

Vacina de subunidades rSBm7462 para o controle do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Joaquín H Patarroyo S¹, MDV, Esp, MSc, DSc; Jesús A Cortés-Vecino², MDV, MSc, DSc; Marlene I Vargas V³, MDV, MSc, DSc.

¹Departamento de Veterinária Diretor P.D.&I. Patsos Indústria e Comercio de Produtos Biotecnológicos, Universidade Federal de Viçosa, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária-BIOAGRO, Viçosa, MG, Brasil.

²Grupo Parasitología Veterinaria, Departamento Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

³Departamento de Veterinária, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária-BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG Brasil.

Introdução

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1887) representa o principal ectoparasito de bovinos nas regiões tropicais e subtropicais, entre as 907 espécies conhecidas de carrapatos no mundo. Ao longo dos séculos, *R. microplus*, com origem Asiática, se difundiu pelas regiões neotropicais juntamente com as migrações de pessoas e suas criações de animais. Importantes divergências genéticas e de adaptações de uma mesma espécie distribuída entre diferentes continentes envolvem uma “plasticidade ecológica” das populações de carrapatos, onde mudanças globais afetam os parasitos e a forma de manejar o controle dos mesmos (Sutherst, 2001; Estrada-Peña *et al.*, 2006).

Aliado a sua extensa distribuição geográfica, os severos prejuízos causados por *R. microplus* são de ordem direta e indireta. Os primeiros remetem para animais com perda de peso, baixa conversão alimentar, perdas na qualidade do couro, toxinas liberadas no hospedeiro, lesão da pele, entre outros. Existem cálculos que mostram que cada fêmea ingurgitada é responsável por uma redução de aproximadamente 1,37 g de peso dos bovinos (Jonsson, 2006).

Os prejuízos de causa indireta estão relacionados com a transmissão de hematozoários, como *Babesia bovis* e *B. bigemina*, além de participação na epidemiologia do *Anaplasma marginale* (Patarroyo, 1994; Oliveira-Siqueira *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2005). Estudos demonstram que os carrapatos provocam efeitos

imunossupressores no hospedeiro, o que pode facilitar a transmissão ou a gravidade de babesioses e anaplasmoses (Kashino *et al.*, 2005; Jonsson, 2006). A saliva do carrapato contém componentes que garantem o sucesso da alimentação, com funções que afetam o sistema imunológico, o hemostático e vias inflamatórias do hospedeiro (Turni *et al.*, 2004). Em relação à modulação que os carrapatos podem provocar no sistema imune de seu hospedeiro, relatou-se polarização para resposta Th2, com supressão da produção de interleucinas 1 e 2 (IL-1 e IL-2) e do interferon gama (IFN-g). Supressão de linfócitos T e queda nos níveis de IgG também foram verificados; além da ativação de quinases que reduzem a dor e de histaminas que minimizam o processo inflamatório (Willadsen e Jongejan, 1999; Wikel e Alarcon-Chaidez, 2001; Kashino *et al.*, 2005). O anterior demonstra que os carrapatos provocam efeitos imunossupressores no hospedeiro, o que pode facilitar a transmissão ou a gravidade de babesioses e anaplasmoses.

Perdas econômicas relacionadas a infestações por *Rhipicephalus microplus*

A importância do carrapato bovino é altamente relacionada com o impacto econômico que impõe às regiões onde ocorre. Um exemplo foi nos Estados Unidos da América do Norte, essa percepção levou para o primeiro programa de erradicação do governo, que começou em 1906 (Graham e Hourrigan, 1997). Naquela época, foram estimadas as perdas diretas

e indiretas de cerca de US\$ 63,250,000, a maior parte devido à produção de leite e carne diminuiu ea mortalidade causada pela babesiose bovina (Mohler, 1906). Após a erradicação dos carrapatos verificou-se economia no sistema de produção em mais de US\$ 1 bilhão por ano, e a análise custo-benefício demonstrado um US\$ 98,00 de retorno para cada US\$ 1,00 gasto em programa de controle (Bram e Gray, 1979).

Na América do Sul os dados mais consistentes são os obtidos no Brasil. As perdas calculadas no maior rebanho leiteiro do País, que é o Estado de Minas Gerais foram de 90,4 L/vaca em lactação (Rodriguez e Leite, 2013). No ano de 2013 foram feitos cálculos para todo o Brasil compreendendo gado de corte e leite dando um prejuízo total de aproximadamente US\$ 3,90 bilhões de dólares (Grissi *et al.*, 2014).

