

# ANÁLISE MOLECULAR DA SEQUÊNCIA ANTIGÊNICA (SBm7462®) DA Bm86 DO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E SIMILARIDADE COM *Rhipicephalus sanguineus* E *Hyalomma anatolicum anatolicum*\*

ANA P. PECONICK<sup>1</sup>; SIDIMAR SOSSAI<sup>1</sup>; CARLA L. MEDEIROS<sup>1</sup>; GABRIEL D. CARVALHO<sup>1,2</sup>; MARLENE I. VARGAS<sup>3</sup>; JOAQUÍN H. PATARROYO<sup>4</sup>

**ABSTRACT:-** PECONICK, A.P.; SOSSAI, S.; MEDEIROS, C.L.; CARVALHO, G.D.; VARGAS, M. I.; PATARROYO, J.H. [Molecular analysis of the antigenic sequence (SBm7462®) from Bm86 of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and similarity with *Rhipicephalus sanguineus* and *Hyalomma anatolicum anatolicum*]. Análise molecular da sequência antigênica (SBm7462®) da Bm86 do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e similaridade com *Rhipicephalus sanguineus* e *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, supl. 1, p. 18-23, 2008. Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/BIOAGRO, DVT, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brasil. E-mail: jpatarro@ufv.br

The vaccination represents optimum method evaluated with effective cost to prevent economic losses and to increase the duration and quality of life of the production animals. . Diverse vaccines are produced from the intestinal protein Bm86 of the *Rhipicephalus (B.) microplus*. The knowledge of the conservation of the gene bm86 is very important to evaluate the vaccine efficiency and the possibility of reaction crossed between different species of ticks. Samples of *R. (B.) microplus* come from different localities had been sequenced. The analyses of multiple alignments of the sequences had been made through the BioEdit program 7.0.5.3 version and the verification of polymorphism for visual inspection. In this work the alignment of all was become fulfilled sequences using itself BLAST in the search for similarity. Similarity was observed enters the sequenced fragments of *R. (B.) microplus* with the sequence of the protein Rs86 of *Rhipicephalus sanguineus* and with protein HA98 of the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. The results give molecular support to synthetic the vaccine use based in the gene *bm86* (SBm7462®) to be used in different species of ticks.

KEY WORDS: Ticks, Similarity, Vaccine, Bm86, SBm7462®.

## RESUMO

A vacinação representa o melhor método avaliado com custo efetivo para prevenir perdas econômicas e aumentar a duração e qualidade de vida dos animais de produção. Diversas vacinas são produzidas a partir da proteína intestinal Bm86 do *Rhipicephalus (B.) microplus*. O conhecimento da conservação do gene *bm86* é muito importante para avaliar a eficiência de vacinas e

a possibilidade de reação cruzada entre espécies diferentes de carrapatos. Amostras de *R. (B.) microplus* providas de diferentes localidades foram sequenciadas. As análises de alinhamentos múltiplos das sequências foram feitas através do programa BioEdit versão 7.0.5.3 e a verificação de polimorfismo por inspeção visual. Nesse trabalho realizou-se o alinhamento de todas as sequências utilizando-se BLAST na busca por similaridade. Observou-se similaridade entre os fragmentos sequenciados de *R. (B.) microplus* com a sequência da proteína Rs86 de *Rhipicephalus sanguineus* e com a proteína HA98 do carrapato *Hyalomma anatolicum anatolicum*. Os resultados dão suporte molecular ao uso de vacinas sintéticas baseadas no gene *bm86* (SBm7462®) serem usadas em diferentes espécies de carrapatos.

PALAVRAS-CHAVE: Carrapatos, similaridade, vacina, Bm86, SBm7462®

\* Sob os auspícios da FAPEMIG, CAPES e CNPq

<sup>1</sup> Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIVIÇOSA, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Veterinária, UFV, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/BIOAGRO, DVT, UFV, Viçosa, MG, CEP 36.570-000, Brasil. E-mail: jpatarro@ufv.br

## INTRODUÇÃO

Os avanços nos conhecimentos e técnicas de biologia molecular e imunologia providenciam ferramentas para compreender muitas questões biológicas e esses estão sendo aplicados em várias pesquisas na área da parasitologia (SANGSTER et al., 2001). Muitos dos sucessos na prevenção e controle de doenças parasitárias advêm da aplicação desses para o desenvolvimento de vacinas e métodos de diagnóstico.

