

**ANA PAULA PECONICK**

**CONSERVAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS NÚCLEOTÍDICAS DO  
GENE *bm86* E DAS SEQÜÊNCIAS PEPTÍDICAS 4822 E 4823,  
CONSTITUINTES DA VACINA SINTÉTICA SBm7462**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006

**ANA PAULA PECONICK**

**CONSERVAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS NÚCLEOTÍDICAS DO  
GENE *bm86* E DAS SEQÜÊNCIAS PEPTÍDICAS 4822 E 4823,  
CONSTITUINTES DA VACINA SINTÉTICA SBm7462**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de novembro de 2006.

---

Prof<sup>a</sup> Simone Eliza Facioni Guimarães

---

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

---

Prof. Ricardo Wagner Dias Portela

---

Dra. Bráulia Costa Caetano

---

Prof. Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo  
(Orientador)

“O seu talento é um presente de Deus, o que fizer  
com ele será um presente para Deus.”

*(Autor desconhecido)*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiro e sempre a Deus, que ilumina e abençoa minha vida.

Aos meus pais, Marco Antônio e Rosane, que representam meu porto seguro e minha fonte de carinho. Também à Fabiana, minha irmã, que me dá coragem para seguir meus sonhos.

À Universidade Federal de Viçosa, instituição que nos acolhe, ensina, fornece apoio estrutural para realização de nosso trabalho e nos prepara para vencer. Especialmente ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO).

Aos professores Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo e Marlene Isabel Vargas Vilória, pela confiança depositada, os ensinamentos e, acima de tudo, a amizade.

Aos Professores Mauro Pires Moraes e Márcia Rogéria por disponibilizar as instalações de seu laboratório.

Ao Dr. Marco Antônio Machado e a doutora Marta F. Martins Guimarães do laboratório de Genética Molecular, Embrapa Gado de Leite, pelos sequenciamentos de parte das amostras.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel e a Miki do laboratório de Genômica/BIOAGRO/UFV pela compreensão e sequenciamentos das amostras.

Às bolsistas de iniciação científica, Flávia e Marina, sempre tão solícitas.

Ao Sidimar, pela amizade e auxílio prestado nos momentos difíceis.

Aos meus amigos Fabrício, Carlos, Gabriel, Anna Paula, Sandra, Yasmine e Carla com quem vivo bons e calóricos momentos em Viçosa.

Aos companheiros de trabalho Bruna, Breno, Javier, Vinicius, Marília, Diogo, Hugo e Vítor, pela amizade no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários/BIOAGRO/UFV.

Ao amigo Márcio Mendes, sempre auxiliando e trazendo boas sugestões.

A turma do Laboratório de Virologia Molecular Animal/BIOAGRO/UFV, Luiza, Abelardo, Fernandinha, Orlando, Luciana, Giuliano, Dimitri, Fernanda, senhor Valdir e os demais pelos conselhos e ajuda.

A Ana, Cassiana, Bia e Andréia, do Laboratório de Sequenciamento e Análises de Fragmento/BIOAGRO/UFV, sempre tão prestativas.

A Rosi, secretária da Pós-Graduação do Departamento de Veterinária, pela dedicação e ajuda em todos os momentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade com o apoio financeiro.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo convênio que disponibilizou recursos para a realização do presente experimento.

A toda minha família pela torcida e orações, em especial ao meu avô Mazilio, vovô Zé e vovó Helena. E a minha vó Bioca (*in memoriam*), sempre em meus pensamentos.

Ao meu namorado, Jairo, que, mesmo apesar da distância, representa o motivo para os meus maiores sorrisos.

Enfim, a todos que me ajudaram para a conclusão desse trabalho e que sempre foram tão amáveis. Muito obrigada...

## BIOGRAFIA

ANA PAULA PECONICK, filha de Marco Antônio Peconick e Rosane Lopes Peconick, nasceu aos 3 dias do mês de setembro, do ano de 1980, na cidade de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais.

Concluiu o ensino fundamental (1º grau) em 1995 e o ensino médio (2º grau) em 1998 no Colégio Arnaldo, em Belo Horizonte – MG.

Em Março de 2000 ingressou no curso de Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG, finalizando em janeiro de 2005. Iniciou-se na pesquisa pelo programa Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), convênio CNPq/UFV com o projeto “Controle do carrapato *Boophilus microplus* pela vacina sintética SBm7462. I – Polimorfismo populacional do parasita.” de Agosto de 2002 a Julho de 2004 no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/BIOAGRO/UFV sob a orientação do prof. Joaquin H. Patarroyo. No segundo semestre de 2004 realizou estágio supervisionado no Laboratório de Bioquímica e Imunologia/ Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.

Em março de 2005 ingressou no Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, pelo Departamento de Medicina Veterinária.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Características e importância do carrapato <i>Rhipicephalus</i> ( <i>Boophilus</i> ) <i>microplus</i> .....	3
2.2 Medidas de controle <i>R. (B.) microplus</i> .....	7
2.3 Vacinas contra o <i>R. (B.) microplus</i> .....	9
2.4 O imunógeno sintético SBm7462.....	11
2.5 Estudos Genéticos com <i>R. (B.) microplus</i> .....	14
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Local.....	18
4.2 Obtenção de carrapatos.....	18
4.3 Extração do RNA total de <i>R. (B.) microplus</i> .....	20
4.4 Tratamento das amostras com DNase.....	21
4.5 Síntese de cDNA por RT (Transcriptase Reversa)-PCR (Reação em Cadeia de Polimerase).....	21
4.6 Reação em Cadeia de Polimerase com cDNA de <i>R. (B.)</i> <i>microplus</i> .....	22
4.7 Purificação dos fragmentos de DNA de géis de agarose.....	23
4.8 Produção de Células Ultra-competentes DH5α.....	24
4.9 Clonagem de Fragmentos com Extremidades Coesivas.....	25
4.10 Crescimento bacteriano em meio líquido e estoque dos clones.....	27
4.11 Extração de DNA plasmidial.....	27
4.12 Sequenciamento.....	28
4.13 Análise de dados.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 Polimorfismos no gene <i>bm86</i> e <i>bm95</i> .....	30
5.2 Polimorfismos nos Peptídeo 4823 e 4824.....	51
5.3 Identidade de seqüência com outras espécies.....	57
6. CONCLUSÃO.....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> - Desenho da vacina sintética SBm7462	13
<b>Figura 2</b> - Segmento das proteínas Bm86 e Bm95 que já foram avaliadas quanto ao polimorfismo genético.....	32
<b>Figura 3</b> - Alinhamento das seqüências parciais do fragmento A.....	34
<b>Figura 4</b> - Alinhamento das seqüências parciais do fragmento C.....	40
<b>Figura 5</b> - Alinhamento das seqüências parciais de nucleotídeos da amostra Viçosa e da seqüência de Rs86.....	58
<b>Figura 6</b> - Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos da Bm86, Bm95, amostra Viçosa e da seqüência de Rs86.....	59
<b>Figura 7</b> - Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos da amostra Viçosa e da seqüência de HA98, fragmento C.....	60
<b>Figura 8</b> - Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos da amostra Viçosa e da seqüência de HA98, fragmento A.....	62
<b>Figura 9</b> - Alinhamento das seqüências parciais de nucleotídeos da amostra Viçosa e da seqüência de HA98- <i>like</i> .....	63
<b>Figura 10</b> - Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos da Bm86, Bm95, amostra Viçosa e da seqüência de HA98- <i>like</i> .....	63



## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> – Populações de <i>R. (B.) microplus</i> utilizadas para análise de polimorfismos.....	19
<b>Tabela 2</b> – Reações em cadeia de polimerase para os fragmentos A e C	22
<b>Tabela 3</b> – Seqüências dos primers utilizados para ampliações dos fragmentos.....	23
<b>Tabela 4</b> – Avaliação de polimorfismos no gene <i>bm86</i> e proteína Bm86 de <i>R. (B.) microplus</i> , fragmento A.....	39
<b>Tabela 5</b> – Avaliação de polimorfismos no gene <i>bm86</i> e proteína Bm86 de <i>R. (B.) microplus</i> , fragmento C .....	49
<b>Tabela 6</b> – Diferenças entre Alelos da Mesma População compreendidas no fragmento A.....	50
<b>Tabela 7</b> – Diferenças entre alelos da mesma população compreendidas no fragmento C.....	50
<b>Tabela 8</b> – Taxa de variação de aminoácidos dos peptídeos 4823 e 4822.....	52
<b>Tabela 9</b> – Polimorfismos do gene <i>bm86</i> e proteína Bm86 de <i>R. (B.) microplus</i> , na seqüência 4822.....	54
<b>Tabela 10</b> - Polimorfismos do gene <i>bm86</i> e proteína Bm86 de <i>R. (B.) microplus</i> , na seqüência 4823.....	55

## RESUMO

PECONICK, Ana Paula M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2006. **Conservação de seqüências nucleotídicas do gene *bm86* e das seqüências peptídicas 4822 e 4823, constituintes da vacina sintética SBm7462.** Orientador: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo. Co-orientadores: Marlene Isabel Vilória Vargas e Jackson Victor Araújo.

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um dos mais importantes parasitas de rebanho nas Américas Central e Sul e na Austrália de um ponto de vista econômico. Vacinas derivadas da glicoproteína intestinal Bm86 possuem um amplo potencial como método não químico no controle dos carrapatos. 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). O conhecimento da conservação do gene *bm86* é muito importante para avaliar a eficiência da SBm7462. Vinte e seis amostras de *R. (B.) microplus* provindas da Argentina, Colômbia, Uruguai e de várias regiões do Brasil foram analisadas para o gene *bm86*. Dois fragmentos de cDNA foram amplificados, fragmento A (entre os nucleotídeos 39 – 438) e fragmento C (entre os nucleotídeos 839 – 1600). Esses foram clonados no vetor pGEM-T® e quatro clones de cada população foram seqüenciados. As seqüências de nucleotídeos e dedução de aminoácidos foram comparadas com os genes *bm86* e *bm95*. As análises de alinhamentos múltiplos das seqüências foram feitas através do programa BioEdit versão 7.0.5.3 e a verificação de polimorfismo por inspeção visual. Os resultados demonstraram alta conservação genética dos peptídeos 4823 e 4822 para as amostras pesquisadas. No interior do gene *bm86*, a variabilidade de aminoácidos foi de 5,49% e 3,89% comparando-se com a Bm86 e Bm95, respectivamente.

## ABSTRACT

PECONICK, Ana Paula M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november 2006. **Conservation of nucleotides sequences of *bm86* gene and peptides sequences 4822 e 4823, constituents of synthetic vaccine SBm7462.** Adviser: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo. Co-advisers: Marlene Isabel Vilória Vargas and Jackson Victor de Araújo.

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is one of the most important parasites of cattle in Central and South America and Australia from an economical point of view. Vaccines derived from Bm86 glycoprotein have a great potential of non-chemical control of ticks. The SBm7462 is a synthetic vaccine derived from Bm86 and has three immunogenic epitopes: 4822 (a.a. 398-411), 4824 (a.a. 123-145) and 4823 (a.a. 21-35). The knowledge about the conservation of the *bm86* gene is very important to evaluate efficiency of SBm7462. Twenty six *R. (B.) microplus* strains from Argentina, Colombia, Uruguay and various regions from Brazil were analyzed for the *bm86*. Two fragments of cDNA were amplified, fragment A (among the nucleotides 39 – 438) and fragment C (among the nucleotides 839 - 1600). They were cloned into the pGEM-T® vector and four clones were sequenced for each population. The nucleotides and deduced amino acid sequences were compared with the *bm86* and *bm95* genes. The analysis was made through alignment of multiple sequences by the program BioEdit version 7.0.5.3 and the polymorphisms verification for visual inspection. The results demonstrated the genetic conservations of the peptides 4823 and 4822 for analyzed samples. Inside of the gene *bm86*, the amino acids variability was of 5,49% and 3,89% compared with Bm86 and Bm95, respectively.

## 1. INTRODUÇÃO

Entre as 869 espécies conhecidas de carrapatos no mundo (DE LA FUENTE e KOCAN, 2003), o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) possui grande importância veterinária, sendo o principal ectoparasito de bovinos, nas regiões tropicais e subtropicais do mundo.

Os prejuízos causados pela infestação de carrapatos e as doenças transmitidas, segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*), ultrapassam sete bilhões de dólares anuais no mundo. Somente no Brasil, que possui um rebanho com aproximadamente 170 milhões de cabeças, estudos apontaram prejuízos superiores a dois bilhões de dólares anuais (GRISI *et al.*, 2002; TAVARES, 2006).

