OTRANTO, D. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. **Parasit Vectors.**, v. 6, p. 213, 2013.

DE CASTRO, J. J. Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. **Vet Parasitol.**, v. 71, n. 2–3, p. 77–97, 1997.

DE LA FUENTE, J.; MORENO-CID, J. A.; CANALES, M.; VILLAR, M.; PÉREZ DE LA LASTRA, J. M.; KOCAN, K. M.; GALINDO, R. C.; ALMAZÁN, C.; BLOUIN, E.F. Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. **Vet. Parasitol.**, v. 181, p.17–22, 2011.

DE LA FUENTE, J.; MORENO-CID, J. A.; GALINDO, R. C.; ALMAZÁN, C.; KOCAN, K. M.; MERINO, O.; PEREZ DE LA LASTRA, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A.; BLOUIN, E. F. Subolesin/Akirin vaccines for the control of arthropod vectors and vector-borne pathogens **Transbound Emerg Dis.**, v. 60, n. 2, p. 172–178, 2013.

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; CONTRERAS, M. Prevention and control strategies for ticks and pathogen transmission. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 34 n. 1, p. 249-264, 2015.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON J. R. J.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L.; MCQUISTON, J. H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p. 587–594, 2005.

DENHOLLANDER, N.; ALLEN, J. R. *Dermacentor variabilis*: resistance to ticks acquired by mast cell-deficient and other strains of mice. **Exp Parasitol.**, v.59, n.2, p.169–179, 1985.

DENKER, B. M.; SMITH, B. L.; KUHAJDA, F. P.; AGRE, P. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from Erythrocytes and renal tubules. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 15634-15642, 1988.

DVORAK, H. F.; DVORAK, A. M.; SIMPSON, B. A.; RICHARDSON, H. B.; LESKOWITZ, S.; KARNOVSKY, M. J. Cutaneous basophil hypersensitivity. 11. A light and electron microscopic description. **J Exp. Med.**, v. 132, p. 558-582, 1970.

ESTRADA-PEÑA, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting *Ixodoidea* with special reference to pathogen transmission. **Experimental and Applied Acarology**, v. 23, p. 685-715, 1999.

ÉVORA, P. M.; SANCHES, G. S.; JUSI, M. M. G.; ALVES, L. B. R.; MACHADO, R. Z.; BECHARA, G. H. Lack of acquired resistance in dogs to successive infestations of *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Argentina,. **Experimental and Applied Acarology**, v. 67, n. 1, p. 135-146, 2015.

FELDMAN-MUHSAM, B. The *Rhipicephalus sanguineus* complex. **Vector Biology and Control**, v. 68, n. 57, p. 113-120, 1967.

FU, D.; LIBSON, A.; MIERCKE, L. J.; WEITZMAN, C.; NOLLERT, P.; KRUCINSKI, J.; STROUD, R .M. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. **Science**, v. 290, p. 481-486, 2000.

- FURLONG, J. **Carrapatos dos bovinos: conheça bem para controlar melhor**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 46), 21p. 1998.
- GARCIA-GARCIA, J. C.; GONZALEZ, I. L.; GONZALEZ, D. M.; VALDES, M.; MENDEZ, L.; LAMBERTI, J.; D'AGOSTINO, B.; CITRONI, D.; FRAGOSO, H.; ORTIZ, M.; RODRIGUEZ, M.; DE LA FUENTE, J. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 23, n. 11, p.883-895, 1999.
- GARCIA-GARCIA, J. C.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; VARGAS, M.; CANALES, M.; BOUE, O.; RODRIGUEZ, M.; JOGLAR, M.; MACHADO, H.; GONZALEZ, I. L.; VALDES, M.; MENDEZ, L.; DE LA FUENTE, J. 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, 2000.
- GEER, L. Y.; MARCHLER-BAUER, A.; GEER, R. C.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; LIU, C.; SHI, W.; BRYANT, S. H. The NCBI BioSystems database. **Nucleic Acids Res.** v. 38, p. 492-496, 2010.
- GHOSH, S; AZHAHIANAMBI, P; YADAV, M. P. Upcoming and future strategies of tick control: a review. **J. Vector Borne Dis.**, v. 44, n. 2, p.79-89, 2007.
- GILROY, D. W.; DE MAEYER, R. New insights into the resolution of inflammation. **Semin. Immunol.** v.3, p.161-168, 2015.
- GONEN, T.; WALZ, T. The structure of aquaporins. **Q Rev Biophys.**, v. 39, n. 4, p. 361-396, 2006.
- GRAY, J.; DANTAS-TORRES, F.; ESTRADA-PEÑA, A.; LEVIN, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks Tick Borne Dis.** v. 4, n. 3, p.171-180, 2013.
- GUERRERO, F. D.; MILLER, R. J.; ROUSSEAU, M. E.; SUNKARA, S.; QUACKENBUSH, J.; LEE, Y.; NENE, V. BmiGI: a database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, p. 585-595, 2005.
- GUERRERO, F. D.; MOOLHUIJZEN, P. M.; PETERSON, D. G.; BIDWELL, S.; CALER, E.; APPELS, R.; BELLGARD, M.; NENE, V. M.; DJIKENG, A. Reassociation kinetics-based approach for partial genome sequencing of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 374, 2010.