O desenvolvimento de vacinas contra carrapatos representa uma promissora alternativa de controle desses parasitos. Assim, têm sido usadas vacinas contendo a Bm86 que atuam por meio de anticorpos anti-Bm86, com o possível envolvimento do complemento e outros mecanismos efetores no combate ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (GARCÍA-GARCÍA et al., 1998; WILLADSEN, 2004). A SBm7462® é uma vacina sintética derivada da Bm86 e possui três epítomos imunogênicos: 4822 (a.a. 398-411), 4824 (a.a. 123-145) e 4823 (a.a. 21-35), com níveis satisfatórios de proteção (PATARROYO et al., 2002). Os epítomos são conservados entre diferentes populações de *R. (B.) microplus* (PECONICK et al., 2008).

A proteína Bm95, identificada na mesma espécie, possui função homóloga a Bm86. Trabalhos de análise de polimorfismo revelaram que a maioria das populações de *R. (B.) microplus* latino-americanas possuía a sequência Bm95 e não a Bm86 (SOSSAI et al., 2005; PECONICK et al., 2008). Esses dados justificam os maus resultados em diversas localidades no controle do carrapato utilizando vacinas recombinantes produzidas a partir de uma cepa isolada de carrapato com a Bm86 (GARCÍA-GARCÍA et al., 1999).

Comparações entre sequências de ácidos nucleicos e dedução de aminoácidos, assim como análises estruturais e filogenéticas de genes de *R. (B.) microplus* com outras espécies de carrapato confirmam similaridade ou mostram proximidade entre as mesmas, reforçando a idéia de que as vacinas poderiam conferir proteção cruzada (BEATI; KEIRANS, 2001; DE VOS et al., 2001; MURRELL et al., 2001; PIPANO et al., 2003; DA SILVA VAZ - Jr. et al., 2005; DE LA FUENTE et al. 2006). Tendo em conta o anterior, realizaram-se várias pesquisas usando o imunógeno Bm86 para o controle de outros gêneros e espécies diferentes de carrapatos apresentando resultados satisfatórios (DE VOS et al., 2001). Com o objetivo de se avaliar similaridade entre diferentes espécies de carrapatos, obtiveram-se dois fragmentos A e C que correspondem a 52,2% da sequência total do gene *bm86* de diferentes isolados do carrapato *R. (B.) microplus* e compararam-se com sequências de diferentes espécies de carrapatos depositadas em bancos de dados. Nos fragmentos A e C estão incluídos os epítomos 4823 e 4822, respectivamente, constituintes da vacina sintética SBm7462®.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas vinte e seis amostras de *R. (B.) microplus* de diferentes regiões geográficas brasileiras e outros países sul-americanos (Tabela 1). As teleóginas que foram ad-

Tabela 1. Descrição das 26 populações de *R. (B.) microplus* utilizadas para análise de polimorfismos nucleotídeos e peptídicos no gene *bm86*.

Amostra	Município	Estado	País
Betim	Betim	Minas Gerais	Brasil
BoaE	Boa Esperança	Minas Gerais	Brasil
Bugre	Bugre	Minas Gerais	Brasil
Mclaros	Montes Claros	Minas Gerais	Brasil
UFV	Viçosa	Minas Gerais	Brasil
Alegre	Alegre	Espírito Santo	Brasil
Vnoval	Venda Nova do Imigrante	Espírito Santo	Brasil
Psul	Paraíba do Sul	Rio de Janeiro	Brasil
SSalto	São Sebastião do Alto	Rio de Janeiro	Brasil
Guara	Guararema	São Paulo	Brasil
Jaboti	Jaboticabal	São Paulo	Brasil
Scarlos	São Carlos	São Paulo	Brasil
Goiania	Goiânia	Goiás	Brasil
Queren	Querência	Mato Grosso	Brasil
Coeste	Colorado do Oeste	Rondônia	Brasil
Itaqui	Itaqui	Rio Grande do Sul	Brasil
Slivra	Santana do Livramento	Rio Grande do Sul	Brasil
Mucuri	Mucuri	Bahia	Brasil
Aracaju	Aracaju	Sergipe	Brasil
Auto	Auto do Rodrigues	Rio Grande do Norte	Brasil
Tucuruí	Tucuruí	Pará	Brasil
LaPaz	La Paz	Entre Rios	Argentina
SJose	San José		Uruguai
Mozo	Mozo		Uruguai
Cara	Mar do Caraíbas	Córdoba	Colômbia
PDV	Palma Del Vino	Cundinamarca	Colômbia

quiridas vivas foram incubadas para obtenção de larvas, em estufa Incubadora B.O.D., a 28°C e 80% de umidade relativa. Os ovos foram coletados nas primeiras 48 horas para a obtenção de larvas que foram aliquotadas e conservadas em nitrogênio líquido. As outras amostras obtidas que estavam conservadas em álcool 70% foram lavadas com água deionizada, secas e também estocadas em nitrogênio líquido.