Medidas de controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*

O método de controle mais empregado a nível mundial é o químico, baseado em acaricidas (pesticidas) de diferentes bases. Porém, implicações de diferentes ordens têm sido notadas, principalmente o desenvolvimento de resistência por parte dos carrapatos aos princípios ativos empregados, resistência a acaricidas é hoje o maior obstáculo à produção pecuária. Por outro lado, o uso constante destes produtos, dada a resistência, tem levado à contaminação de ecossistemas e resíduos de acaricidas em derivados alimentícios de origem animal. Se pensarmos no mercado externo de carne e leite, que já tornam alguns países competitivos como o Brasil, este mercado deverá sofrer barreiras sanitárias sobre resíduos em carne e leite e derivados dos mesmos. Exemplo claro disso foi visto em 2011, o embargo de toneladas de derivados cárneos por parte dos Estados Unidos da América, gerando uma perda de US\$ 104 milhões, como consequência da presença de resíduos de lactonas macrocíclicas usadas como endectocidas (ABIEC, 2013). O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento–PNCRC/ MAPA correlacionou com os riscos ao qual o setor produtivo bovino do país é exposto bem como a segurança alimentar (Martins *et al.*, 2010).

Em todo o mundo existem várias linhas de pesquisas de métodos alternativos de controle do carrapato *R. microplus*. Medidas alternativas de controle são

propostas como modo de minimizar os obstáculos derivados do uso de parasiticidas químicos, que além da resistência, trazem problemas de resíduos para os produtos de origem animal e para o meio ambiente.

Diversas medidas de controle biológico vêm sendo avaliadas como possíveis ferramentas de combate. Dentre elas, destaca-se a utilização de pastagens ou o uso rotacional das mesmas que dificultam o acesso de larvas ou que liberem agentes voláteis (Labruna e Veríssimo, 2001). Outra medida que tem sido abordada é o banho dos animais com extratos fitoterápicos que inibem o acesso das larvas (Heimerdinger *et al.*, 2006; Broglio-Micheletti *et al.*, 2009). Por outro lado, o emprego de entomoparasitas é outra técnica sob avaliação; assim moscas, nematoides entomatogênicos e fungos são promissores agentes biológicos para o controle (Andreotti *et al.*, 2002; Bittencourt *et al.*, 2003; Vasconcelos *et al.*, 2004; 2009; Bahiense *et al.*, 2006).

O melhoramento animal na seleção de raças mais resistentes ao carrapato ainda é um processo polêmico. Há controvérsia sobre estimativas de valores de herdabilidade e questiona-se a correlação da característica de resistência aos carrapatos com a produtividade do animal (Johnsson *et al.*, 2000). O que se sabe é que bovinos com maior grau de sangue zebuino (*Bos indicus*) possuem maior resistência a parasitas, e mesmo dentro desse grupo há diferenças de raças, os animais Nelore, por exemplo, são mais resistentes de que os Gir ou Guzerá (Veríssimo *et al.*, 2004).

Apesar da pesquisa contínua acerca de alternativas não poluentes e não químicas para o controle do carrapato, ainda se sabem muito pouco sobre as interações ecológicas e o impacto que a introdução de espécimes estranhos, seja de vertebrados ou invertebrados, causaria no meio ambiente. Enquanto não se chega a uma solução definitiva nesse campo, a alternativa que sobra para o produtor ainda é o uso de fármacos acaricidas, porém os problemas de seu emprego, sucintamente relatados anteriormente levam a uma realidade em que urge a descoberta e desenvolvimento de uma alternativa de combate a este parasita.

O desenvolvimento de vacinas contra carrapatos representa uma promissora alternativa de controle, porque evita ou diminui o uso de inseticidas químicos que poluem o meio ambiente, assim como os derivados de carne e leite, proporcionando pelo conseguinte uma melhor qualidade da proteína de origem bovina o que tem reflexos na saúde pública e na economia.

A associação de medidas representa maior garantia de bons resultados no controle do carrapato. O uso de vacinas com banhos estratégicos de acaricidas é um bom exemplo desse controle integrado que remete para bons índices para o produtor rural (Sangster, 2001; Willadsen, 2006).