GUERRERO, F. D.; ANDREOTTI, R.; BENDELE, K. G.; CUNHA, R. C.; TEMEYER, K. B.; PÉREZ DE LEON, A. A. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin is an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 475, 2014.

GUERRERO, F. D.; PEREZ DE LEON, A. A.: **Vaccination of animals to elicit a protective immune response against tick infestations and tick-borne pathogen transmission**. U. S. Patent 8,722,063, May 13, 2014.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBINS, R. G. **Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical zoogeographic region**. Resumos: Atlanta: International Consortium on Ticks and Tick-borne Disease, 2003. 173p

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, n. 6, p. 1-28, 2010.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G. **The hard ticks of the world (Acari: Ixodida: Ixodidae)**. Springer, Dordrecht, 2014.

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. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 106, p. 1033–1038, 2009.

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, p. 2993–2998, 2010.

HAMILTON, J.; SONENSHINE, D. E. Methods and apparatus for controlling arthropod populations. *U.S. Patent No.* 4884361, 1989.

HOGENESCH, H.; THOMPSON, S.; DUNHAM, A.; CEDDIA, M.; HAYEK, M. Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 94, n. 1-2, p. 77-85, 2004.

HOOGSTRAAL, H. **African Ixodidae. I. Ticks of the Sudan (with special reference to Equatoria Province and with preliminary reviews of the genera *Boophilus*, *Margaropus* and *Hyaloma***. Washington DC: Department of the Navy, Bureau of Medicine and Surgery, 1101p., 1956.

HORAK, I. G.; APANASKEVICH, D. A.; KARIUKI, E. K. A new species of *Rhipicephalus* (Acari: *Ixodidae*), a parasite of giraffes in Kenya. **Journal of Medical Entomology**, v. 5, n. 4, p. 685-690, 2013.

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, p. 618, 2015.

JITTAPALAPONG, S.; STICH, R. W.; GORDON, J. C.; WITTUM, T. E.; BARRIGA, O. O. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: *Ixodidae*) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. **J. Med. Entomol.**, v. 37, p. 601–611, 2000.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. *Parasitology* 129 (Suppl.), S3–S14. 2004.

KEMP, D. H.; STONE, B. F.; BINNINGTON, K. C. Tick attachment and feeding. Role of the mouth parts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response. In: OBENCHAIN, F. D.; GALUN, R., eds **Physiology of the ticks**, Oxford, Pergamon, p.119-68,1982.

KEMP, D. H.; AGBEDE, R. I. S.; JHONSTON, L. A. Y; COUGH, J. M. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. **Intern. J. Parasitol.**, v.16, p.115-120, 1986.

KIRKLAND, B. H.; WESTWOOD, G. S.; KEYHANI, N. O. Pathogenicity of Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to *Ixodidae* tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 41, n. 4, p. 705 -711, 2004.

KOBAYASHI, K.; KANEDA, K.; KASAMA, T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity, *Microsc. Res. Tech.*, v. 53, n. 4, p. 241-245, 2001.

KOCH, H. G. Oviposition of the brown dog tick (Acari: *Ixodidae*) in the laboratory. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 75, p. 583-586, 1982.