Para a extração do ácido ribonucleico (RNA), 100 mg de larvas foram maceradas com Trizol™ (Invitrogen USA) em tubos de polipropileno de 1,8 mL, de acordo com o fabricante. Posteriormente foi utilizada DNase (Promega EUA), assim: 10mg de RNA total, 1X RQ1DNase buffer, 10 U de *RQ1 RNase-free DNase* e água DEPC em quantidade suficiente para 100mL.

O cDNA foi sintetizado utilizando-se o Kit SuperScript™ First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen EUA) seguindo as recomendações do fabricante. A síntese foi realizada em termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems EUA).

Para a amplificação das sequências de nucleotídeos (nt) foi usada a reação em cadeia de polimerase (PCR). Para o fragmento A utilizaram-se os primers 4823 (forward 5' GGCATCGCTTTGTTTCGTC 3' e reverse 5' CCACAGT CACACGTTGC 3'), amplificando 400 pb (nt 39-438). O fragmento C foi amplificado com os primers 4822 (forward 5' TCGTGTGCAGAAAGGAAGTGG 3' e reverse 5' TTAG TGTCTGGTGGGCATTG 3'), amplificando 762 pb (nt 839-1600). As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems USA) como segue: 94°C

por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Para cada reação utilizou-se 100 ng de cDNA, 1X PCR buffer, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM de dNTPs, 3U de Platinum *Taq* DNA polimerase (Promega EUA) e 0,6 mM dos primers forward e reverse para a sequência do fragmento C. Para as sequências do fragmento A utilizou-se 0,4 mM dos primers forward e reverse 4823. As reações foram completadas com água milliQ autoclavada para um volume final de 25 µL.

Os produtos de PCR foram purificados de gel de agarose 1% utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, EUA) e clonado em vetor plasmidial pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, EUA), de acordo com recomendações do fabricante. A linhagem DH5a de *Escherichia coli* foi utilizada para a clonagem das sequências estudadas. A confirmação das colônias transformantes foi feita pela atividade da  $\beta$ -galactosidase e pela técnica de PCR de colônia utilizando os primers M13 universais.

O DNA plasmidial de duas colônias de cada população estudada foi extraído utilizando o Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega EUA) seguindo as especificações do fabricante e sequenciado no equipamento MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences, RU). Cada clone foi sequenciado quatro vezes, duas vezes no sentido forward e duas vezes no sentido reverse com os primers M13.

As reações de sequenciamento foram estudadas e analisadas por programas computacionais. O programa Seqman do pacote DNASTAR (DNASTprimerAR Inc.) foi utilizado para comparar os esferogramas com as sequências nucleotídicas. O software BioEdit® versão 7.0.5.3 (HALL, 1999) e o site JustBio (www.justbio.com) forneceram as ferramentas para realizar o alinhamento das sequências nucleotídicas com dedução dos aminoácidos correspondentes. Foram feitas buscas por similaridade, utilizando-se BLAST ou *Basic Local Alinhament Sequence Tool* (ALTSCHUL et al., 1990), com sequências armazenadas no GenBank™. A análise de polimorfismo nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos deduzidos foram realizadas manualmente. Os valores foram transferidos para planilhas e a partir dessas foi determinado a percentagem de polimorfismo de cada população em relação aos genes *bm86* e *bm95*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Moléculas de artrópodes são identificadas, purificadas, caracterizadas, clonadas e possuem suas sequências depositadas em banco de dados.