O controle de carrapatos repousa principalmente na utilização de drogas carrapaticidas que são responsáveis pela seleção de populações resistentes (SANGSTER, 2001; TAYLOR, 2001). Outro problema com o uso de acaricidas é a contaminação com resíduos na carne, leite, derivados e no meio ambiente. Tudo isso aponta para a necessidade de pesquisas de métodos alternativos, seguros e eficientes de controle, atuando de modo integrado (WILLADSEN, 2006). Entre as alternativas, encontram-se os métodos de imunoprofilaxia. Atualmente encontram-se no mercado antígenos recombinantes derivados de proteínas ocultas (Bm86 e Bm95) do intestino do *R. (B.) microplus*. No entanto, algumas populações de carrapatos tem se mostrado insensíveis à vacinação,

possivelmente como consequência de polimorfismos genéticos com significado biológico nas proteínas Bm86 ou Bm95. Portanto, é necessário o desenvolvimento ou desenho de imunógenos que controlem as diferentes populações do parasito, para alcançar uma imunidade de população.

A construção de uma vacina sintética, denominada SBm7462, composta por determinantes imunogênicos da proteína Bm86 foi desenvolvida por PATARROYO *et al.* (2002). Essa vacina é constituída por três peptídeos denominados 4822, 4824 e 4823. Tendo em conta a variabilidade genética das proteínas do intestino das populações *R. (B.) microplus*, SOSSAI *et al.* (2005), analisou o polimorfismo do peptídeo 4824 em diferentes amostras do carrapato, demonstrando a conservação da seqüência em populações do Brasil, Argentina, Colômbia, Venezuela e Uruguai.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

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 e KEIRANS, 2001). Na descrição deste trabalho, adotar-se-a o novo status taxonômico. A classificação definida por NUÑEZ *et al.* (1982) com as atualizações propostas seguiria a seguinte ordem:

Filo: Arthropoda

Classe: Arachnida

Ordem: Acari

Subordem: Metastigmata

Família: Ixodidae

Subfamília: Rhipicephalinae

Gênero: *Rhipicephalus*

Espécie: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Seguindo a mesma linha de pesquisa taxonômica, estudos apontam para uma origem africana da subfamília Rhipicephalinae (MURREL *et al.*, 2000; MURREL *et al.*, 2001; BARKER e MURRELL, 2002). Ao longo dos séculos, o *R. (B.) microplus* se difundiu pelas regiões neo-tropicais 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 parasitas e a forma de manejar o controle dos mesmos (SUTHERST, 2001; ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2006). Na América Latina, o *R. (B.) microplus* encontra-se amplamente distribuído pelo Brasil, norte da Argentina, Paraguai, Uruguai, leste da Bolívia, Colômbia e Venezuela. No Brasil, destacam-se as regiões Centro-Oeste e Sudeste, locais com intensa atividade pecuária, que possuem além do hospedeiro, condições ideais de temperatura e umidade para o parasito (ESTRADA-PEÑA, 1999 e ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2006).

Aliado a sua extensa distribuição geográfica, os severos prejuízos causados pelo *R. (B.) microplus* à pecuária nacional 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. JONSSON (2006) calculou que cada fêmea ingurgitada é responsável por uma redução de aproximadamente 1,37g de peso dos bovinos. O mesmo autor ainda relata anemia, supressão do apetite e alteração no metabolismo como conseqüências da perda de produção devido à infestação de *R. (B.) microplus*.

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; SANTOS *et al.*, 1998; RUIZ *et al.*, 2005; OLIVEIRA-SIQUEIRA *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, 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- $\gamma$ ). 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 ciclo do *R. (B.) microplus* é dividido em fase de vida livre e fase de vida parasitária. A primeira fase inicia-se após a queda de teleógina ingurgitada com o período de pré-postura, ovopostura, eclosão dos ovos, neolarvas e larvas infestantes. A fase de vida parasitária começa quando a larva instala-se no hospedeiro, transformando-se em metalarva, ninfa, metaninfa. A partir desse momento já ocorre diferenciação entre os sexos, no caso do macho de metaninfa se transforma em neandro e gonandro. No caso de fêmea de metaninfa para neógina, partenógena e teleógina. O início da queda das teleóginas ocorre em média entre o 22º e 23º dias. Apenas um hospedeiro é parasitado, ou seja, trata-se de um carrapato do tipo monoxênico. A dinâmica e viabilidade da fase de vida livre são fortemente influenciadas pelo micro clima ao redor do carrapato, principalmente as condições de umidade e temperatura (GONZALES, 1974; CORSON *et al.*, 2004; SUTHERST e BOURNE, 2006). Apesar de ser conhecido como carrapato de bovinos, o *R. (B.) microplus* pode utilizar outras espécies como hospedeiros acidentais, como ovelha, veado, eqüino, coelho, canino, caprino e o próprio homem (GONZALES, 1974; PRATA *et al.*, 1999).

O processo reprodutivo e a digestão do sangue, segundo DA SILVA VAZ-Jr, *et al.* (2004), estão entre as funções preponderantes no *R. (B.) microplus*. Daí a importância de se conhecer bem os órgãos reprodutivos, a glândula salivar e o sistema digestivo da espécie.

A fêmea possui o ovário com uma única estrutura tubular, contínua e composta por um lúmen delimitado por pequenas células epiteliais. Os oocistos são classificados em seis estágios de acordo com suas características morfológicas e histológicas (SAITO *et al.*, 2005). Os espermatozoides aparecem como uma densa massa que se locomovem em contato com o



oviduto interno. Por microscopia eletrônica, visualizam-se modificações no núcleo do ovário, o que pode indicar singamia. O desenvolvimento embrionário desse artrópode é completado com 21 dias (CAMPOS *et al.*, 2006). A exaustão dos ovidutos no momento de ovoposição demonstra que nesse momento a vida da fêmea perde significância em função da nova geração (BRUM e NUNES, 1992; GARCÍA-FERNADEZ *et al.*, 1999).

NUNES *et al.* (2005) mostraram processos apoptóticos nas glândulas salivares das fêmeas completando o processo de ingurgitamento. A teleógina morre após realizar postura de 2000 a 4000 ovos no meio ambiente (PEREIRA, 1982).

As fêmeas da espécie de *R. (B.) microplus* podem ingerir de sangue 100 vezes mais a massa do próprio corpo. Mecanismos que protegem o carrapato de moléculas nocivas do hospedeiro permitem que essa espécie seja bem adaptada a uma alimentação hematófaga. Sua estrutura histológica intestinal é constituída por uma membrana basal coberta de fibras musculares longitudinais e circulares (HERNÁNDEZ *et al.*, 1997). As células digestivas intestinais promovem a endocitose de componentes do sangue e grandes quantidades de heme são armazenadas no hemossomo, a heme é liberada durante a digestão da hemoglobina e está envolvida em catalises nas reações de redox. A heme possui sua toxicidade inibida por uma lipoproteína de ligação da heme (*heme-binding lipoprotein* – HeLp), podendo dessa forma, ser reutilizada pelo carrapato (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2004; LARA *et al.*, 2005; GRAÇA-SOUZA *et al.*, 2006). A principal proteína do ovo dos carrapatos, a vitelina, é um reservatório de nutrientes e heme para o desenvolvimento do embrião, isso sugere que a ligação de heme com a vitelina representa um importante mecanismo anti-oxidante, protegendo o embrião (LOGULLO *et al.*, 2002). Muitas outras moléculas essenciais para o processo digestivo do *R. (B.) microplus* já foram estudadas, bem como suas glândulas salivares (NUNES *et al.*, 2005; NUNES *et al.*, 2006; CIPRANDI *et al.*, 2006), sendo que algumas apresentam potencial de serem usadas na biomedicina, como o peptídeo antimicrobiano *Ixodidin* (FOGAÇA *et al.*, 2005).

## 2. 2 Medidas de controle do *R. (B.) microplus*

O controle de carrapatos está centrado, atualmente, no uso de pesticidas das mais variadas bases químicas. O alvo desses compostos químicos, em geral, é o sistema nervoso do ectoparasito. Recentes pesquisas propõem o uso de ectoparasiticidas tendo como objetivo afetar os mecanismos reguladores do crescimento, neuropeptídeos e o sistema neuroendócrino (TAYLOR, 2001).

O uso indiscriminado de acaricidas, e muitas vezes sem critérios técnicos, levou a uma pressão de seleção culminando na aquisição de resistência (processo irreversível) por parte dos parasitas aos mais diversos grupos químicos. Resistência a acaricidas é o maior obstáculo à produção pecuária. A definição de resistência, segundo SANGSTER (2001), é a habilidade de um parasita sobreviver a doses de droga que normalmente mataria espécies iguais e no mesmo estágio de desenvolvimento, sendo que esse é um processo relacionado com fatores genéticos, biológicos e operacionais. Existem vários tipos de mecanismos de resistência para cada classe de acaricida. Mutação no local alvo do acaricida representa o principal mecanismo de resistência observado, mas há exemplos de mecanismos metabólicos (BAXTER e BARKER, 1998; FOIL *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos comparam a biologia reprodutiva entre linhas de carrapatos resistentes e susceptíveis a acaricidas. O padrão geral dos resultados revela um comportamento biológico semelhante ou com pequena significância biológica tendendo para menores índices reprodutivos para as cepas resistentes. Esses índices referem-se ao peso, número e viabilidade dos ovos (GLÓRIA *et al.*, 1993; DAVEY *et al.*, 2006).

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 ao *R. (B.) microplus*. 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; FERNANDEZ-RUVALCABA, 2004). Outra medida que tem sido abordada é o banho dos animais com extratos fitoterápicos que inibem o acesso das larvas (HEIMERDINGER *et al.*, 2006). Por outro lado o emprego de entomoparasitas é outra técnica sob avaliação. Entre os entomoparasitas pode-se destacar a mosca *Megaselia scalaris* que reduz o número de ovos das teleóginas (ANDREOTTI *et al.*, 2003). Nematóides entomopatogênicos são promissores agentes biológicos no controle de diversas espécies de carrapatos, entre elas o *R. (B.) microplus*, destruindo a hemocele dessas espécies (SAMISH e GLAZER, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2004). Fungos entomopatogênicos, com ação similar ao exposto anteriormente, de diferentes gêneros estão apresentando resultados satisfatórios como pesticidas (BITTENCOURT *et al.*, 2003; POLAR *et al.*, 2005a; POLAR *et al.*, 2005b; BAHIENSE *et al.*, 2006), entre outras medidas.

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 (JONSSON *et al.*, 2000a; FRISCH *et al.*, 2000; TEODORO *et al.*, 2004). O que se sabe é que bovinos com maior grau de sangue zebuino (*Bos indicus*) possuem maior resistência à 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; TEODORO *et al.*, 2004; JONSSON, 2006).

Pesquisas e avanços científicos na área de imunologia, como a compreensão cada vez maior sobre biologia de parasitas, uso de modernas ferramentas como a biologia molecular e alta escala de produção permitem que vacinas anti-parasitárias sejam uma grande possibilidade (DALTON e MULCAHY, 2001). O desenvolvimento de vacinas contra carrapatos representa uma promissora alternativa de controle.

A associação de medidas representa maior garantia de bons resultados no do carrapato (SANGSTER, 2001). 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 (WILLADSEN, 2006).

### **2.3 Vacinas contra o *R. (B.) microplus***

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 (ANDRÉ, 2001; BABIUK, 2002). Vacinas convencionais são usadas há mais de 200 anos, desde o reconhecimento, por Edward Jenner, de que vacina poderia proteger os seres humanos contra a varíola, em 1798 (TIZARD, 1999). Entre as diversas vantagens do uso de vacinas pode-se destacar que essas possuem uma ação mais sustentável, são livres de resíduos, são mais espécie-específica, podem ter um custo menor de produção, fácil administração e minimização das chances de ocorrer problemas com resistência (WILLADSEN, 1997).

O desenvolvimento de vacinas e seu licenciamento requerem muitas etapas e decisões feitas por especialistas que interagem em seus estudos. A questão central está no controle da qualidade de seu desenvolvimento, de sua produção, armazenamento e uso. É um contínuo processo que envolve desde avanços tecnológicos ao marketing comercial, passando pela identificação e boa caracterização de antígenos protetores; determinação do processo de uma viável produção comercial do antígeno; a formulação desses antígenos mais adjuvantes como uma vacina capaz de fornecer uma resposta imunológica apropriada e sustentável; a validação do protótipo no campo (NALIN, 2002).