KRANTZ G. W.; WALTER, D. E. **A Manual of Acarology**. 3 Ed. Texas Tech University Press. Lubbock, Texas. 807 p., 2009.

LABRUNA, M. B.; GERARDI, M.; KRAWCZAK, F. S.; MORAES-FILHO, J. Comparative biology of the tropical and temperate species of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) under different laboratory conditions. **Ticks and tick borne diseases**, artigo na imprensa, 2016.

LABUDA, M.; NUTTALL, P. A. Tick-borne viruses. **Parasitology** 129 (Suppl.), S221–S245, 2004.

LEMOS, A. M. A resistência genética dos bovinos e o controle do carrapato. **Documento EMBRAPA/CNPGL**, Coronel Pacheco, v. 6, 42 pp, 1986.

LIMO, M. K.; VOIGT, W. P.; TUMBO-OERI, A. G.; NJOGU, R. M.; OLE-MOIYOI, O. K. Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Exp Parasitol**, v. 72, n. 4, p. 418-429, 1991.

MARIOTTE, C. O.; BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Hallazgo del *Rhipicephalus sanguineus* Latreille infectado naturalmente con fiebre manchada de las Montañas Rocosas, en Sonora (Mexico) **Rev. Inst. Salub. Enferm. Trop.** v. 5, p. 297–300, 1944.

MATSUDA, H.; FUKUI, K.; KISO, Y.; KITAMURA, Y. Inability of genetically mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice to acquire resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks. **J Parasitol.**, v. 71, n. 4, p. 443–448, 1985;

MATSUDA, H.; NAKANO, T.; KISO, Y.; KITAMURA, Y. Normalization of anti-tick response of mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice by intracutaneous injection of cultured mast cells. **J Parasitol.**, v. 73, n. 1, p. 155–160, 1987.

MATSUDA, H.; WATANABE, N.; KISO, Y.; HIROTA, S.; USHIO, H.; KANNAN, Y.; AZUMA, M.; KOYAMA, H.; KITAMURA, Y. Necessity of IgE antibodies and mast cells for manifestation of resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks in mice. **J Immunol.**, v. 144, n. 1, p. 259–262, 1990.

MATSUMOTO, K.; BROUQUI, P.; RAOULT, D.; PAROLA, R. Experimental infection models of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group with *Rickettsia conorii*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 5, p. 363-372, 2005.

McKAY, A.R., SEDGWICK, A.D. The transition from acute to chronic inflammation. **British Journal of Dermatology**, v.113, suppl.28, p.34-48, 1985

MEDEIROS-SILVA, V.; GURGEL-GONÇALVES, R.; NITZ, N.; MORALES, L. E.; CRUZ L.; SOBRAL, I. G.; BOITÉ, M. C.; FERREIRA, G. E.; CUPOLILLO, E.; ROMERO, G. A. Successful isolation of *Leishmania infantum* from *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) collected from naturally infected dogs. **BMC Vet. Res.** v. 11, p. 258, 2015.



- MENTEN-DEDOYART, C.; COUVREUR, B.; JOLOIS, O.; VAN LERBERGHE, P. B.; DUWEZ, L.; DRION, P.; HEINEN, E. Kinetic study of the antibody response during the blood meal of *Ixodes ricinus*: implication on plasma cell maturation in vivo and for anti-*Ixodes* vaccination. **Vaccine**, v. 29, n. 11, p. 2044-2050, 2011.
- MERINO, O.; ALMAZÁN, C.; CANALES, M.; VILLAR, M.; MORENO-CID, J. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J. Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks fed on cattle. **Vaccine**, v. 29, p. 2248–2254, 2011.
- MERINO, M.; ANTUNES, S.; MOSQUEDA, J.; MORENO-CID, J. A.; PÉREZ DE LA LASTRA, J. M.; ROSARIO-CRUZ, R.; RODRÍGUEZ, S.; DOMINGOS, A.; DE LA FUENTE, J. Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection, **Vaccine**, v. 31, p. 5889–5896, 2013.
- MORA HERNÁNDEZ, C. A. **Avaliação a campo do imunógeno recombinante rBm86 no controle do carrapato *Boophilus microplus***. 1996, 100f, Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.
- MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Genetic analysis of ticks belonging to *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, v. 117, p. 51-55, 2011.
- MORAES-FILHO, J.; KRAWCZAK, F. S.; COSTA, F. B.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. Comparative evaluation of the vector competence of four south american populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. **PLoS One**, v. 10, n. 9, 2015.
- MOREL, P. C.; VASSILIADES, G. Les *Rhipicephalus bergeoni* n. sp. (Acariens: Ixodoidea). **Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v. 15, p. 343-386, 1963.
- MORENO-CID, J. A.; PÉREZ DE LA LASTRA, J. M.; VILLAR, M.; JIMÉNEZ, M.; PINAL, R.; ESTRADA-PEÑA, A.; MOLINA, R.; LUCIENTES, J.; GORTÁZAR, C.; DE LA FUENTE, J. Control of multiple arthropod vector infestations with subolesin/akirin vaccines. **Vaccine**, v. 31, p. 1187–1196, 2013.
- MORRISON, W. I. Host effector mechanisms against parasites. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 25, p. 163-176, 1987.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH 1 and TH2 cells: differential patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.