Nesse trabalho realizou-se o alinhamento de todas as sequências utilizando-se BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) na busca por similaridade. Em relação aos fragmentos A e C, a similaridade foi grande nos alinhamentos com as sequências das proteínas Bm86 (GenBank™ número de acesso AF150891) e Bm95 (GenBank™ número de acesso AF150891). Observou-se ainda similaridade significativa com

outros segmentos (nucleotídeos 278 ao 1071) da sequência Bm86 depositados no banco de dados, de diversas populações de *R. (B.) microplus* (SOSSAI et al., 2005).

O fragmento C de todas as amostras estudadas apresentou similaridade com a sequência da proteína Rs86 de *Rhipicephalus sanguineus* (GenBank™ número de acesso DQ201646). A Rs86 é ortóloga da Bm86 e também é avaliada como antígeno protetor (DE LA FUENTE et al., 2006). Após alinhamento da sequência do *R. sanguineus* com o fragmento C da amostra Viçosa, que segue um perfil de variabilidade média para a maioria das populações, observou-se identidade de 84,11% entre as sequências (Figuras 1 e 2). Recentes estudos, utilizando metodologias taxonômicas moleculares, demonstraram proximidade filogenética do gênero *Boophilus* com o *Rhipicephalus*. Propondo-se uma nova classificação para a espécie, que mudaria de *Boophilus microplus* para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURREL et al., 2000; MURREL et al., 2001; BEATI; KEIRANS, 2001). Nossos dados reforçam os estudos sobre a proximidade filogenética de *Rhipicephalus* com *Boophilus*.

Os resultados de similaridade de proteínas não são exclusivos da Bm86 ou Bm95, sequências de nucleotídeos e dedu-

Viçosa	GAAGCGATACGGACAGTATCGGAAAGAGTTTAAAGTTGAGATCTAACTGCACG
R sanguineus	GACGCGATAAAGACAGTATCGGAAAGAGTTTAAAGTTGAGATCTAACTGCACA
Viçosa	CAGGACATTAAGGCAAGCTCATAGCAGAGAACCTCTCAAAAGCACTGCTCAGAAA
R sanguineus	GAGGACATTAAGGCAAGCTCATAGCAGAGAACCTCTCAAAAGCACTGCTCAGAAA
Viçosa	CTCAAGCATGCGAGCATCTCAATCGCGAATGGTGCATGATGATCCGAAGTTGCTGATC
R sanguineus	CTCAAGCATGCGAGCATCTCTGGTGCATGATGATCCGAAGTTGCTGATC
Viçosa	AAGAAACTCTGCAACAGAAATGGAAGAGAGAACCTTGGCAGAGTCTGCTCAAGATG
R sanguineus	AAGAAAGTCTGCAACAGAAATGGAAGAGAGAACCTTGGCAGAGTCTGCTCAAGATG
Viçosa	CAGGAGCTGCTCAACAGGTCAAAACAATCGGTCAAGGTGACAACTCTTCTGGTTC
R sanguineus	CAGGAAATGGATCAACAGGTCAAAACAATCGGTCAAGGTGACAACTCTTCTGGTTC
Viçosa	CAGTGGCTGATGGTTACACAAACAATTAAGAGATGACAGAGGTGGCTTACGGCTCTC
R sanguineus	CAGTGGCTGATGGTTATAGAGAGTTGAGAGATGACAGAGGTGGCTTACGGCTCTC
Viçosa	GTGTG
R sanguineus	GTGTG

Figura 1. Alinhamento parcial, utilizando ferramentas do site JustBio, do gene *bm86* dos nucleotídeos 1125 ao 1489, da população UFV (Viçosa) com a sequência da proteína Rs86 de *R. sanguineus* depositada no GenBank™ número de acesso DQ201646. As semelhanças são indicadas por asterisco (\*) e as diferenças pela ausência do mesmo. A sequência em negrito e sublinhado corresponde ao peptídeo 4822 da vacina sintética SBm7462.