A aplicação de amplas técnicas moleculares revoluciona os conhecimentos sobre resposta imune protetora frente à ectoparasitas e levanta possíveis alvos para a construção de vacinas. E não há dúvida de que a vacinação contra carrapatos apresenta maior sucesso do que contra qualquer outro ectoparasita, provavelmente porque os primeiros se alimentam mais devagar do que outros insetos, ficando mais tempo em contato com o sistema imune do hospedeiro, ou pela forma de digestão intracelular (WILLADSEN, 2001; DALTON e MULCAHY, 2001).

Há mais de 70 anos que parcial ou forte imunidade contra infestações de carrapatos é induzida por vacinação com uma variedade de materiais antigênicos, incluindo macerados de todo o carrapato, extratos das glândulas salivares, material intestinal, cutículas, entre outros (WILLADSEN, 2004).

Dois tipos antigênicos distintos são muito discutidos. O primeiro refere-se a antígenos naturais ou antígenos “expostos”, que são secretados Junto com a saliva do carrapato durante a alimentação. Antígenos ocultos, representando o segundo grupo, normalmente não entram em contato direto com o sistema imune do hospedeiro, entre esses estão as proteínas derivadas do intestino ou dos ovos do carrapato, por exemplo. Relata-se ainda um terceiro grupo intermediário, com propriedade de ambos (TRIMNELL *et al.*, 2002; NUTTALL *et al.*, 2006).

A identificação de antígenos protetores para bovinos contra o *R. (B.) microplus* é crescente visto o impacto econômico e as dificuldades, já mencionadas, no controle desse parasita. São pesquisados antígenos larvais; antígenos das glândulas salivares (64TRP); precursores de enzimas proteolíticas; proteínas intestinais (Bm91, Bm86, BMA7); a vitelina e outras glicoproteínas dos ovos dos carapatos (BYC); a calreticulina, entre outras (WILLADSEN *et al.*, 1996; ANDREOTTI *et al.*, 2002; DE LA FUENTE e KOCAN, 2003; SINGH e GHOSH, 2003; DA SILVA VAZ Jr. *et al.*, 2004; TRIMNELL *et al.*, 2005; PRUETT *et al.*, 2006; LEAL *et al.*, 2006a e 2006b).

WILLADSEN *et al.* (1989) isolaram uma glicoproteína, de 89.000 Da de peso molecular e ponto isoelétrico entre 5,1 a 5,6, da membrana intestinal de uma amostra de *R. (B.) microplus* australiana (Yeerongpilly) e denominaram essa proteína de Bm86, estando presente em larvas, ninfas e adultos. Esse antígeno foi identificado através de séries de fracionamento e provas de vacinação. OLIVEIRA (1998) determinou que a Bm86 se localiza, mais precisamente, nas microvilosidades da membrana das células epiteliais do intestino, sendo altamente concentrada próximo à membrana basal. É uma molécula de 650 aminoácidos com potenciais sítios de glicosilação. O gene *bm86* possui 2225 nucleotídeos. Especula-se que sua função esteja relacionada com a endocitose.

Em 1994, na Austrália, foi liberada a primeira vacina comercial contra o *R. (B.) microplus*, utilizando clonagem do gene *bm86* em *Escherichia coli* e produção da proteína recobinante 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 entre 50 e 91%. Esses valores são avaliados pela redução da viabilidade e do número de ovos, conseqüentemente diminuindo o número de carrapatos nas gerações subseqüentes, tendo todos os estágios de desenvolvimento comprometidos (RODRIGUEZ *et al.*, 1994; JONSSON *et al.*, 2000b). Alterações histológicas do trato digestivo do *R. (B.) microplus* pela ação de anticorpos anti-rBm86 também já foram avaliados por HERNÁNDEZ *et al.* (1997), que observaram as destruições de células digestivas, secretoras e basofílicas, além de erosão e ruptura da parede intestinal e extravasamento do conteúdo digestivo para a cavidade celomática.

Vacinas contendo a Bm86 atuam por meio de anticorpos anti-Bm86, com o possível envolvimento do complemento e outros mecanismos efetores (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 1998; WILLADSEN, 2004).

Algumas amostras de *R. (B.) microplus*, entretanto, mostraram-se menos susceptíveis a vacina recombinante Bm86 (rBm86). O gene *bm95* foi isolado de uma população de carrapatos argentinos (cepa A), 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.*, 2000). A proteína Bm95, com função homóloga a Bm86, possui 2225 nucleotídeos que codificam 569 aminoácidos.

O isolamento geográfico de cepas de *R. (B.) microplus* pode levar a essas diferenças genéticas e fisiológicas, remetendo a uma resposta negativa ao controle pela vacinação (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 1999). 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. (B.) microplus*.

#### **2.4 O imunógeno sintético SBm7462**

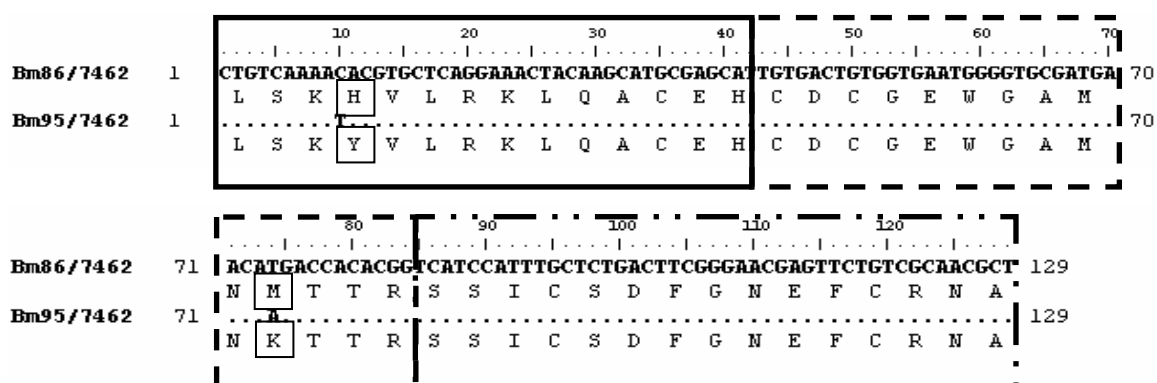
O uso de peptídeos sintéticos representa uma promissora ferramenta na produção de vacinas. Vantagens significativas no uso desses peptídeos são citadas por NEURATH e KENT (1986), tais como alto grau de pureza, ausência

de contaminantes, baixo custo de produção em alta escala, estabilidade (uma vez que não se observam enzimas proteolíticas originárias de material biológico), completa caracterização química e reprodutibilidade. PATARROYO *et al.* (1994) citam também a ausência de mecanismos supressores, alérgicos ou autoimunes, e mecanismos de evasão típicos de microorganismos.

A primeira vacina sintética contra o *R. (B.) microplus*, foi denominada de 4912, que apresentou resultados pouco satisfatórios (Oliveira, 1998). Com o avançar das pesquisas a SBm7462 foi desenvolvida por PATARROYO *et al.* (2002), apresentando bons resultados e já representa um produto patentado. A partir de estudos por predição computacional, seqüências foram definidas como determinantes antigênicos. O imunógeno possui três peptídeos, que somam 43 aminoácidos, com seqüências 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 seqüências como 4822 (aa. 398-411), 4824 (aa. 132-145) e 4823 (aa. 21-35), a SBm7462 possui essas seqüências nesta ordem e com duas cisteínas no C- e N- terminais.

Após alinhamento entre as proteínas Bm86 e Bm95 foi observado que apenas duas mudanças ocorrem dentro das seqüências que constituem a SBm7462. Acredita-se que essas seqüências se mantiveram conservadas durante a evolução deste parasito (SOSSAI *et al.*, 2005).

Os resultados de estudos com a SBm7462 sugerem que anticorpos específicos e outros componentes do sistema imune exerçam um importante papel na proteção do rebanho contra o *R. (B.) microplus*, o que reflete uma seqüência com epitopos antigênicos e imunogênicos da proteína Bm86. A eficácia da vacina mostrou-se satisfatória (81,05%) na redução do número de carrapatos, promovendo imunidade de rebanho e não apenas individual (PATARROYO *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Desenho da vacina sintética SBm7462, comparando com as seqüências homólogas da proteína Bm95. Os aminoácidos em destaque são os que variam entre os determinantes imunogênicos das duas proteínas. O peptídeo 4822 está representado pelo retângulo com linhas cheias, o 4824 com linhas tracejadas e o 4823 com linhas interrompidas (SOSSAI, 2004).

Testes a campo da vacina concordam com os resultados do trabalho anterior, realizados em laboratório. Neste também observou-se aumento do título de anticorpos específicos, redução do número de teleóginas, da taxa de ovoposição, da relação peso das larvas/peso dos ovos, do peso dos ovos, das teleóginas e da fertilidade dos ovos, alcançando uma eficiência final de 53,29% para o grupo vacinado com 2,0 mg do peptídeo SBm7462 (COUTO PIMENTEL, 2002). Esses resultados são melhores do que os obtidos na maioria dos testes com rBm86 em iguais condições de manejo e estresse (RODRIGUEZ *et al.*, 1994; PENICHET *et al.*, 1994; FRAGOSO *et al.*, 1995; MASSARD *et al.*, 1995).

GONZÁLEZ-LOMBANA (2003) demonstrou a eficiência do peptídeo sintético SBm7462 na construção de uma resposta imune antígeno-específica que envolve mecanismos celulares e humorais, com a produção predominante de imunoglobulinas antígeno-específicas do isótipo IgG1 sobre o isótipo IgG2. Os mecanismos induzidos foram similares de resposta imune ao de uma proteína integra recombinante ou natural, chegando inclusive a conferir imunidade protetora (PATARROYO e GONZÁLEZ-LOMBANA, 2004).

Outras pesquisas testaram um modelo de liberação lenta em microesferas biodegradáveis PLGA (poliésteres derivados dos ácidos lácticos e glicólico) e avaliaram a resposta imune de bovinos vacinados. Os resultados



revelaram que as microesferas PLGA mostram-se viáveis para serem utilizadas como sistema de liberação para este peptídeo, entretanto, a saponina potencializou melhor resposta imune do peptídeo SBm7462, tendo sido também esta resposta mais precoce (SALES-JUNIOR *et al.*, 2005).

## 2.5 Estudos Genéticos com o *R. (B.) microplus*

O avanço de técnicas de biologia molecular providencia ferramentas para compreender muitas questões biológicas e esses métodos estão sendo aplicados em várias pesquisas na área de parasitologia (SANGSTER *et al.*, 2001). Muito do sucesso na prevenção e controle de doenças parasitárias advém do melhor conhecimento das interações hospedeiro-parasita, de estudos genômicos, de proteomas e uso da bioinformática (PRICHARD e TAIT, 2001; KRASKY *et al.*, 2006; KRASKY *et al.*, 2006).

O *R. (B.) microplus* possui 10 pares de cromossomos autossomos e mais um cromossomo X em machos e dois cromossomos X em fêmeas (HILBURN *et al.*, 1989). O tamanho do genoma e organização do DNA do *R. (B.) microplus* foram estudados por ULLMANN *et al.* (2005), definindo-se que esse carrapato possui 7,5 pg ( $7,1 \times 10^3$  Mbp) de DNA por célula, sendo 30% de regiões únicas, 38% de DNA moderadamente repetido, 31% altamente repetido e 0,82% organizado em *tandem*. Um projeto para realizar o sequenciamento de todo o genoma dessa espécie e suas implicações já é discutido, atento para que estudos genômicos, além de guiar a busca por medidas modernas de controle, são promissores para elucidação e uso de biomoléculas em Medicina Humana (GUERRERO *et al.*, 2006; WILLADSEN, 2006).

As construções de livrarias de cDNA permitem a identificação e o estudo do genoma de organismos. Diversas livrarias de cDNA de *R. (B.) microplus* vêm contribuindo para importantes caracterizações dessa espécie. Utilizando-se da análise dos padrões de expressão dos genes por meio de *expressed sequence tags* (ESTs), pesquisadores identificam genes do *R. (B.) microplus*. Alguns homólogos com outras espécies, outros exclusivo do carrapato. Esse tipo de pesquisa trouxe informações de genes envolvidos com a resistência (CRAMPTON *et al.*, 1998; GUERRERO *et al.*, 2005).