MOSMANN, T. R.; MOORE, K. W. The role of IL-10 in crossregulation of T(H)1 and T(H)2 responses. **Parasitol. Today.**, v. 7, n. 3, p. 49-53, 1991.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today.**, v. 17, n. 3, p. 138-146, 1996.

MULENGA, A.; SUGIMOTO, C.; SAKO, Y.; OHASHI, K.; MUSOKE, A.; MORZARIA, S.; ONUMA, M. Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-Kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 1652–1658, 1999.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: *Ixodidae*). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 1, p. 169-172, 2003.

NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: *Ixodidae*) in the Southern Cone of South America. **Veterinary Parasitology**, v. 21, n. 3-4, p. 547-555, 2012.

NIJHOF, A. M.; BALK, J. A.; POSTIGO, M.; RHEBERGEN, A. M.; TAOUFIK, A.; JONGEJAN, F. Bm86 homologues and novel ATAQ proteins with multiple epidermal growth factor (EGF)-like domains from hard and soft ticks. **Int. J. Parasitol.**, v. 40, p. 1587–1597, 2010.

NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J. R. Significant changes in epidermal Langerhans cells of guinea-pigs infested with ticks (*Dermacentor andersoni*). **Immunology**, v. 51, p. 133-141, 1984a.

NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J. R. Effects of ultraviolet irradiation on epidermal Langerhans cells in guinea-pigs. **Immunology**, v. 51, p. 143-151, 1984b.

NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J. R. Effects of ultraviolet irradiation on the acquisition and expression of tick resistance in guinea-pigs. **Immunology**, v. 51, p. 153-159, 1984c.

NITHIUTHAI, S.; ALLEN, J. R. Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from tick sensitized guinea-pigs. **Immunology**, v. 55, p. 157-163, 1985.

OBEREM, P. T. The immunological basis of host resistance to ticks – a review. **J. of the S. Afr. Vet. Assoc.**, Pretoria, v. 55, n. 4, p. 215-217, 1984.

OLIVER, J. R. Biology and systematics of ticks (Acari: *Ixodidae*). **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 20, p. 397–430, 1989.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; SAITO, K. C.; NUNES, E. T.; SZABÓ, M. P. J.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Vet. Parasitol.**, v. 129, p. 139-147, 2005a.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; NUNES, E. T.; J.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 110, n.2, p. 146-156, 2005b.

OPDEBEECK, J. P. Vaccines against blood-sucking arthropods. **Vet. Parasitol.**, v. 54, p. 205-222, 1994.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tick borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 897– 928, 2001.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 719–756, 2005.

PATARROYO, J. H.; PORTELA, R. W.; CASTRO, R. O.; COUTO PIMENTEL, J.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; VARGAS, M. I.; PRATES, A. A.; MENDES, M. A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopatholog.**, v. 88, n. 3-4, p. 163-172, 2002.

PEGRAM, R. G.; CLIFFORD, C. M.; WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). Part II: *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. **Syst. Parasitol.**, v. 10, p. 27–44, 1987.

PENNA, V. M. *Boophilus microplus*: A resistência genética do hospedeiro como forma de controle. Cad. Esc. Téc. Vet. UFMG, v. 4, 1990. 65p.