Antes de tudo vacinação representa uma medida preventiva. As vantagens que oferece esse processo sobre os convencionais métodos de controle químicos, segundo são várias: muitas vezes representam uma ação sustentável; são livres de resíduos; são mais específicas; são mais seguras. A utilização e produção de vacinas, em muitos casos, representam as únicas medidas médicas de intervenção e frequentemente oferecem maior custo-benefício do que as terapias (Francis, 2001).

A identificação de antígenos protetores para bovinos contra o *R. microplus* é crescente visto o impacto econômico e as dificuldades, já mencionadas, no controle desse parasita. Uma excelente revisão crítica feita em 2004, mostra até esse momento o estado do desenvolvimento de antígenos para vacinas; sucintamente mostra as abundantes evidências que existem de que a vacinação com uma proteína imunogênica é capaz de induzir imunidade significativa para controlar uma infestação por carrapatos, talvez sendo a etapa crítica a rota para uma produção comercial (Willadsen, 2004).

Tendo em conta o anterior, em 2012 numa excelente revisão crítica se apresenta o interrogante de que existindo tantos antígenos em estudo porque não aparece uma vacina comercial diferente às duas existentes no mercado que tem eficiência muito variada (Guerrero *et al.*, 2012).

Recentemente, em 2015 sob os auspícios da fundação Bill & Mellinda Gates reuniram-se quinze pesquisadores de continentes diferentes em Marrocos para intercambiar experiências com o intuito de acelerar o desenvolvimento de uma vacina, selecionar possíveis antígenos ou combinação dos mesmos, assim como para estabelecer normas e guias para standardizar modelos para testar antígenos e formulações de vacinas. Essa colaboração resultou na formação do “Cattle Tick Vaccine Consortium” (CATVAC; Schettters *et al.*, 2016).

Em 1994, na Austrália, foi liberada a primeira vacina comercial contra *R. microplus*, utilizando clonagem do gene *bm86* em *Escherichia coli* e produção da proteína recombinante Bm86 (rBm 86), recebendo o nome de TickGARD® (Hoeschst Animal Health, Austrália) e subsequentemente denominada TickGARD Plus® (Smith *et al.*, 1995; Willadsen, 1997). Com as bases do mesmo antígeno foi formulada em Cuba a vacina Gavac® (Heber Biotec AS, Havana, Cuba) e Gavac Plus®, porém essa rBm 86 foi produzida em *Pichia pastoris* (García-García *et al.*, 1998).

A eficácia destas vacinas tem variado. Esses valores são avaliados pela redução da viabilidade e do número de ovos, consequentemente diminuindo o número de carrapatos nas gerações subsequentes, tendo todos os estágios de desenvolvimento comprometidos (Jonsson *et al.*, 2000).

Algumas amostras de *R. microplus*, entretanto, mostraram-se menos susceptíveis à vacina recombinante Bm86 (rBm86). A ineficiência foi determinada numa população argentina denominada posteriormente de (Cepa A), a qual mostrou que tinha um gene diferente, o gene *bm95*, que foi, em seguida clonado, expresso na levedura *P. pastoris* e utilizado como outra vacina recombinante, controlando a população que era resistente a rBm86 (García-García *et al.*, 1999).

O isolamento geográfico de cepas de *R. microplus* pode levar a essas diferenças genéticas e fisiológicas, remetendo a uma resposta negativa ao controle pela vacinação. Existindo, portanto, a constante busca por um imunógeno ou a combinação de antígenos que cubram o maior número possível de populações, protegendo o rebanho das infestações por *R. microplus*.

Uma proteína pode apresentar diversos epítomos em sua estrutura que podem servir ou não como fatores protetores, podendo até mesmo ser um mecanismo de mimetismo de parasitas para evadir a resposta imune. Assim, seria uma grande vantagem de se utilizar vacinas com epítomos determinados e caracterizados, já que se lograria evitar alguns problemas que os epítomos não necessários ao desenvolvimento de proteção e imunidade contra o parasita poderiam apresentar, tais como mecanismos supressores, alérgicos e/ou autoimunes, e mecanismos de evasão típicos do microrganismo (Patarroyo, 1994).