Bm95	GAIRT SIGKEVFKVEI LNCTQDIKARLIAEKPLSKYVLRKIQACEHPIGWCMYPKLLI
Bm86	EAIRT SIGKEVFKVEI LNCTQDIKARLIAEKPLSKYVLRKIQACEHPIGWCMYPKLLI
Viçosa	EAIRT SIGKEVFKVEI LNCTQDIKARLIAEKPLSKYVLRKIQACEHPIGWCMYPKLLI
R sanguineus	DAIKT SIGSEVFKVEI LNCTEDIKARLIAEKPLSKYVLRKIQACEHPVGDLCMLYFKLP I
Bm95	KKNSATEIEENL.CDS.LL.KNQ.EAA.YK.QQNK.CV.KVDNL.FWFQCA.DGYTT.TYEMTR.GRLRRSV
Bm86	KKNSATEIEENL.CDS.LL.KNQ.EAA.YK.QQNK.CV.KVDNL.FWFQCA.DGYTT.TYEMTR.GRLRRSV
Viçosa	KKNSATEIEENL.CDS.LL.KNQ.EAA.YK.QQNK.CV.KVDNL.FWFQCA.DGYTT.TYEMTR.GRLRRSV
R sanguineus	KKNSATEIEENL.CDS.LL.KNQ.ENG.YK.QQNK.CV.KVDNF.FWFQCA.DGYRA.VDE.IER.GRLRRSV

Figura 2. Alinhamento parcial, utilizando ferramentas do site JustBio, do gene *bm86* dos aminoácidos 365 ao 485, das proteínas Bm95, Bm86, da população UFV (Viçosa) e da sequência da proteína Rs86 de *R. sanguineus* depositada no GenBank™, número de acesso DQ201646. As semelhanças são indicadas por asterisco (\*) e as diferenças pela ausência do mesmo. A sequência em negrito e sublinhado corresponde ao peptídeo 4822 da vacina sintética SBm7462.

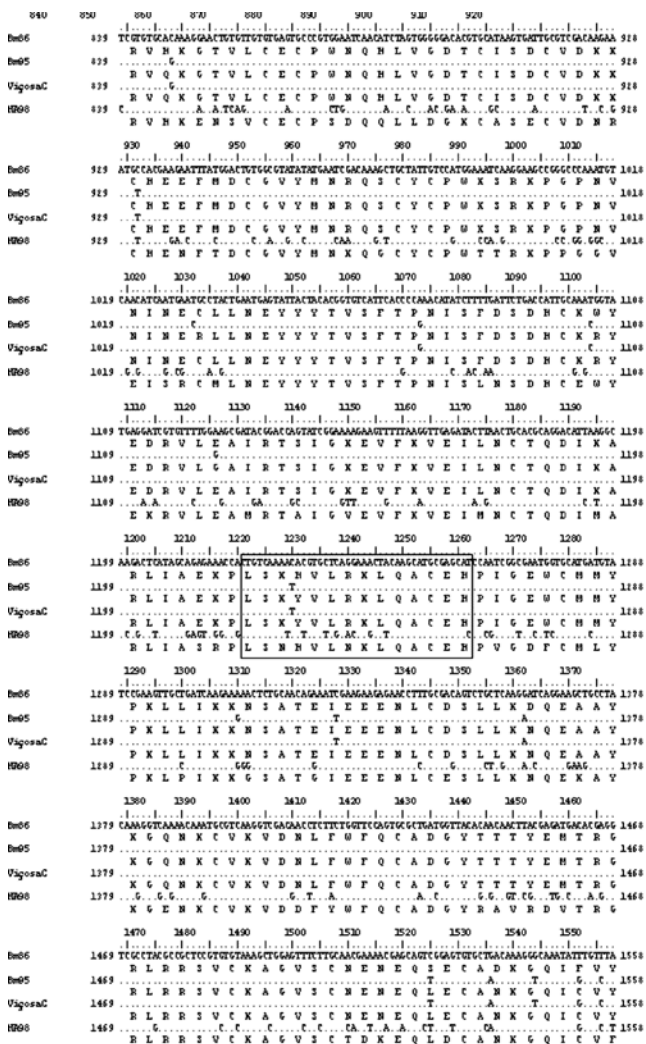


Figura 3. Alinhamento das sequências parciais, gerado pelo software BioEdit® versão 7.0.5.3, dos genes *bm86* e *bm95* compreendidos do nucleotídeo 839 ao 1558, inserido no fragmento C, e das sequências proteicas codificadas dos aminoácidos 270 a 522 da amostra UFV (Viçosa) de *R. (B.) microplus*, da proteína HA98 de *H. a. anatolicum* (GenBank™ número de acesso AF347079) em comparação com as amostras padrões Bm86 (Yeerongpilly) e Bm95 (Cepa A). Os nucleotídeos idênticos ao padrão Bm86 são indicados por pontos, os diferentes pelos nucleotídeos correspondentes. O retângulo indica a sequência correspondente ao peptídeo 4822 da vacina sintética SBm7462.