Nova técnica denominada *expression library immunization* (ELI) em combinação com a análise de EST vem sendo utilizada para identificação de antígenos candidatos a vacinas contra carrapatos (ALMAZAN *et al.*, 2003). Análises proteômicas também já contribuem para essa revolução entomológica (UNTALAN *et al.*, 2005).

A identificação e amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) do loco de microsátélites, que se mostraram pleomórficos no *R. (B.) microplus*, possui potencial de ser usado para identificar distintas linhagens desse parasita, oriundos de várias localidades (CHIGAGURE *et al.*, 2000). Genes associados ao complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de bovinos foram associados com infestação de carrapatos, a partir de estudos de polimorfismo em microssátélites classe II (ACOSTA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2005).

Comparações entre seqüências de ácidos nucléicos 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 (BEATI e 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).

A variação genômica dentro de uma espécie possui grande impacto. Quando referida a um parasita, essa situação remete principalmente para a mudança de seu status epidemiológico e dificuldade de seu controle. São vários os trabalhos tentando identificar polimorfismo genético do *R. (B.) microplus*. A mutação de apenas um aminoácido ou de um nucleotídeo pode representar resistência do carrapato frente a diferentes bases químicas de carrapaticidas (HERNANDEZ *et al.*, 2000; GUERRERO *et al.*, 2001).

Num mesmo estado do Brasil (Rio Grande do Sul), usando três diferentes sondas de cDNA por meio da técnica de RFLP (Polimorfismo de Tamanho em Fragmentos de Restrição), PASSOS *et al.* (1999) identificou variabilidade genética no carrapato *R. (B.) microplus*.

Em amostras da Austrália, Cuba, México, Venezuela e Argentina, observou-se variabilidade na seqüência de aminoácidos da proteína Bm86 e esse polimorfismo pode estar associado a menor susceptibilidade dos carrapatos frente a rBM86 (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 1999; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000; DE LA FUENTE *et al.*, 2000; WILLADSEN, 2004).

SOSSAI *et al.* (2005) analisou polimorfismos no gene da proteína Bm86 de populações de *R. (B.) microplus* proveniente de regiões geograficamente distintas. Foram feitas ampliações, clonagens e sequenciamentos de fragmento do gene *bm86* compreendido entre os nucleotídeos 278 – 1071, com o objetivo principal de se avaliar a conservação genética do peptídeo 4824, integrante do imunógeno SBm7462. Entre as amostras avaliadas do carrapato, foram reveladas variações do locus do gene *bm86*. Entretanto, a seqüência de aminoácidos do peptídeo mostrou-se conservada entre essas populações.

Com o intuito de identificar a existência de variabilidade genética das porções 4822 e 4823, completando assim a análise dos determinantes imunogênicos da vacina sintética SBm7462, é necessário o estudo da conservação genética desses epítomos para se obter as bases moleculares científicas da eficiência da vacina sintética sobre as diferentes populações do parasito.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estimar a conservação na seqüência nucleotídica do gene *bm86* entre populações de *Rhipicephalus(B.) microplus* provenientes de diferentes regiões brasileiras e outros países sul-americanos.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Amplificar, clonar e sequenciar as regiões compreendidas entre os nucleotídeos 39 a 438 e 839 a 1600, do gene *bm86*;
2. Determinar a variação de nucleotídeos e de aminoácidos das proteínas Bm86 e Bm95 compreendidos respectivamente entre os nucleotídeos 39 a 438 e 839 a 1600, entre populações de *R. (B.) microplus*;
3. Verificar a identidade das seqüências de DNA e peptídicas de *R. (B.) microplus* com outras espécies de carrapatos, por meio do alinhamento com seqüências depositadas em banco de dados;
4. Determinar a conservação das seqüências peptídicas 4822 e 4823 entre as populações de *R. (B.) microplus* analisadas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local**

A maior parte do experimento foi desenvolvida no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV) e no Laboratório Virologia Molecular Animal (LVMA), ambos localizado no BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa (UFV). As amostras foram sequenciadas no Laboratório de Genética Molecular, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Gado de Leite e no Laboratório de Genômica, localizado no BIOAGRO, também na Universidade Federal de Viçosa.

### **4.2. Obtenção de carrapatos**

O Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores, LBCHV, possui um banco do parasita *R. (B.) microplus*, com amostras de RNA, estocado em freezer -70°C, e de amostras de carrapatos (ovos embrionados,

larvas e adultos) provenientes de distintas regiões geográficas, mantidos *in vivo* ou estocados em freezer -20°C.

O presente estudo analisou 26 amostras de diferentes regiões brasileiras e de outros países latino-americanos (tabela 1).

As teleóginas (fêmeas ingurgitadas) que foram adquiridas vivas, foram incubadas para obtenção de larvas, em estufa Incubadora B.O.D., modelo 347-CD microprocessada nas seguintes condições: aproximadamente 28°C e 80% de umidade relativa (condições ótimas para oviposição da fêmea). Os ovos foram coletados nas primeiras 48 horas. Após, em média, 15 dias os ovos eclodiram liberando larvas, amostras foram aliqüotadas 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.

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

<b>Amostra</b>	<b>Município</b>	<b>Estado</b>	<b>País</b>
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 das Caraíbas	Córdoba	Colômbia
PDV	Palma Del Vino	Cundinamarca	Colômbia

### **4.3 Extração do RNA total de *R. (B.) microplus***

Para as amostras que não estavam estocadas no banco do laboratório ou se essas estavam estocadas, mas encontravam-se degradadas, realizou-se a extração do RNA (ácido ribonucléico) total.

Durante a manipulação do RNA, uma série de cuidados foi seguida visando à integridade do material. A água e todas as soluções-estoques foram tratadas direta ou indiretamente com dietilpirocarbonato (DEPC). E toda vidraria e demais materiais utilizados foram separados para a manipulação.

O RNA de *R. (B.) microplus* foi extraído utilizando-se o reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>) obedecendo a recomendações do fabricante, acrescida de algumas modificações.

Aproximadamente 100 mg de larvas ou meia teleógina foram maceradas dentro de tubos de polipropileno de 1,8 ml com o auxílio de uma ponteira de vidro autoclavada e livre de RNase, em nitrogênio líquido, até a formação de um fino pó.

Cada tubo recebeu 250 µl de água milliQ tratada com DEPC e 750 µl do reagente Trizol<sup>®</sup>. Após homogeneização, deixou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Os próximos passos consistiram na adição de 200µl de clorofórmio a cada amostra. Verteu-se por 15 segundos e foram centrifugadas 12000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante, que contém o RNA total, foi transferido para um tubo limpo e precipitado com 1 ml de isopropanol, *overnight* a – 20°C. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por mais 15 minutos a 12000xg a 4°C. Os precipitados formados foram lavados duas vezes com 1 ml de etanol 75%, nova centrifugação a 9000 x g durante 10 minutos, e secos por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizando, as amostras foram ressuspensas em 20 µl de água milliQ tratada com DEPC e colocadas durante 10 minutos em banho-Maria, na temperatura de 55°C ou até a dissolução dos precipitados. O armazenamento das amostras, até o momento de uso, foi feito em freezer –70°C.

Para determinar a qualidade do RNA, as amostras foram analisadas em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo. As concentrações e o grau de pureza também foram determinados por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

#### 4.4 Tratamento das amostras com DNase

Visando garantir a qualidade e a pureza das amostras foi realizado tratamento com a enzima DNase (Promega®). Para cada amostra de RNA de 5 a 10 µg, adicionou-se 10 µl de tampão 10X RQ1DNase (Promega®), 10 µl de DTT 100mM, 1 U de *RQ1 RNase-free DNase* para cada µg de RNA e água DEPC em quantidade suficiente para 100 µl.

Em seguida cada tubo foi incubado a 37°C, por 45 minutos em banho-maria. E o RNA foi novamente extraído com Trizol® segundo o protocolo anterior. O precipitado final formado, depois de lavado com 500 µl de etanol 70% livre de RNase, foi seco e ressuspensão com aproximadamente 20 µl de água DEPC.

#### 4.5 Síntese de cDNA por RT (Transcriptase Reversa)-PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)

A síntese da primeira fita de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar) utilizou o Kit SuperScript™ First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen®) em termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). Na primeira etapa, 5 µg de RNA total foram adicionados a 1 µl de oligo d(T) (10mM) com um volume de água DEPC suficiente para completar 12 µl em tubos de 0,2 ml. A reação foi incubada a 70°C por 10 minutos e posteriormente a 4°C por 2 minutos.

Num segundo momento, 7 µl do *mix* contendo 2 µl do tampão RT 10X; 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 1 µl de dNTP (10 mM) e 2 µl de DTT (0,1 M) foram adicionados em cada tubo e incubados por 42°C por 5 minutos. Em seguida, 0,5 µl (2,5U) da enzima SuperScript™ II RT foram adicionados em cada tubo, homogêneos e incubados a 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos, finalizando com um banho de gelo por 2 minutos.

Na última etapa da reação foi realizado um tratamento com 0,5 µl de RNase H (10mM) por 20 minutos a 37°C com a finalidade de degradar as fitas de RNA complementares ao cDNA, deixando apenas as fitas de cDNA no



produto final. Estes foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  em tubos de polipropileno de 1,6 ml até o momento do uso.

#### 4.6 Reação em Cadeia de Polimerase com cDNA de *R. (B.) microplus*

Foram feitos dois pares de iniciadores diretos e reversos (*primers forward* e *reverse*) para flanquear as regiões do gene *bm86* (cepa Yeerongpilly) compreendidas entre os nucleotídeos 839 a 1600 (fragmento C), que contém a seqüência que codifica o peptídeo 4822, e entre os nucleotídeos 39 a 438 (fragmento A), contendo a seqüência que codifica o peptídeo 4823 (Tabela 2). Os desenhos desses *primers* foram feitos através do software Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), e sua síntese pela Invitrogen®.

Os fragmentos de DNA (ácido desoxirribonucléico) desejados foram amplificados por PCR utilizando-se cDNA de *R. (B.) microplus*. As reações para os dois fragmentos estão representadas na tabela 2. Utilizou-se Plantium® Taq DNA Polimerase. Para completar um volume final de 25 $\mu\text{l}$  acrescentou-se água milliQ autoclavada. Em todas as reações utilizou-se controle negativo, utilizando-se água no lugar de cDNA, verificando-se possíveis contaminações.

**Tabela 2** - Reações em cadeia de polimerase para os fragmentos A e C.

REAÇÃO	Frag.A	Frag.C
PCR <i>buffer</i> 10x	2,5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1,25 $\mu\text{l}$	1,25 $\mu\text{l}$
dNTP 2,5mM	3,0 $\mu\text{l}$	3,0 $\mu\text{l}$
DNA	2,0 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$
<i>Taq</i>	0,5 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$
<i>Primer</i> R 10mM	1,5 $\mu\text{l}$	1,0 $\mu\text{l}$
<i>Primer</i> L 10mM	1,5 $\mu\text{l}$	1,0 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	12,75 $\mu\text{l}$	13,25 $\mu\text{l}$
Vol./reação	25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$

Todas as reações foram definidas com uma temperatura inicial de desnaturação de 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos; 56°C por 90 segundos e 72°C por 60 segundos para extensão das fitas pela Taq DNA polimerase. Ao final dos ciclos foi realizada uma extensão final de 7 minutos à 72°C.

Cada amostra teve seu volume multiplicado por três, totalizando 75µl de volume final amplificado. Depois de amplificados, as amostras de DNA foram acrescidas de 12 µl de corante tipo IV 4X (0,25% bromofenol *blue* e 40% sacarose) e aplicados em gel de agarose de alta resolução 1%, corado com brometo de etídeo, na voltagem de 90 volts em cuba de eletroforese horizontal, tendo TBE (Tris-borato 0,09M e EDTA 0,002M) como tampão de corrida. Com o auxílio de padrão de peso molecular, identificou-se a banda de interesse.