A primeira vacina sintética contra o *R. microplus*, foi denominada de 4912, que apresentou resultados pouco satisfatórios (Oliveira, 1998). A partir das análises de estudos por predição computacional, determinantes imunogênicos da SBm 7462[®] foram definidos a partir da sequência da Bm 86. O imunógeno possui sequências que foram desenhadas no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/Bioagro/Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), e sintetizadas no Instituto de Imunologia Del Hospital San Juan de Dios, em Bogotá, Colômbia. Esses peptídeos foram catalogados pelo livro de sequências como 4.822 (aa. 398-411), 4824 (aa. 132-145) e 4823 (aa. 21-35), o peptídeo SBm7462[®] possui essas sequências nesta ordem e com duas cisteínas no C- e N- terminais. A partir de estudos controlados *in vivo* verificou-se que o imunógeno tem uma eficácia vacinal (81,05%) no que tange à redução do número de carrapatos, menor postura e menor taxa de sobrevivência das larvas (Patarroyo *et al.*, 2002). Esses dados refletem melhores resultados do que à maioria dos testes com rBm86 e outros antígenos (Guerrero *et al.*, 2012).

Tendo em conta as observações feitas com a denominada Cepa A na Argentina (García-García *et al.*, 1999), foram necessários estudos de variabilidade genética e analisaram-se vinte populações de distintos locais e condições geográficas de regiões brasileiras e outros países sul-americanos como Colômbia, Venezuela, Argentina e Uruguai. Assim, foram sequenciados 91,38 % do gene *bm85* e 80% do gene *bm86*. Após alinhamento entre os aminoácidos que compõem a Sbm7462 contidas nos dois genes, foram observadas apenas duas mudanças dentro das sequências que constituem o SBm7462[®], entre todas as populações (Sossai *et al.*, 2005; Peconick *et al.*, 2008), concluindo que não há variabilidade nessas sequências que possam interferir na eficiência vacinal.

Estudos demonstraram a eficiência do peptídeo sintético SBm7462[®] na construção de uma resposta imune antígeno-específico que envolve mecanismos humorais, com predominância estatisticamente diferente do isótipo IgG₁ sobre o isótipo IgG₂, e celulares, a vacina estimula uma resposta imune T-dependente (Patarroyo *et al.*, 2009).

Uma vacina só terá aceitabilidade no mercado se o preço for módico. A vacina sintética SBm7462[®], que combate *R. microplus* foi patenteada no Brasil,

Estados Unidos da América, México, Austrália, Espanha e Portugal. Porém, existem no mundo apenas cinco centros especializados na síntese química de peptídeos em escala industrial. Esse empecilho oneraria a produção e envio de grandes quantidades de peptídeo em curtos espaços de tempo, que certamente acarretariam em problemas de distribuição dessa vacina entre os inúmeros potenciais mercados consumidores.

Tendo em conta as necessidades de controlar o parasita e dada a eficiência do imunógeno desenvolvido, SBm7462[®], era necessária uma forma alternativa para produzir o mesmo. Assim, usando a técnica da denominada vacinologia reversa, desenharem-se no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/BIOAGRO/Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), minigenes que codificassem, literalmente, os aminoácidos que compõem o peptídeo sintético denominado SBm7462[®] para transfeção em leveduras e especificamente para *Komagataella (Pichia) pastoris*, para que a partir da fermentação se obtivesse o imunógeno.

Por meio da técnica de DNA recombinante a vacina pode ser produzida de forma mais eficiente (menor custo, menor tempo e grande escala de produção), sendo eficaz para os carrapatos do Brasil e outros Países, bem como desenvolver um produto atóxico, sem resíduos e que não impacte negativamente o meio ambiente.

As vacinas baseadas em antígenos recombinantes não apresentam risco à saúde, são seguras para o ambiente e o desenvolvimento de resistência pelos carrapatos por meio de adaptação seletiva é pouco provável (Nuttall *et al.*, 2006).

A vacina desenvolvida por fermentação, por ser de subunidades (não é uma proteína íntegra) e imunologicamente definida não contém restos de organismos diferentes à sequência de aminoácidos que compõem o peptídeo recombinante, tornando-a segura aos animais e ao meio ambiente

Dentre as vantagens do uso de esta vacina, em detrimento aos carrapaticidas, pode-se destacar: ausência de período de carência após a aplicação, pois não deixa resíduos nos alimentos, fator de importância fundamental na pecuária de leite; ação

mais sustentável, pois são ecologicamente corretas, uma vez que não são tóxicas ao animal, ao meio ambiente e ao homem; não destroem a microbiota natural, pois é espécie-específica, irão atingir apenas os carrapatos da espécie *R. (B.) microplus*, sem atacar microrganismos naturais inerentes à vaca/boi; e desenvolvimento de resistência pelos carrapatos por meio da adaptação seletiva é pouco provável.