PEREZ, M.; RIKISHA, Y.; WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2133-2139, 1996.

PEREZ-PEREZ, D.; BECHARA, G. H.; MACHADO, R. Z.; ANDRADE, G. M.; DEL VECCHIO, R. E. M.; PEDROSO, M. S.; HERNÁNDEZ, M. V.; FARNO'S, O. Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Vet Parasitol.**, v. 167, p. 321-326, 2010.

- PETROVA-PIONTKOVSKAYA, S. P. Comparative data on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* Latr. and *Rhipicephalus turanicus* Pom. under laboratory conditions. **Zool. Zh.**, v. 25, p. 173-176, 1947.
- POMERANTSEV, B. I.; MATIKASHVILY, N. V.; LOTOTSKY, B. V. An ecological and faunistic outline of *Ixodidae* ticks occurring in Transcaucasia. **Pazariologicheskii Sbornik**, v. 7, p. 100-133, 1940.
- RACHINSKY, A.; GUERRERO, F. D.; SCOLES, G. A. Differential protein expression in ovaries of uninfected and Babesia-infected southern cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 37, p. 1291-1308, 2007.
- RAND, K. N.; MOORE, T.; SRISKANTHA, A.; SPRING, K.; TELLAM, R.; WILLADSEN, P.; COBON, G. S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 86, n. 24, p. 9657–9661, 1989.
- RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 694–719; 1997.
- RIBEIRO, J. M. C.; MAKOUL, G. T.; LEVINE, J.; ROBINSON, D. R.; SPIELMAN, A. Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. **J. Exp. Med.**, v. 161, p. 332-344, 1985.
- RIBEIRO, J. M.; SPIELMAN, A. *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. **Exp Parasitol.**, v. 62, n. 2, p. 292-297, 1986.
- RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in tick-host interactions. **Exp. & Appl. Acarol.**, Amsterdam, v. 7, p. 15-20, 1989.
- RIBEIRO, J. M.; WEIS, J. J.; TELFORD, S. R. 3RD. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. **Exp. Parasitol.**, v. 70, n. 4, p. 382-388, 1990.
- RICHARDSON, M. A.; SMITH, D. R. J.; KEMP, D. H.; TELLAM, R. L. Native and baculovirus-expressed forms of the immunoprotective protein BM86 from *Boophilus microplus* are anchored to the cell membrane by glycosyl- phosphatidyl inositol linkage. **Insect Molecular Biology**, v.1, p. 139–147, 1993.
- RIEK, R. F. Factors influencing the susceptibility of cattle to tick infestation. **Aust. Vet. J.**, v. 32, p. 204-209, 1956.
- RIEK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with the tick *Boophilus microplus* (canestrini). **Austr. J. Agric. Res.**, v. 13, p. 532-552, 1962

ROCHA, U. F. Panoramas da Parasitologia na África e na Austrália. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 1976, 150p.

RODRIGUEZ-MALLON, A.; FERNÁNDEZ, E.; ENCINOSA, P. E.; BELLO, Y.; MÉNDEZ-PÉREZ, L.; RUIZ, L. C.; PÉREZ, D.; GONZÁLEZ, M.; GARAY, H.; REYES, O.; MÉNDEZ, L.; ESTRADA, M. P. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* **Vaccine**, v. 30, p. 1782–1789, 2012.

RODRIGUEZ-MALLON, A.; BECHARA, G. H.; MACHADO, R. Z. ; ORTIZ E. B.; SOTO RIVAS, J. L.; GOMEZ RAMIREZ A. P.; JAIME- OLAYA, J. A.; ESTRADA M. P. Inhibition of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis* transmission among co-feeding ticks on dogs vaccinated with Bm86 antigen. In: XII International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, 2013, Weimar. **Resumos...** Berlin: IJSTD, p. 123-123, 2013.