**Tabela 3** – Sequências dos primers utilizados para ampliações dos fragmentos.

<b>Primers</b>	<b>Seqüências 5' – 3'</b>
A <i>forward</i>	GGCATCGCTTTGTTTCGTC
A <i>reverse</i>	CACCACAGTCACACGTTGC
C <i>forward</i>	TCGTGTGCAGAAAGGAACTG
C <i>reverse</i>	TTAGTGTCTGGTGGGCATTG

#### 4.7 Purificação dos fragmentos de DNA de géis de agarose

A extração da banda de interesse do gel de agarose foi necessária devido ao aparecimento de ampliações inespecíficas. Após a eletroforese, a banda de interesse e outra banda de tamanho distinto foram detectadas no gel de agarose 1%, principalmente quando utilizado os *primers* A. Utilizou-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega®) nessa etapa do experimento.

Quando se trabalhou com os *primers* C, a banda no gel de tamanho de 762 pb foi excisada sob luz ultravioleta, com auxílio de uma lâmina de bisturi e condicionada em tubos de 1,8 ml identificados com o nome da amostra e pesados. Nas ampliações com os primers A, a banda no gel de

aproximadamente 400 pb foi excisada da mesma maneira descrita anteriormente.

Para cada 1 mg de gel extraído, 1 µl de solução de ligação de membrana, fornecida pelo kit, foi adicionada. As amostras foram incubadas em banho-maria a 60°C até completa dissolução do gel, nunca ultrapassando 15 minutos. As soluções foram transferidas para mini-colunas e incubadas por 1 minuto em temperatura ambiente. Os conjuntos formados pelos tubos coletores e mini-colunas foram centrifugados por 1 minuto a 10.000xg em microcentrífuga descartando-se os líquidos residuais.

Em cada mini-coluna foram adicionados 700 µl da solução de lavagem de membrana e submetida à centrifugação por mais 1 minuto a 10.000xg. Os líquidos residuais foram descartados. Realizou-se nova lavagem com 500 µl de solução. Centrifugou-se por 5 minutos a 10.000xg.

As mini-colunas foram transferidas para tubos novos de 1,8 ml e foram adicionados 20 µl de água milliQ livre de nuclease. Após incubação por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugação por 10.000xg por 1 minuto, os líquidos residuais com os fragmentos de DNA que foram separados no gel de agarose foram estocados a -20°C até o momento do uso para reação de ligação em vetor plasmidial.

#### **4.8 Produção de Células Ultra-competentes DH5α**

As células hospedeiras *Escherichia coli* linhagem DH5α utilizadas para clonagem nesse trabalho foram feitas de acordo com INOUE *et al.* (1990).

A linhagem de *E. coli* DH5α foi ativada em placa contendo meio LB sólido (10 g de Triptona; 10 g de NaCl; 5 g de Extrato de Levedura; 1,5% de agar e água milliQ q.s.p. 1000 ml) sem antibiótico. Cinco colônias foram inoculadas em 150 ml de meio SOB (3g de Triptona; 0,75g de extrato de levedura; 0,075 g de NaCl; 1,5 ml de KCl 0,25 M; 0,75 ml de MgSO<sub>4</sub> 2 M; 150 µl de NaOH 5 M; e água destilada em quantidade suficiente para 150 ml, com água destilada) em Erlenmeyer de 500 ml. As colônias foram crescidas a 18°C sob agitação 150xg até atingir uma OD600 aproximadamente de 0,6.

Após atingir a OD desejada, a cultura foi transferida para dois tubos de polipropileno de 50 ml, mantida no gelo por 10 minutos e centrifugada a 2.000xg por 20 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante os *pellets* foram ressuspensos gentilmente em 15 ml de TB gelado [(10 mM de Pipes; 15 mM de CaCl<sub>2</sub> e 250 mM de KCl pH 6.7) mais 55 mM de MnCl<sub>2</sub>] e incubados no gelo por 10 minutos. Posteriormente, juntando os dois volumes em um único tubo, nova centrifugação a 1000xg por 10 minutos foi realizada e o *pellet* ressuspensado em 8 ml de TB gelado enriquecido com 7% de DMSO e incubado no gelo por mais 10 minutos. As células foram aliqüotadas em volume de 200 µl, congeladas em nitrogênio líquido e armazenada a -70°C.

A eficiência da transformação das *E. coli* DH5α foi calculada por meio da transformação com o plasmídeo puC18. Para realização desse cálculo, 0,2 ng do vetor pUC18 foi utilizado para transformar 200 µl de células competentes em 800 µl de meio SOC (2g de Triptona; 0,5 g de extrato de levedura; 0,05 g de NaCl; 1 ml de KCl 0.25 M; 0,5 ml de MgSO<sub>4</sub> 2 M; 10 µl de NaOH 5 M; 2 ml de glicose 1M; completar para 100ml com água deionizada). Assim a concentração final do vetor é de 0,0002 ng/µl. O protocolo de transformação foi o mesmo utilizado para o vetor pGEM-T®.

Após incubação por 16 horas em estufa à 37°C, a placa foi dividida em quatro quadrantes onde se contou o número de colônias de um quadrante, multiplicando o valor encontrado por quatro, obtendo-se a quantidade final de colônias. O cálculo da eficiência foi realizado pela divisão do número total de colônias (UFC) pela concentração do clone plaqueado obtendo-se uma eficiência de  $6 \times 10^6$  UFC/ng do vetor.

#### **4.9 Clonagem de Fragmentos com Extremidades Coesivas**

A clonagem do DNA extraído do gel foi realizado por meio do kit comercial pGEM® - T Easy Vector Systems (Promega®). Esse vetor é preparado pelo corte do pGEM®-T Easy Vector com a enzima de restrição EcoR V e adição nas extremidades 3' de uma timina. Isso aumenta a eficiência de ligação do produto de PCR dentro do plasmídeo, pois as polimerases termoestáveis freqüentemente adicionam uma simples desoxiadenosina no

final 3' do fragmento amplificado e que impede a sua re-circularização. O processo é dividido em etapas. Na primeira, processa-se a reação de ligação. E em seguida, a reação de transformação, a partir da qual os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar.

As reações de ligação foram realizadas em tubos de 0,6 ml com 2,5µl de 2X *Rapid Ligation Buffer*, 0,5 µl (25 ng) de pGEM® - T Easy Vector, 0,8 µl (50 ng) do produto de PCR, 0,5 µl de T4 DNA ligase e 0,2 µl de água milliQ autoclavada. As reações depois de homogeneizadas por pipetagem foram mantidas a 16°C durante 12 horas com o objetivo de se alcançar maior eficiência de ligação.

Para a reação de transformação, retiraram-se os tubos com as células competentes do freezer -70°C e as mesmas foram descongeladas em banho de gelo. Cada tubo recebeu 5 µl da reação de ligação, foi homogeneizado lentamente e mantido no gelo por trinta minutos. Em seguida, as células foram submetidas a choque térmico, primeiro colocadas a 42°C por 90 segundos e, em seguida, a 4°C por 2 minutos. Adicionou-se 800 µl de meio SOC e permaneceu por 1 hora a 37°C, por 180xg em agitador.

Placas de Petri com meio LB sólido com 100µg/ml de ampicilina, 100 µl de IPTG (100mM) e 20 µl de X-gal (50 mg/ml) foram semeadas com 100 µl de células transformadas. As placas foram fechadas, vedadas com filme plástico, invertidas e mantidas em estufa, a 37°C durante 17 horas.

As colônias portadoras do fragmento de interesse foram identificadas pela coloração da colônia e pela técnica de PCR de colônias. A cor branca que a colônia positiva adquire está relacionada à possibilidade ou não da *E. coli* degradar a galactosidase. As colônias brancas contêm o inserto adicionado ao plasmídeo, interrompendo o gene responsável pela síntese de β-galactosidase, enzima capaz de degradar o açúcar X-gal e dar cor azul às colônias negativas.

O teste de PCR de colônia foi constituído por 1X de PCR buffer 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl); 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,3 mM de dNTPs; 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase e 0,4 µM dos primers M13 *forward* (5' GGTGTTAAACGACGGCCAGT 3') e M13 *reverse* (5' - CAGGAAACAGCTATGACC - 3') e água milliQ autoclavada para completar um volume final de 25 µl. As reações foram submetidas a 94°C por 10 minutos, para rompimento das células e desnaturação inicial do molde; 35 ciclos

sucessivos a 94°C por 30 segundos; 55°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Em gel de agarose 1%, selecionaram-se as colônias com aproximadamente 800 pb para o fragmento C e de aproximadamente 400 pb para o peptídeo A.

#### **4.10 Crescimento bacteriano em meio líquido e estoque dos clones**

As colônias que tiveram o fragmento inserido, denominadas de positivas, foram crescidas em meio LB líquido (10 g de Triptona; 10 g de NaCl; 5 g de Extrato de Levedura e água milliQ q.s.p 1000 ml) com 100 µg/ml de ampicilina). Com o auxílio de uma alça de platina, em capela de fluxo laminar e bico de Bunsen, as colônias positivas foram transferidas para tubos devidamente identificados. Em seguida colocadas no agitador com rotação de 180xg a 37°C por 13 horas, em média.

Para cada amostra, quatro clones de *E. coli* DH5α contendo o fragmento de interesse foram estocados em alíquotas com 10% de glicerol (Sigma®). Após homogeneização, foram congelados em nitrogênio líquido (-196°C) e transferidos para o freezer – 70°C.

#### **4.11 Extração de DNA plasmidial**

O Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega®) foi utilizado na extração do DNA plasmidial. Realizou-se a extração de dois clones independentes para cada amostra, visando descartar possíveis erros.

Os tubos com culturas de *E. coli* DH5α transformadas foram centrifugados a 10.000xg por 5 minutos e o sobrenadante resultante foi descartado. Adicionou-se 250 µl de solução de ressuspensão celular e o precipitado foi dissolvido delicadamente até alcançar completa homogeneização da solução. Esse conteúdo foi transferido para tubo de polipropileno de 1,8 ml e acrescidos de 250 µl da solução de lise celular.

Inverteram-se os tubos, delicadamente, por quatro vezes e incubou-se até clarear a suspensão (por no máximo cinco minutos).

Cada tubo recebeu, em seguida, 10 µl de solução de Protease Alcalina, homogeneizando-se por quatro inversões suaves e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos. Após adição de 350 µl da solução de neutralização por tubo e nova inversão de quatro tempos, finalizou com centrifugação a 14.000xg durante 10 minutos à temperatura ambiente.

O sobrenadante com o DNA foi transferido para mini-colunas associadas a tubos coletores. Centrifugou-se por 1 minuto a 14000xg. Descartou-se o produto dos tubos coletores e lavaram-se as mini-colunas com 750 µl da solução de lavagem. Após nova centrifugação por mais um minuto, repetiu-se o último passo com 250 µl da solução de lavagem e mais 2 minutos de centrifugação.

Os DNAs foram ressuspensos em 50 µl de água livre de nuclease, em tubos novos e centrifugados por 1 minuto a 14000xg.

As amostras foram quantificadas por meio de espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose. As mesmas foram estocadas em caixas crioprotetoras a -20°C até o sequenciamento.

#### **4.12 Sequenciamento**

As amostras foram sequenciadas no sequenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) pelo método enzimático descrito por SANGER *et al.* (1977). Utilizando-se o *Dynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* e instruções do mesmo, como referência no preparo das amostras.

Para cada amostra de *R. (B.) microplus* dois clones de cada fragmento foram seqüenciados. Cada clone foi seqüenciado quatro vezes, foram feitas duas reações utilizando-se o *primer* M13 *forward* e duas com o M13 *reverse*. Considerando dois clones seqüenciados quatro vezes, para cada fragmento das vinte seis amostras, totalizaram-se quatrocentos e dezesseis sequenciamentos para análise.

As reações de sequenciamento foram realizadas em placas de 96 “wells”. Cada reação de sequenciamento foi constituída de 4µl de *sequencing reagent premix*; 1µl de primer (5 pmoles); de 0,2 a 2 µg de DNA, sendo o máximo de 5 µl; e água para completar o volume de 10µl. As reações de amplificação foram conduzidas pela amplificação linear por PCR, usando o termociclador Perkin Elmer 9600, programado com 4 minutos a 94°C; 25 ciclos de 94°C por 0,2 minuto, 50°C por 0,15 minuto e 60°C por 1 minuto; finalizando a 4º, *overnight*.

As reações foram precipitadas com isopropanol, cada reação foi acrescida de 20 µl de isopropanol 80%. Após bem misturadas, foram centrifugadas por 30 minutos a 2500xg. O sobrenadante foi removido, invertendo-se a placa e centrifugando a mesma por 1 minuto, 300xg. Lavou-se o *pellet* com 45µl de etanol 70% e centrifugou-se brevemente. O sobrenadante foi novamente removido e o *pellet* seco por 5 minutos a 20°C.