ção de aminoácidos similaridade entre actinas de *R.(B.) microplus* e *Rhipicephalus appendiculatus* mostraram regiões com 98% de identidade (DA SILVA VAZ Jr et al., 2005).

O peptídeo 4822, integrante da vacina sintética SBm7462, está inserido na sequência de *R. sanguineus* com a variabilidade de três aminoácidos em relação ao padrão Bm95 e dois comparando-se com a Bm86. Em relação ao padrão Bm95, há a substituição de uma tirosina (Y) por uma histidina (H) na posição 400. Comparando-se com a Bm95 e a Bm86, há ainda a substituição de uma arginina (R) por uma lisina (K) e de uma lisina (K) por arginina(R) nas posições 403 e 404 (Figura 2).

WILLADSEN (1997) sugeriu que o conhecimento detalhado da estrutura e função de antígenos protetores em espécies parasitárias, por meio de pesquisas moleculares, pode oferecer a oportunidade de pesquisa por antígenos similares ou proteção cruzada de vacina. ODONGO et al. (2007) mapearam dois epítomos lineares conservados entre o gene *bm86* e *bd86* do carrapato *Boophilus decoloratus* e propuseram o uso dos mesmos numa vacina sintética.

As sequências dos fragmentos C e A também mostraram similaridade com a proteína HA98, semelhante a Bm86, do carrapato *Hyalomma anatolicum anatolicum* (GenBank™ número de acesso AF347079). A amostra Viçosa apresentou 77,56% de identidade com a sequência HA98, no fragmento C. Na sequência do peptídeo 4822, uma lisina (K) e uma arginina (R) foram substituídas por uma asparagina (N) comparando-se as sequências Bm86 e Bm95. E uma tirosina (Y) ainda foi substituída por uma histidina (H) em relação ao padrão Bm95 (Figura 3).

Em relação aos nucleotídeos compreendidos entre o número 39 ao 438, grandes taxas de variabilidade foram apresentadas.

As sequências amplificadas com os *primers* 4823, desse estudo, ainda apresentaram similaridade com outra sequência depositada no banco de dados de *H. a. anatolicum* (GenBank™ número de acesso DQ022371), de uma proteína semelhante a HA98 (*HA98 like*). Após alinhamento, a sequência identidade representou 71,05%. A porção do peptídeo 4823 não está inserida nesse fragmento (Figuras 4 e 5).

Os resultados de similaridade encontrados reafirmam o exposto por diferentes grupos de pesquisa, de que as denomi-



Figura 4. Alinhamento, utilizando ferramentas do site JustBio, do gene *bm86* dos nucleotídeos 166 ao 431, da população UFV (Viçosa) com a sequência de HA98-like de *H. a. anatolicum* depositada no GenBank™, número de acesso DQ022371. As semelhanças são indicadas por asterisco (\*) e as diferenças pela ausência do mesmo.



Figura 5. Alinhamento, utilizando ferramentas do site JustBio, do gene *bm86* das proteínas Bm95, Bm86, da população UFV (Viçosa) e da sequência HA98-like de *H. a. anatolicum* depositada no GenBank™, número de acesso DQ022371. As semelhanças são indicadas por asterisco (\*) e as diferenças pela ausência do mesmo.

nadas *Expressed sequence tags* (ESTs) são uma poderosa ferramenta utilizada para a descoberta e identificação da função de genes (WIKEL et al., 2001; DE LA FUENTE; KOCAN, 2003; GUERRERO et al., 2005; KRASKY et al., 2007).

Embora a proteção cruzada possa não ocorrer, a probabilidade de sucesso e os benefícios dessa já representam um forte motivo que justifique a sua investigação (WILLADSEN, 2004). Outros estudos ainda devem ser realizados para inferir sobre o uso da vacina SBm7462® em outras espécies de carrapatos, com testes adequados em laboratório e a campo. A ação da vacina recombinante rBm86 é mais sensível ao polimorfismo genético entre populações do que a vacina por peptídeos sintéticos, posto que os epítomos que a compõem são conservados nas populações estudadas (PECONICK et al. 2008). Em testes feitos com a vacina recombinante rBm86 para o controle de *Boophilus annulatus* (PIPANO et al., 2003), *B. decoloratus*, *Hyalomma dromedarii* e *H. anatolicum* (DE VOS et al., 2001) foram encontrados resultados satisfatórios. Tendo em conta os trabalhos acima mencionados podemos inferir de que os resultados do presente trabalho dão suporte molecular de que o uso de vacinas sintéticas baseadas no gene *bm86* poderão ser usadas nos carrapatos *R. sanguineus* e *H. anatolicum*.