RODRIGUEZ, M.; RUBIERA, R.; PENICHER, M.; MONTESINOS, R.; CREMATA, J.; FALCON, V.; SANCHEZ, G.; BRINGAS, R.; CORDOVES, C.; VALDES, M.; LEONART, R.; HERRERA, L.; DE LA FUENTE, J. High level expression of the *Boophilus microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **J. Biotechnol.**, v. 33, p. 135–146, 1994.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; APANASKEVICH, D. A.; OJEDA-CHI, M. M.; TRINIDAD-MARTINEZ, I.; REYES-NOVELO, E.; ESTEVE-GASSENT, M. D.; PEREZ DE LEÓN, A. P. Ticks collected from humans, domestic animals, and wildlife in Yucatan, Mexico. **Vet. Parasitol.**, v. 215, p. 106-113, 2016.

ROHR, C. J. **Estudos sobre ixódidas do Brasil**. Rio de Janeiro: Gomes Irmãos, 220p, 1909.

ROJEK, A.; PRAETORIUS, J.; FROKIAER, J.; NIELSEN, S.; FENTON, R. A. A current view of the mammalian aqua glyceroporins. **Annu. Rev. Physiol.** v. 70, p. 301-327, 2008.

ROVEDA, R. J. Ixodoidea. Contribución biológica. **Revista de Medicina Veterinária**, Buenos Aires, v. 36, n. 1, p. 105-119, 1954.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 389-403, 2004

SANCHES, G.S.; ÉVORA, P. M.; MANGOLD, A. J.; JITTAPALAPONG, S.; RODRIGUEZ-MALLON, A.; GUZMÁN, P. E.; BECHARA, G.H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). **Vet Parasitol.** v. 215, p. 78-87, 2016.

SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C.; BOWMAN, A. S. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. **J Insect Physiol.**, v. 46, p. 1069-1078, 2000.

SCHREIBER, M.; KANTIMM, D.; KIRCHHOFF, D.; HEIMANN, G.; BHARGAVA, A. S. Concentrations in serum of IgG, IgM and IgA and their age-dependence in beagle dogs as determined by a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 30, p. 775–778, 1992.

SHAPIRO, S. Z.; VOIGT, W. P.; FUJISAKI, K. Tick antigens recognized by serum from guinea pig resistant to infestation with the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **J. Parasitol.**, v. 72, p. 454-463, 1986.

SONENSHINE D. **Biology of Ticks**, Vol. 1. New York: Oxford Univ. Press. 449 pp., 1991.

SONENSHINE, D.; HAMILTON, J. G. C.; LUSBY, W. R. The use of cholesteryl esters as mounting sex pheromones in combination with 2,6-dichlorophenol and pesticides to control ticks. *U.S. Patent No. 5149526*, 1992.

SONENSHINE, D. E.: Tick pheromones and their use in tick control. **Annu Rev Entomol.**, v. 51, p. 557-580. 2006

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. Overview. In: Sonenshine D. E., Roe R. M., editors. v. 1. **Biology of Ticks**. Oxford University Press; Oxford: p. 3–16, 2014.

SPRONG, H.; TRENTELMAN, J.; SEEMANN, I.; GRUBHOFFER, L.; REGO, R. O.; HAJDUŠEK, O.; WINTER, P. ANTIDotE: anti-tick vaccines to prevent tick-borne diseases in Europe. **Parasites & Vectors.**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2014.

STEEVES, E. B.; ALLEN, J. R. Tick resistance in mast cell-deficient mice: histological studies. **Int J Parasitol.**, v. 21, n. 2, p. 265–268, 1991.

SWEATMAN, G. K. Physical and biological factors affecting the longevity and oviposition of engorged *Rhipicephalus sanguineus*, 1967.

SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H. An insight into the histopathology caused by the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina: *Ixodidae*) in the skin of previously infested, vaccinated or tick-bite naive dogs, guinea pigs and hamsters. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 32, n. 1, p. 37–42, 1995.

SZABÓ, M. P. J.; MUKAI, L. S.; ROSA, P. C. S.; BECHARA, G. H. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters and guinea pigs to infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina: *Ixodidae*). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 32, n. 1, p. 43-50, 1995a.

SZABÓ, M. P. J.; MORELLI JUNIOR, J.; BECHARA, G. H. Cutaneous hypersensitivity induced by dogs and guinea-pigs by extracts of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Exp. Appl. Acarol.**, v. 19, p. 723-730, 1995b.

SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 23, p. 915-928, 1999.

SZABÓ, M. P. J.; MANGOLD, A. J.; JOÃO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 1, p. 131-140, 2005.