Para ressuspender os *pellets*, cada amostra recebeu 10µl de MegaBACE *Loading Solution* e foi completamente dissolvido quando vigorosamente agitado em *vortex*, por 10 a 20 segundos. Centrifugaram-se brevemente as amostras para coletá-las no fundo do tubo e retirar as bolhas. As amostras foram aquecidas a 96°C antes da injeção para a corrida no MegaBACE1000.

#### **4.13 Análise de dados**

As reações de sequenciamento foram estudadas e analisadas por programas computacionais. O programa Seqman do pacote DNASTAR (DNASTAR Inc.) foi utilizado para comparar os esferogramas com as seqüências nucleotídicas. O software BioEdit® versão 7. 0. 5. 3 (HALL, 1999) e o site JustBio ([www.justbio.com](http://www.justbio.com)) forneceram as ferramentas para realizar o alinhamento das seqüências 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 seqüências armazenadas no GenBank™.



A análise de polimorfismo nas seqüências 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*.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Polimorfismos no gene *bm86* e *bm95*

Esse trabalho estudou vinte e seis amostras de carrapatos *R. (B.) microplus* com uma representatividade satisfatória de distintas regiões brasileiras e ainda de alguns países sul-americanos para avaliação do polimorfismo nucleotídeo e peptídico da proteína intestinal Bm86 e da Bm95, que possuem dezessete aminoácidos diferentes entre si. Dessa forma, o estudo englobou amostras de diferentes populações submetidas naturalmente a forças seletivas distintas. A observação da origem geográfica é importante, pois se considera que grandes contrastes climáticos e demais diferenças geográficas influenciam fortemente na dinâmica de uma população de carrapato, variações genéticas podem ocorrer e serem selecionadas positivamente, originando variabilidade genética entre populações (BAXTER e BARKER, 1998; PASSOS *et al.* 1999, HERNANDEZ *et al.*, 2000; GARCÍA – GARCÍA *et al.*,1990 e 2000; DE LA FUENTE *et al.*,2000; SUTHERST e BOURNE, 2006).

Segundo GUERRERO *et al.* (2006), comparações genômicas oferecem a perspectiva de novas inferências em muitos aspectos da biologia de

carrapatos, como a maior ou menor sensibilidade frente a um fármaco ou a efetividade de vacinas em determinada população.

A variação de seqüências dentro do lócus Bm86 remete, entre outros fatores, para menor efetividade de vacinas recombinantes derivadas das proteínas Bm86 e Bm95 em populações distintas do *R. (B.) microplus*. (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 1999 e 2000). SOSSAI *et al.* (2005) avaliaram o polimorfismo no gene *bm86* de 30 populações geograficamente distintas, analisando um fragmento que incluía o epítipo 4824, integrante da vacina sintética SBm7462. O objetivo do presente trabalho constituiu em avaliar mais dois fragmentos que englobassem os epítipos 4823 e 4822, fechando a análise completa da SBm7462.

O trabalho analisou 52,2% de nucleotídeos da seqüência completa das proteínas Bm86 e Bm95, sendo deduzidos, respectivamente, 59,4% e 67,8% dos aminoácidos. Das vinte e seis populações estudadas, vinte são comuns ao trabalho de SOSSAI *et al.* (2005), que analisou um fragmento de 794 pares de bases, compreendidos entre os nucleotídeos 278 a 1071. Somadas essas análises, verifica-se que 80% da proteína Bm86 e 91,38% da Bm95 foram seqüenciados e avaliados quanto ao polimorfismo genético (figura 2).

```
MRGIALFVA AVSLIVEGTAESSICSDFGNEFCRNAECEVPGAED
DFVCKCPRDNMYFNAAEKQCEYKDTCKTRECSYGRCVESNPS
KASCVCEASDDLTLQCKIKNDYATDCRNRRGGTAKLRIDGFIGA
TCDCGEWGWAMNMTTRNCVPTTCLRPDLTCKDLCEKNLLQRDS
RCCQGWNTANCSAAPPADSYCSPGSPKGPDPGQCINACKTKEAG
FVCKHGCSTGKAYECTCPSGSTVAEDGITCKSISHTVSCTAEQ
KQTCRPTEDCRVHKGTVLCECPWNQHLVGDTCSIDCVDKKCH
EEFMDCGVYMNQSCYCPWKSRRKPGPNVNINECLLNEYYYTV
SFTPNISFSDHCKWYEDRVLEAIRTSIGKEVFKVEILNCTQDIK
ARLIAEKPLSKHVLRLKLQACEHPIGEWCMYPKLLIKKNSATE
IEEENLCSLLKDQEAAYKQNKCVKVDNLFWFQCADGYTTT
YEMTRGRLRRSVCKAGVSCNENEQSECADKGGQIFVYENGKAN
CQCPPDTKPGEIGCIERTTCNPKEIQECQDKKLECVYKNHKAECPCDDHEC
YREPAKDCSSEEDNGKCQSSGQRCVIENKAVCKEKEATTAATTTTAKDKD
PDPGSSAAAVSATGLLLLLAATSVTAASL
```

(a)

```
MRGIALFVA AVSLIVEGTAESSICSDFGNEFCRNAECEVPGAED
DFVCKCPRDNMYFNAAEKQCEYKDTCKTRECSYGRCVESNPS
KGSCVCERSDDLTLQCKIKNDYATDCRNRRGGTAKLRIDGFIGA
TCDCGEWGWAMNKTTRNCVPTTCLRPDLTCKDLCEKNLLQRDS
RCCQGWNTANCSAAPPADSYCSPGSPKGPDPGQCKNACRTKEA
GFVCKHGCSTDKAYECTCPSGSTVAEDGITCKSISYTVSCTVE
QKQTCRPTEDCRVQKGTVLCECPWNQHLVGDTCSIDCVDKKCH
HEEFMDCGVYMNQSCYCPWKSRRKPGPNVNINERLLNEYYYT
VSFTPNISFSDHCKRYEDRVLGAIRTSIGKEVFKVEILNCTQDI
KARLIAEKPLSKYVLRKLQACEHPIGEWCMYPKLLIKKNSAT
EIEEENLCSLLKNQEAAYKQNKCVKVDNLFWFQCADGYTT
TYEMTRGRLRRSVCKAGVSCNENEQLECANCKGQICVYENGKA
NCQCPPDTKPGEIGCIERTTCNPKEIQECQDKKLECVYKNHKAECKPCDDHE
CSR
```

(b)

**Figura 2.** Segmento das proteínas Bm86 (a) e Bm95 (b) que já foram avaliadas quanto ao polimorfismo genético, destacado em negrito.

Duzentos e oito clones foram estocados no freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ , sendo oito de cada população, quatro correspondendo ao fragmento A e quatro ao C. Desse total, cinquenta e dois clones do fragmento A foram seqüenciados duas vezes e analisados e o mesmo valor numérico para o fragmento C, isto é, quatro clones para cada amostra, dois representando cada fragmento. Totalizou-se 34 seqüências diferentes de nucleotídeos e 32 de aminoácidos do fragmento A e 31 seqüências de nucleotídeos que codificaram 29 seqüências de aminoácidos do fragmento C.

As variações de nucleotídeos para o fragmento A apresentaram valores mínimos de 1,0% quando comparadas às proteínas Bm86 e Bm95 e valores máximos de 5,75% e 6,0% para as mesmas proteínas, nessa ordem. As variações de aminoácidos situaram-se entre 1,5% e 4,51% com relação a Bm86 e de 2,26% a 6% para a Bm95 (Tabela 4).

Em relação ao fragmento C, as menores variações de nucleotídeos foram da ordem de 1,31% e 0,39% e as maiores de 1,97% e 0,79% para as proteínas Bm86 e Bm95, respectivamente. As variações de aminoácidos para a Bm86 foram de 2,77% a 3,16% e para a Bm95 de 0,79% a 1,98% (Tabela 5).

	40	50	60	70	80	90	100	110	120	
Bm86	39	GGCATCGTTTGTTCGTCGCGCTGTTCACTGATTGTAGAGGGCACAGCAGAAATCATCCATTTCCTGACTTCGGGAACGAGTTCTGT	128							
Bm95	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Cara	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
PDV	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
BoaE	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Bugre1	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Bugre2	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
UFV	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Mucuri	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Betim	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
MClaros	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Aracaju1	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Aracaju2	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Queren	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Coeste	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Itaqui	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Jaboti	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Guara1	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Guara2	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
SCarlos1	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
SCarlos2	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Alegre1	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Alegre2	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Vnova	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
SSalto	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Tucuru1	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Tucuru2	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Slivra	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
PSul	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Auto	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Mozol	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Mozo2	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
LaPaz	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
SJose1	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
SJose2	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							
Goiania	39	G I A L F V A A V S L I V E G T A E S S I C S D F G N E F C	128							

Continua...

	130	140	150	160	170	180	190	200	210	
Bm86	129	CGCAACGCTGAATGTGAAGTGGTGCCTGGTGCAGAGGATGATTTCGTGTGCAAATGTCGCGAGATAATATGTACTTCAATGCTGCTGAA								218
Bm95	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Cara	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
PDV	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
BoaE	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Bugrel	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Bugre2	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
UFV	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Mucuri	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Betim	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
MClaros	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Aracaju1	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Aracaju2	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Queren	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Coeste	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Itaqui	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Jaboti	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Guara1	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Guara2	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
SCarlos1	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
SCarlos2	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Alegre1	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Alegre2	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Vnova	129	R N A K C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
SSalto	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Tucuru1	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Tucuru2	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
slivra	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
PSul	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Auto	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Mozo1	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Mozo2	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
LaPaz	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
SJose1	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
SJose2	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218
Goiania	129	R N A E C E V V P G A E D D F V C K C P R D N M Y F N A A E								218

Continua...

	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
Bm86	219	AAGCAATGCCGAATATAAAGACACGTGCAAGACAAGGGAGTGCAGCTATGGACGTTGCGTTGAAAGTAACCCGAGCAAGGCTAGCTGCGTC								308
Bm95	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K A S C V								308
Cara	219	.....T.....G.....								308
PDV	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K G S C V								308
BoaE	219	.....T.....G.....								308
Bugre1	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K G S C V								308
Bugre2	219	.....T.....G.....								308
UFV	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K G S C V								308
Mucuri	219	.....T.....G.....								308
Betim	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K G S C V								308
MClaros	219	.....T.....G.....								308
Aracaju1	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K G S C V								308
Aracaju2	219	.....T.....G.....								308
Queren	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K G S C V								308
Coeste	219	.....T.....G.....								308
Itaqui	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K A S C V								308
Jaboti	219	.....T.....G.....								308
Guara1	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K G S C V								308
Guara2	219	.....T.....G.....								308
SCarlos1	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K G S C V								308
SCarlos2	219	.....T.....G.....								308
Alegre1	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K G S C V								308
Alegre2	219	.....T.....G.....								308
Vnova	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K G S C V								308
SSalto	219	.....T.....G.....								308
Tucuru1	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K A S C V								308
Tucuru2	219	.....A.....T.....A.....C.....C.....T.....								308
Slivra	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V Q S N P S K A S C V								308
PSul	219	.....T.....G.....								308
Auto	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K G S C V								308
Mozol	219	.....T.....G.....								308
Mozo2	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K G S C V								308
LaPaz	219	.....T.....G.....								308
SJose1	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V E S N P S K G S C V								308
SJose2	219	.....A.....T.....A.....C.....C.....T.....								308
Goiania	219	K Q C E Y K D T C K T R E C S Y G R C V Q S N P S K A S C V								308

Continua...

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	
Bm86	309	TCGGAAGCATCGGACGATCTAACGCTACAATGCAAAATAAAAATGACTACGCAACTGACTGCCGAAATCGAGGTGGCACTGCTAAGTTG								398
Bm95	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D Y A T D C R N R G G T A K L								398
Cara	309	C E R S D D L T L Q C K I K N D Y A T D C R N R G G T A K L								398
PDV	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
BoaE	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Bugre1	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Bugre2	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
UFV	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Mucuri	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Betim	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
MClaros	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Aracaju1	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Aracaju2	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Queren	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Coeste	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Itaqui	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Jaboti	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Guara1	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Guara2	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
SCarlos1	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
SCarlos2	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Alegre1	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Alegre2	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Vnova	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
SSalto	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Tucuru1	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Tucuru2	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Slivra	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
PSul	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Auto	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Mozol	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Mozol2	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
LaPaz	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
SJose1	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
SJose2	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398
Goiania	309	C E A S D D L T L Q C K I K N D F A T D C R N R G G T A K L								398



Continua...