**Agradecimentos:-** Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), o Projeto de Apoio ao Desenvolvimento de Tecnologias Agropecuárias para o Brasil (PRODETAB), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. L. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n.3, p. 403-410, 1990.
- BEATI, L.; KEIRANS, J. E.; Analysis of the systematic relationships among ticks genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*, v. 87, n.1, p. 32-48, 2001.
- SILVA VAZ-JR., I.; IMAMURA, S.; NAKAJIMA, C.; CARDOSO, F. C.; FERREIRA, C., A., S.; RENARD, G.; MASUDA, A.; OHASHI, K.; ONUMA, M.D.A. Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding for *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus appendiculatus* actins. *Veterinary Parasitology*, v. 127, n.2, p. 147-155, 2005.
- DE LA FUENTE, J.; ALMAZAN, C.; NARANJO, V.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Synergistic effect of silencing the expression of tick protective antigens 4D8 and Rs86 in *Rhipicephalus sanguineus* by RNA interference. *Journal Parasitology Research*, v. 99, n. 2, p. 108 – 113, 2006.
- DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Review of Vaccines*, v. 2, p. 583-593, 2003.
- DE VOS, S.; ZEINSTRA, L.; TAOUFIK, O.; WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Experimental and Applied Acarology*, v. 25, n.3, p. 245 – 261, 2001.
- GUERRERO, F. D.; MILLEN, 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 Biochemistry and Molecular Biology*, v. 35, n.6, p. 585–595, 2005.
- KRASKY, A.; ROHWER, A.; SCHROEDER, J.; SELZER, P. M. A combined bioinformatics and chemoinformatics approach for the development of new antiparasitic drugs. *Genomics*, v. 89, n.1, p. 36-43, 2007.
- MURREL, A.; CAMPBELL, N. J. H.; BARKER, S. C. Phylogenetic analyses of Rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2000.
- MURRELL, A.; CAMPBELL, N. J. H.; BARKER, S. C. A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 21, n. 2, p. 244-258, 2001.
- ODONGO, D.; KAMAU, L.; SKILTON, R.; MWAURA, S.; NITSCH, C.; MUSOKE, A.; TARACHA, E.; DAUBENBERGER, C.; BISHOP, R. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. *Vaccine*, v. 25, n.7, p. 1287–1296, 2007.
- PATARROYO, J. H.; PORTELA, R. W.; DE CASTRO, R. O.; COUTO PIMENTEL, J.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; VARGAS, M. I.; PRATES, A. A.; DIAS MENDES, M. A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 88, n.3, p. 163 – 172, 2002.
- PECONICK, A. P.; SOSSAI, S.; GIRÃO, F. A.; RODRIGUES, M. Q. R.; SOUZA E SILVA, C. H.; GUZMAN, F.; PATARROYO, A. M.; VARGAS, M. I.; PATARROYO, J. H. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. *Experimental Parasitology*, v. 119, n.1, p. 37–43, 2008.
- PIPANO, E.; ALEKCEEV, E.; GALKER, F.; FISH, L.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Immunity against *Boophilus annulatus* induced by the Bm86 (Tick-GARD) vaccine. *Experimental and Applied Acarology*, v. 29, n.1, p. 141-149, 2003.

- SANGSTER, N. C. Managing parasiticidae resistance. *Veterinary Parasitology*, v. 98, n.1, p. 89 – 109, 2001.
- SOSSAI, S.; PECONICK, A. P.; SALES-JUNIOR, P. A.; MARCELINO, F. C.; VARGAS, M. I.; NEVES, E. S.; PATARROYO, J. H. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*, v. 37, n.1, p. 199- 214, 2005.
- WIKEL, S. K.; ALARCON-CHAIDEZ, F. J. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. *Veterinary Parasitology*, v. 101, n.3, p. 275–287, 2001.
- WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. *Veterinary Parasitology*, v. 71, n.2, p. 209-222, 1997.
- WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. *Parasitology*, v. 129, n.2, p. 367-387, 2004.

Recebido em 2008.

Aceito para publicação em 2008.