A ação da vacina após aplicação no rebanho funciona da seguinte maneira: as proteínas são inoculadas nos bovinos e induzem a reação do sistema de defesa do organismo, que cria anticorpos específicos contra a proteína intestinal. Ao parasitar o animal vacinado, os carrapatos sugam o sangue contendo anticorpos contra as suas próprias células intestinais. O resultado é uma destruição intestinal, que mata os carrapatos ou, no mínimo, reduz sua capacidade de se alimentar adequadamente e reproduzir-se.

Ao aplicar a vacina com os antígenos, o gado desenvolverá uma imunidade protetora contra os carrapatos, que irá evitar diversos prejuízos diretos e indiretos que podem ser causados por este ácaro.

Os resultados obtidos pela nova forma de produção (rSBm7462) em *stall test* do conjunto de dados dos parâmetros biológicos analisados após a contagem e pesagem de teleóginas, pesagem de ovos e de larvas, assim como os parâmetros de redução do número e do peso das teleóginas, do peso dos ovos, da fertilidade mostraram uma eficiência de 73% o que nos levou a teste em campo da vacina. Esta nova forma de antígeno levou a solicitar patente em Brasil, USA, South África, Austrália e Comunidade Europeia. Os resultados no que tange à resposta imune nos bovinos e aos danos causados sobre o epitélio intestinal dos parasitos é idêntico ao obtido com o peptídeo sintético (Sbm7462®).

A aplicação em campo da vacina se iniciou em 2012 e foi aplicada em 27 fazendas de diferentes particularidades zootécnicas, perfazendo um total de 15.000 animais, temos análises completas de sete delas e os outros estão em processo. Por motivos de contratos de exclusividade vigentes, a aplicação foi suspensa na maioria delas.

Algumas análises imunohistoquímicas em linfonodos de bovinos inoculados a campo mostram claramente a resposta imune e o acúmulo de antígeno em células *denticas-like* asseverando a similaridade da resposta à vacina (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2014).

Referencias

- ABIEC. Associação Brasileira de Indústrias Exportadoras de Carnes. Exportações brasileiras de carne bovina. Período: jan/2013 - jun/2013.
- Andreotti R, Gomes A, Malavazi-Piza KC, Sasaki S. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *Int Immunopharmacol* 2002; 2:557-563.
- BahienseTC, Fernandes EKK, Bittencourt VREP. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Vet Parasitol* 2006; 141:319-324.
- Bittencourt VREP, Bahiense TC, Fernandes EkK. Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOROKIN, 1883 aplicado sobre *Brachiararia decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari; Ixodidae). *Rev Bras Parasitol Vet* 2003; 12:38-42.
- Bram RA, Gray JH. Eradication – an alternative to tick and tick borne disease control. *World Anim Rev* 1979; 30:30-35.
- Broglio-Micheletti SMF, Valente ECN, Souza LA. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18:44-48.
- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Guglielmone A. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp Appl Acarol* 2006; 38:219-235.
- Fernandez-Ruvalcaba M, Preciado-de-la Torre F, Cruz-Vazquez, C. Anti-tick effects of *Melinis minutiflora* and *Andropogon gayanus* grasses on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae. *Exper Appl Acarol* 2004; 32:293-299.
- Francis AE. The future of vaccines, immunization concepts and practice. *Vaccine* 2001; 19:2206-2209.
- García-García JC, González IL, González DM. Sequence variations in the *B. microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol* 1999; 23:883-895.
- García-García JC, Soto A, Nigro F. Adjuvantand immunostimulating properties of the recombinant Bm86 protein expressed in *Pichia pastoris*. *Vaccine* 1998; 16:1053-1055.
- Graham OH, Hourrigan JL. Eradication programs for the arthropod parasites of livestock. *J Med Entomol* 1997; 13:629-658.
- Grissi L, Leite RC, de Souza Martins JR. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 2014; 23:150-156.
- Guerrero FD, Miller RJ, Pérez de León A. Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *Int J Parasitol* 2012; 42:421-427.
- Heimerdinger A, Olivo CJ, Molento MB, Agnolin CA. Extrato alcoólico de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) no controle do *Boophilus microplus* em bovinos. *Ver Bras Parasitol Vet* 2006; 15:37-39.