	400	410	420	430	
<b>Bm86</b>	399	CGCACGGATGGGTTTATTGGCGCAACGTGTGACTGTGGTG	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Bm95</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Cara</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>PDV</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>BoaE</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Bugre1</b>	399	.....A.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Bugre2</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>UFV</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Mucuri</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Betim</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>MClaros</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Aracaju1</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Aracaju2</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Queren</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Coeste</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Itaqui</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Jaboti</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Guara1</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Guara2</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>SCarlos1</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>SCarlos2</b>	399	.....A.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Alegre1</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Alegre2</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Vnova</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>SSalto</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Tucuru1</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Tucuru2</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Slivra</b>	399	..T.....G.....A.....	438		
		R T D G V I G A T C D C G			
<b>PSul</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Auto</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Mozo1</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Mozo2</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>LaPaz</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>SJose1</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>SJose2</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			
<b>Goiania</b>	399	.....	438		
		R T D G F I G A T C D C G			

Continua...

**Figura 3.** Alinhamento das seqüências parciais, gerado pelo software BioEdit® versão 7.0.5.3, dos genes *bm86* e *bm95* compreendidos do nucleotídeo 39 ao 438, denominado fragmento A, e das seqüências protéicas codificadas dos aminoácidos 3 ao 135 de diferentes populações de *R. (B.) microplus* 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. Os retângulos indicam a seqüência correspondente ao peptídeo 4823 da vacina sintética SBm7462.

**Tabela 4** – Polimorfismos no gene *bm86* e proteína Bm86 de *R. (B.) microplus*. Fragmento A (nucleotídeo 39 ao 438).

	Diferenças na Seqüência Padrão Bm86		Diferenças na Seqüência Padrão Bm95	
	Mutação nucleotídeos/Total (%)	Mutação aminoácidos/Total (%)	Mutação nucleotídeos/Total (%)	Mutação aminoácidos/Total (%)
Betim	6/400 (1,50)	4/133 (3,0)	5/400 (1,25)	4/133 (3,0)
Boa Esperança	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)	4/400 (1,00)	3/133 (2,26)
Bugre (1)	6/400 (1,50)	3/133 (2,26)	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)
Bugre (2)	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)	4/400 (1,00)	3/133 (2,26)
Montes Claros	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)	4/400 (1,00)	3/133 (2,26)
Viçosa	10/400 (2,50)	3/133 (2,26)	11/400 (2,75)	5/133 (3,76)
Alegre (1)	9/400 (2,25)	3/133 (2,26)	10/400 (2,50)	5/133 (3,76)
Alegre (2)	6/400 (1,50)	4/133 (3,0)	5/400 (1,25)	4/133 (3,0)
Venda Nova I.	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)	4/400 (1,00)	3/133 (2,26)
Paraíba do Sul	7/400 (1,75)	4/133 (3,0)	6/400 (1,50)	4/133 (3,0)
São Sebast. do Auto	7/400 (1,75)	3/133 (2,26)	8/400 (2,00)	5/133 (3,76)
Guararema (1)	6/400 (1,50)	3/133 (2,26)	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)
Guararema (2)	6/400 (1,50)	4/133 (3,0)	5/400 (1,25)	4/133 (3,0)
Jaboticabal	6/400 (1,50)	4/133 (3,0)	5/400 (1,25)	4/133 (3,0)
São Carlos (1)	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)	4/400 (1,00)	3/133 (2,26)
São Carlos (2)	6/400 (1,50)	3/133 (2,26)	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)
Goiânia	6/400 (1,50)	3/133 (2,26)	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)
Querência	8/400 (2,00)	2/133 (1,50)	11/400 (2,75)	4/133 (3,0)
Colorado	10/400 (2,50)	3/133 (2,26)	11/400 (2,75)	5/133 (3,76)
Itaqui	4/400 (1,00)	3/133 (2,26)	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)
S. Livramento	13/400 (3,25)	5/133 (3,76)	12/400 (3,00)	5/133 (3,76)
Mucuri	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)	4/400 (1,00)	3/133 (2,26)
Aracaju (1)	6/400 (1,50)	4/133 (3,0)	5/400 (1,25)	4/133 (3,0)
Aracaju (2)	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)	4/400 (1,00)	3/133 (2,26)
Auto do Rodrigues	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)	4/400 (1,00)	3/133 (2,26)
Tucuruí (1)	6/400 (1,50)	4/133 (3,0)	5/400 (1,25)	4/133 (3,0)
Tucuruí (2)	23/400 (5,75)	6/133 (4,51)	24/400 (6,00)	8/133 (6,00)
La Paz	5/400 (1,25)	3/133 (2,26)	4/400 (1,00)	3/133 (2,26)
San José (1)	7/400 (1,75)	3/133 (2,26)	8/400 (2,00)	5/133 (3,76)
San José (2)	20/400 (5,00)	6/133 (4,51)	21/400 (5,25)	8/133 (6,00)
Mozo (1)	6/400 (1,50)	4/133 (3,0)	5/400 (1,25)	4/133 (3,0)
Mozo (2)	6/400 (1,50)	4/133 (3,0)	5/400 (1,25)	4/133 (3,0)
Mar D. C.	5/400 (1,25)	3/133 (2,25)	4/400 (1,0)	3/133 (2,25)
Palma D. V.	5/400 (1,25)	3/133 (2,25)	4/400 (1,0)	3/133 (2,25)

	840	850	860	870	880	890	900	910	920	
Bm86	839	TCGTGTGCACAAAGGA	ACTGTTGTGAGTGC	CCCCGTGGAATCA	ACATCTAGTGGGGG	CACGTGCATAAGT	GATTGCGTCGACA	AGAA		928
Bm95	839	.....G.....								928
Cara1	839	.....G.....								928
Cara2	839	.....G.....								928
PDV1	839	.....G.....								928
PDV2	839	.....G.....								928
BoaE	839	.....G.....								928
Bugre	839	.....G.....								928
UFV	839	.....G.....								928
Betim	839	.....G.....								928
MClaros	839	.....G.....								928
Aracaju	839	.....G.....								928
Mucuri1	839	.....G.....								928
Mucuri2	839	.....G.....C.....								928
Queren	839	.....G.....								928
Itaquil	839	.....G.....								928
Itaquil2	839	.....G.....								928
Slivra	839	.....G.....								928
Coeste	839	.....G.....C.....								928
Jaboti	839	.....G.....								928
SCarlos1	839	.....G.....								928
SCarlos2	839	.....G.....								928
Guara	839	.....G.....								928
Alegre	839	.....G.....							.....G.....	928
Vnova	839	.....G.....								928
SSalto	839	.....G.....								928
Tucurui	839	.....G.....								928
PSul	839	.....G.....								928
Auto	839	.....G.....								928
LaPaz	839	.....G.....								928
SJose	839	.....G.....								928
Mozo	839	.....G.....								928
Goiania	839	.....G.....								928

Continua...

	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	
<b>Bm86</b>	929	ATGCCACGAAGATTATGGACTGTGGCGTATATATGAATCGACAAAGCTGCTATTGTCATGGAAATCAAGGAAGCCGGGCCCAATGT	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Bm95</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Cara1</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Cara2</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>PDV1</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>PDV2</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>BoaE</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Bugre</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>UFV</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Betim</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>MClaros</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Aracaju</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Mucuri1</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Mucuri2</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Queren</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Itaquil</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Itaquil2</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Slivra</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Coeste</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Jaboti</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>SCarlos1</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>SCarlos2</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Guara</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Alegre</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Vnova</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>SSalto</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Tucurui</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>PSul</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Auto</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>LaPaz</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>SJose</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Mozo</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								
<b>Goiania</b>	929	...T.....	1018							
		C H E E F M D C G V Y M N R Q S C Y C P W K S R K P G P N V								

Continua...

	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	
Bm86	1019	CAACATCAATGAATGCCTACTGAATGAGTATTACTACACGGTGTTCATTCACCCCAAACATATCTTTTGATTCTGACCATTGCAAATGGTA								1108
Bm95	1019	.....C.....				.....G.....				1108
Cara1	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Cara2	1019	.....G.....							.....C.....	1108
PDV1	1019	.....G.....							.....C.....	1108
PDV2	1019	.....G.....							.....C.....	1108
BoaE	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Bugre	1019	.....G.....							.....C.....	1108
UFV	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Betim	1019	.....G.....							.....C.....	1108
MClaros	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Aracaju	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Mucuri1	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Mucuri2	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Queren	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Itaquil	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Itaquil2	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Slivra	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Coeste	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Jaboti	1019	.....G.....							.....C.....	1108
SCarlos1	1019	.....G.....							.....C.....	1108
SCarlos2	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Guara	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Alegre	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Vnova	1019	.....G.....							.....C.....	1108
SSalto	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Tucurui	1019	.....G.....							.....C.....	1108
PSul	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Auto	1019	.....G.....							.....C.....	1108
LaPaz	1019	.....G.....							.....C.....	1108
SJose	1019	.....G.....							.....C.....	1108
Mozo	1019	.....C.....				.....G.....				1108
Goiania	1019	.....G.....							.....C.....	1108



Continua...

	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	
Bm86	1199	AAGACTCATAGCAGAGAAACCACTGTCAAACACGTCAGGAACTACAAGCATGCGAGCATCCAATCGGCGAATGGTCATGATGTA	1288							
Bm95	1199	R L I A E K P L S K H V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Cara1	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Cara2	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
PDV1	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
PDV2	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
BoaE	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Bugre	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
UFV	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Betim	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
MClaros	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Aracaju	1199	R L I A E K P L S N H V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Mucuri1	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Mucuri2	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Queren	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Itaqui1	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Itaqui2	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Slivra	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Coeste	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Jaboti	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
SCarlos1	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
SCarlos2	1199	R L I A E K P L S K Y A L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Guara	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Alegre	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Vnova	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
SSalto	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Tucurui	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
PSul	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Auto	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
LaPaz	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
SJose	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Mozo	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							
Goiania	1199	R L I A E K P L S K Y V L R K L Q A C E H P I G E W C M M Y	1288							

Continua...

	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	
	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
<b>Bm86</b>	1289	TCCGAAGTTGCTGATCAAGAAAACTCTGCAACAGAAATCGAAGAAGAACCTTTGCGACAGTCTGCTCAAGGATCAGGAAGCTGCCTA	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K D Q E A A Y								
<b>Bm95</b>	1289	.....G.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Cara1</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Cara2</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>PDV1</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>PDV2</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>BoaE</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Bugre</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>UFV</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Betim</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>MClaros</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Aracaju</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Mucuri1</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Mucuri2</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Queren</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Itaquil</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Itaquil2</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Slivra</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Coeste</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Jaboti</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>SCarlos1</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>SCarlos2</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Guara</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Alegre</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Vnova</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>SSalto</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Tucurui</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>PSul</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Auto</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>LaPaz</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>SJose</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Mozo</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								
<b>Goiania</b>	1289	.....T.....A.....	1378							
		P K L L I K K N S A T E I E E E N L C D S L L K N Q E A A Y								



Continua...

	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440	1450	1460			
Bm86	1379	CAAAGGTCAA	AAACAATGCG	TCAAGGTCG	ACACCTCTT	CTGGTTCCAG	TCCAGTGC	GCTGATGG	TACACAACA	ACTTACGAG	ATGACACGAGG	1468
Bm95	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Cara1	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Cara2	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
PDV1	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
PDV2	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
BoaE	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Bugre	1379	..G.....										1468
UFV	1379	R G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Betim	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
MClaros	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Aracaju	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Mucuri1	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Mucuri2	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Queren	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Itaquil	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Itaquil2	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Slivra	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Coeste	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Jaboti	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
SCarlos1	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
SCarlos2	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Guara	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Alegre	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Vnova	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
SSalto	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Tucurui	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
PSul	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Auto	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
LaPaz	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
SJose	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Mozo	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468
Goiania	1379	K G Q N K C V K V D N L F W F Q C A D G Y T T T Y E M T R G										1468

Continua...