SZABÓ, M. P. J.; PASCOLI, G. V. T.; JÚNIOR, O. M.; FRANCHIN, A. G.; TORGA, K. Brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* parasitizing the bird *Coereba flaveola* in the Brazilian Cerrado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 543-545, 2008.

TAGLE, I. Presencia accidental de *Rhipicephalus sanguineus* en un perro de Santiago de Chile. **Agric. Técn.**, v.36, p.137, 1976.

TATCHELL, R. J.; BENNETT, G. F. *Boophilus microplus*: antihistaminic and tranquillizing drugs and cattle resistance. **Experimental Parasitology**, New York, v. 26, p. 369-377, 1969.

THIESEN, W. L. Biologia do carrapato *Boophilus microplus*. In: Seminário Nacional sobre Parasitose dos Bovinos, I. Campo Grande, 1979, p 207-215. **Anais...** Campo Grande, 1979

TRAGER, W. Acquired immunity to ticks. **The Journal of Parasitology**, v. 25, p. 57-81, 1939a.

TRAGER, W. Further observation on acquired immununity to the tick *Dermacentor variabilis* Say. **The Journal of Parasitology**, v. 25, p. 137-139, 1939b.

TRIMNELL, A. R.; HAILS, R. S.; NUTTALL, P. A. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. **Vaccine**, v. 20, p. 3560–3568, 2002.

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, p. 4329–4341, 2005.

- TURNBULL, I. F.; SMITH, D. R.; SHARP, P. J.; COBON, G. S., HYNES, M. J. Expression and secretion in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger* of a cell surface glycoprotein from the cattle tick, *Boophilus microplus*, by using the fungal amdS promoter system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2847–2852, 1990.
- UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKISHA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2788-2793, 2001.
- VERONEZ, V. A.; CASTRO, M. B.; BECHARA, G. H.; SZABÓ, M .P. J. Histopathology of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks fed on resistant hosts. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 50, n. 2, p. 151–161, 2010.
- WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle I. Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20000 larvae. **Aust. J. Agric. Res.**, East Melbourne, v. 26, p.1073-1080, 1975.
- WALKER, A. R.; FLETCHER J. D. Skin test to detect resistance of cattle to *Rhipicephalus appendiculatus* ticks **Med. Vet. Entomol.**, v. 4, p. 321–325, 1990.
- WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. **The Genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World**. Cambridge: Cambridge University Press, 643p., 2000.
- WIKEL, S. K.; ALLEN, J. R. Acquired resistance to ticks. I. Passive transfer of resistance. **Immunology**, v. 30, p. 311-316, 1976a.
- WIKEL, S. K.; ALLEN, J. R. Acquired resistance to ticks. II. Effects of cyclophosphamide on resistance. **Immunology**, Oxford, v. 30, p. 479-484, 1976b.
- WIKEL, S. K.; ALLEN, J. R. Immunological basis of host resistance to ticks. In: Obenchain, F.D.; Galun, R. (ed.) **Physiology of ticks**. Oxford: Pergamon Press, p.169-196, 1982.
- WIKEL, S. K.; WHELEN, A. C. Ixodid-host immune interaction identification and characterization of relevant antigens and tick-induced host immunosuppression. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 20, p. 149-174, 1986.
- WIKEL, S. K.; RAMACHANDRA, R. N.; BERGMAN, D. K. Tick-induced modulation of the host immune response. **Int. J. Parasitol.**, v. 24, p. 59-66, 1994.



WIKEL, S. K. Immunology of the tick-host interface. In: **The immunology of Host-ectoparasitic arthropod relationships**, S. K. Wikel (ed.), p. 204–231. Cab International, UK, 1996.

WILLADSEN, P., WOOD, G. M., RIDING, G. A., The relation between skin histamine concentration, histamine sensitivity, and the resistance of cattle to the tick, *Boophilus microplus*. **Z. Parasitenkd.**, Berlin, v.59, p.87-93, 1979.

WILLADSEN P. Immunity to ticks. **Adv. Parasitol.**, v. 18, p. 293-313, 1980

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

WILLADSEN, P; MCKENNA, R. V. Vaccination with “concealed” antigens: myth or reality. **Parasite Immunology**, v. 13, p. 605–609, 1991.