- Jonsson NN, Matschoss AL, Pepper P. Evaluation of tickGARD (PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Vet Parasitol* 2000; 88:275-285.
- Jonsson NN, Matschoss AL, Pepper P. Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Vet Parasitol* 2000; 89:297-305.
- Jonsson NN. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol* 2006; 137:1-10.
- Kashino SS, Resende J, Sacco AMS, Rocha C. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp Parasitol* 2005; 110:12-21.
- Labruna, MB, Verissimo CJ. Observações sobre a infestação por *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bovinos mantidos em rotação de pastagem, sob alta densidade animal. *Arq Inst Biol* 2001; 68:115-120.
- Martínez-Rodríguez LC, Vargas MI, Patarroyo JH. Resposta de linfonodos em bovinos inoculados a campo com a vacina recombinante rSBm7462 anti *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* *Pesq Vet Bras* 2014; 34:503-508.
- Martins ARL, Rocha RS, Portz AJ. Uso da ivermectina na bovinocultura de corte do Brasil e o seu impacto econômico. *Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)*. 2010.
- Mohler JR. Texas or tick fever and its prevention. *Farm Bull United States Depart Agricult* 1906; 238:1-44.
- Nuttall PA, Trimnell AR, Kazimirova M. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Paras Immunol* 2006; 28:155-163.
- Oliveira RC. Avaliação experimental do peptídeo sintético 4912 como imunógeno para o controle de carrapato *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887). *Dissertação (mestrado)*. Viçosa: UFV, 72 pp. 1998.
- Oliveira-Siqueira TCG, Oliveira MCS, Araujo Jr J, Amarante AFT. PCR- based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int J Parasitol* 2005; 35:105-111.
- Patarroyo JH. Babesiose bovina: Controle de vetores com vacinas a base de peptídeos sintéticos. *Rev Patol Trop* 1994; 23:145-146.
- Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88:163-172.
- Patarroyo JH, Vargas MI, Gonzales CZ. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462[®] against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol* 2009; 166:333-339.
- Peconick AP, Sossai S, Girão FA. Synthetic vaccine (SBm7462[®]) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. *Expl Parasitol* 2008; 119:37-43.
- Rodrigues DS, Leite RC. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Estimate of decreased milk production on a dairy farm. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013; 65:1570-1572.
- Ruiz PMG, Passos LMF, Ribeiro MFB. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. *Vet Parasitol* 2005; 128:325-331.
- Sangster N C. Managing parasiticidae resistance. *Vet Parasitol* 2001; 98:89-109.
- Schettlers T, Bishop R, Crampton M. Cattle tick vaccine researchers join forces in CATVAC Paras Vectors 2016; 9:105-112.
- Smith DR, Hungerford J, Willadsen P. The development of TickGard - a commercial vaccine against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Indooroopilly: Biotec Australia-CSIRO* 1995.
- Sossai S, Peconick AP, Sales-Junior PA. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol* 2005; 37:199-214.
- Sutherst RW. The vulnerability of animal and human health to parasites under global change. *Int J Parasitol* 2001; 31:933-948.
- Turni C, Lee RP, Jackson LAA. Comparison of the immunosuppressive effects of salivary gland extracts from two laboratory strains of *Boophilus microplus*. *Int J Parasitol* 2004; 34:83-838.
- Vasconcelos VO, Furlong J, Freitas GM. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA Strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 2004; 94:201-206.
- Verissimo CJ, Otsuk IP, Zeitlin A Z. Infestação por carrapatos *Boophilus microplus* (acari: ixodidae) em vacas Jersey. *Arq Inst Biol* 2004; 71:630-632.
- Wikel SK, Alarcon-Chaidez FJ. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. *Vet Parasitol* 2001; 101:275-287.
- Willadsen P, Jongejan F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol Today* 1999; 15:258-262.
- Willadsen P. Novel vaccines for ectoparasites. *Vet Parasitol* 1997; 71:209-222.
- Willadsen P. Anti-tick vaccines. *Parasitol* 2004; 129:367-387.
- Willadsen P. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Vet Parasitol* 2006; 138:161-168.