	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	
Bm86	1469	TCGCCTACGCCGCTCCGTGTAAAGCTGGAGTTTCTTGCAACGAAAACGAGCAGTCGGAGTGTGCTGACAAAGGGCAAATATTGTTTA								1558
Bm95	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q S E C A D K G Q I F V Y								1558
Cara1	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Cara2	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I I V Y								1558
PDV1	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
PDV2	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
BoaE	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Bugre	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
UFV	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Betim	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
MClaros	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Aracaju	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Mucuri1	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Mucuri2	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Queren	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Itaquil	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Itaquil2	1469	R L R R S V C K A G V S Y N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Slivra	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Coeste	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Jaboti	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
SCarlos1	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
SCarlos2	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Guara	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Alegre	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Vnova	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
SSalto	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Tucuruí	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
PSul	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Auto	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
LaPaz	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
SJose	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Mozo	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558
Goiania	1469	R L R R S V C K A G V S C N E N E Q L E C A N K G Q I C V Y								1558

Continua...

	1560	1570	1580	1590	1600	
<b>Bm86</b>	1559	CGAAAA	CGGCAA	AGCGAAT	TGCCAATGCCACCAGACTAA	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Bm95</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Cara1</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Cara2</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>PDV1</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>PDV2</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>BoaE</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Bugre</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>UFV</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Betim</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>MClaros</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Aracaju</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Mucuri1</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Mucuri2</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Queren</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Itaquil</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Itaquil2</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Slivra</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Coeste</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Jaboti</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>SCarlos1</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>SCarlos2</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Guara</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Alegre</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Vnova</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>SSalto</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Tucurui</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>PSul</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Auto</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>LaPaz</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>SJose</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Mozo</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				
<b>Goiania</b>	1559	.....	.....	.....	.....	1600
		E N G K A N C Q C P P D T				

Continua...

**Figura 4.** Alinhamento das seqüências parciais, gerado pelo software BioEdit® versão 7.0.5.3, dos genes *bm86* e *bm95* compreendidos do nucleotídeo 839 ao 1600, denominado fragmento C, e das seqüências protéicas codificadas dos aminoácidos 270 ao 522 de diferentes populações de *R. (B.) microplus* 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 seqüência correspondente ao peptídeo 4822 da vacina sintética SBm7462.

**Tabela 5 -** Polimorfismos no gene *bm86* e proteína Bm86 de *R. (B.) microplus*. Fragmento C (nucleotídeo 839 ao 1600).

	Diferenças na Seqüência Padrão Bm86		Diferenças na Seqüência Padrão Bm95	
	Mutação nucleotídeos/Total (%)	Mutação aminoácidos/Total (%)	Mutação nucleotídeos/Total (%)	Mutação aminoácidos/Total (%)
	Betim	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)
Boa Esperança	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
Bugre	13/762 (1,71)	8/253 (3,16)	4/762 (0,52)	3/253 (1,19)
Montes Claros	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
Viçosa	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
Alegre	13/762 (1,71)	8/253 (3,16)	4/762 (0,52)	3/253 (1,19)
Venda Nova I.	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
Paraíba do Sul	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
São Sebast. do Auto	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
Guararema	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
Jaboticabal	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
São Carlos (1)	13/762 (1,71)	7/253 (2,77)	4/762 (0,52)	2/253 (0,79)
São Carlos (2)	13/762 (1,71)	8/253 (3,16)	4/762 (0,52)	3/253 (1,19)
Goiânia	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
Querência	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
Colorado	15/762 (1,97)	7/253 (2,77)	6/762 (0,79)	2/253 (0,79)
Itaqui (1)	13/762 (1,71)	8/253 (3,16)	4/762 (0,52)	3/253 (1,19)
Itaqui (2)	13/762 (1,71)	8/253 (3,16)	4/762 (0,52)	3/253 (1,19)
S. Livramento	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
Mucuri (1)	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
Mucuri (2)	15/762 (1,97)	7/253 (2,77)	6/762 (0,79)	2/253 (0,79)
Aracaju	13/762 (1,71)	8/253 (3,16)	6/762 (0,79)	5/253 (1,98)
Auto do Rodrigues	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
Tucuruí	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
La Paz	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
San José	12/762 (1,57)	8/253 (3,16)	5/762 (0,67)	3/253 (1,19)
Mozo	13/762 (1,71)	8/253 (3,16)	4/762 (0,52)	3/253 (1,19)
Mar D. C. (1)	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	5/762 (0,67)	2/253 (0,79)
Mar D. C. (2)	12/762 (1,57)	8/253 (3,16)	5/762 (0,67)	3/253 (1,19)
Palma D. V. (1)	12/762 (1,57)	7/253 (2,77)	3/762 (0,39)	2/253 (0,79)
Palma D. V. (2)	10/762 (1,31)	7/253 (2,77)	5/762 (0,67)	2/253 (0,79)

A maioria das populações foram homozigóticas para o alelo *bm86* e *bm95*, as heterozigóticas, com alelos divergentes entre si, são apresentadas nas tabelas 6 e 7, representadas nas figuras 3 e 4. Nas populações heterozigóticas, para diferenciação, cada alelo foi identificado com o nome da amostra adicionada dos números 1 e 2. Observações semelhantes já foram feitas em trabalhos com *R. (B.) microplus* por: GARCÍA-GARCÍA *et al.* (2000),

que identificaram dois alelos no gene *bm86* na população argentina, denominada cepa A, diferindo em quatro nucleotídeos; COSSÍO-BAYÚGAR *et al.* (2005) estudando a enzima PHGPx (*Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase*) encontraram um aminoácido de diferença entre os dois alelos; e SOSSAI *et al.* (2005) que identificaram seis populações (Alegre, Betim, Montes Claros, Mar dos Caraíbas, San José e Bugre) heterozigóticas, com variação mínima de um e máxima de vinte e seis nucleotídeos entre os alelos, também do gene *bm86*.

Entre as populações que apresentaram mais de um alelo identificado, observaram-se maiores divergências no fragmento C, destacando-se as amostras Tucuruí (2), San José (2) e Alegre (1). As diferenças de aminoácidos entre alelos dessas amostras foram de 6,01%, 2,26% e 3,76%, respectivamente. Esse último resultado concorda com os de SOSSAI *et al.* (2005), que também observaram uma diferença significativa entre os alelos da população Alegre.

**Tabela 6** – Diferenças entre alelos da mesma população compreendidas no fragmento A.

<b>Amostra</b>	<b>Nucleotídeos</b>	<b>(%)</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>(%)</b>
Bugre	1/400	0,25	0/133	0
Alegre	9/400	2,25	5/133	3,76
Guararema	2/400	0,50	1/133	0,75
São Carlos	1/400	0,25	0/133	0
Aracaju	1/400	0,25	1/133	0,75
Tucuruí	23/400	5,75	8/133	6,01
San José	13/400	3,25	3/133	2,26
Mozo	2/400	0,50	2/133	1,50

**Tabela 7** – Diferenças entre alelos da mesma população compreendidas no fragmento C.

<b>Amostra</b>	<b>Nucleotídeos</b>	<b>(%)</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>(%)</b>
São Carlos	2/762	0,26	1/253	0,40
Itaqui	2/762	0,26	2/253	0,79
Mucuri	3/762	0,39	0/253	0
Mar D. C.	4/762	0,52	2/253	0,79
Palma D. V.	2/762	0,26	0/253	0

Mutação, segundo BORÉM e VIEIRA (2005), significa uma mudança na seqüência de bases de DNA por substituição, deleção ou inserção de

nucleotídeos, remetendo para a variabilidade nas populações. Em todas as populações analisadas nesse estudo, observaram-se apenas mutações por substituições. Sendo que em muitos casos, a mudança de nucleotídeos não resultou em mudança de aminoácido (mutações silenciosas). Apenas a população Aracaju apresentou um *gap* no aminoácido 373 (posição 1149 no gene), pois o códon AAA tornou-se TAA que representa um códon de terminação (figura 4). O mesmo se observa em relação à proteína Bm95 que possui os mesmos 2225 nucleotídeos da Bm86, mas a primeira possui seu primeiro códon de terminação na posição 1740 de sua seqüência, o que corresponderia ao aminoácido 570 (GenBank™ número de acesso AF150891), enquanto a Bm86 só possui seu códon de terminação na posição 2225 (GenBank™ número de acesso M29321).

As variações médias das populações estudadas foram maiores em relação à proteína Bm86 quando comparada a Bm95. Resultados que concordam com SOSSAI *et al.* (2005). As médias de variação de nucleotídeos, somando-se às médias dos fragmentos A e C, foram de 3,42% com o padrão Bm86 e 1,74% com o padrão Bm95. Em relação à taxa de variação de aminoácidos os valores foram de 5,49% comparando-se as populações com a Bm86 e 3,89% com a Bm95. Esses resultados reforçam a dedução de menor compatibilidade genética entre a cepa australiana de *R. (B.) microplus* com as populações de outros continentes (DE LA FUENTE *et al.*, 2000; SOSSAI *et al.*, 2005). Estes valores justificam os maus resultados em diversas localidades no controle de *R. (B.) microplus* utilizando vacinas recombinantes produzidas a partir de uma cepa isolada de carrapato (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 1999).

## **5.2. Polimorfismos nos Peptídeo 4823 e 4824**

A vacina SBm7462 é constituída por três epítomos imunogênicos, os peptídeos 4822, 4824 e 4823, dispostos nessa ordem na vacina. Diversos trabalhos já avaliaram a eficiência da vacina, no que remete para estudos da resposta imune humoral e celular (PATARROYO *et al.*, 2002; GONZÁLEZ-LOMBANA, 2003). E no que se refere à análise de polimorfismo genético entre populações de carrapato, que podem interferir na eficiência vacinal, apenas o

peptídeo 4824 foi avaliado em um número considerável de populações (SOSSAI *et al.*, 2005).

A seqüência do peptídeo 4823, compreendida entre os nucleotídeos 92 e 137, está inserida no fragmento A (Figura 3). E a seqüência do peptídeo 4822, entre os nucleotídeos 1220 e 1262, está inserida no fragmento C (Figura 4). Portanto, é possível por meio desse trabalho fechar a análise completa da vacina sintética SBm7462 no que remete ao polimorfismo genético entre populações distintas (tabela 8).

**Tabela 8** – Taxa de variação de aminoácidos dos peptídeos 4823 e 4822, utilizando-se as seqüências das proteínas Bm86 e Bm95 como referência.

Amostras	4822 variações		4823 variações	
	a.a.		a.a.	
	Padrão Bm86	Padrão Bm95	Padrão Bm86	Padrão Bm95
Betim	1	0	1	1
Boa Esperança	1	0	0	0
Bugre	1	0	0	0
Montes Claros	1	0	0	0
Viçosa	1	0	0	0
Alegre	1	0	0	0
Venda Nova I.	1	0	0	0
Paraíba do Sul	1	0	0	0
Valão do Barro	1	0	0	0
Guararema	1	0	0	0
Jaboticabal	1	0	0	0
São Carlos	1	1*	0	0
Goiânia	1	0	0	0
Querência	1	0	0	0
Colorado	1	0	0	0
Itaqui	1	0	0	0
S. Livramento	1	0	0	0
Mucuri	1	0	0	0
Aracaju	1	2	0	0
Auto do Rodri.	1	0	0	0
Tucuruí	1	0	0	0
La Paz	1	0	0	0
San José	1	0	0	0
Mozo	1	0	1*	1*
Mar D. C.	1	0	0	0
Palma D. V.	1	0	0	0

\* Amostra São Carlos (2) e Mozo (2)

Na figura 4, observa-se que em relação ao peptídeo 4822, a amostra São Carlos (2) teve uma valina (V) substituída por uma alanina (A) em relação aos padrões Bm86 e Bm95, na posição 401 de aminoácido ou 1234 do gene. Ambos os aminoácidos possuem as mesmas características hidrofóbicas. A amostra São Carlos (1) não apresentou mutações. Já a amostra Aracaju teve uma lisina (K) substituída, na posição 399 ou 1228, por uma asparagina (N) em

relação aos padrões Bm86 e Bm95. Esses aminoácidos mudados apresentam radicais polares, embora a lisina possua carga positiva e a asparagina não possua carga. E, enquanto todas as amostras mostraram um padrão homólogo a Bm95 na posição 400 de aminoácido e 1231 do gene, a população Aracaju foi semelhante a Bm86, mantendo uma histidina (H) (tabela 9).

As amostras Betim e Mozo (2), na porção do peptídeo 4823, apresentaram diferença na seqüência de aminoácidos simultaneamente para os padrões Bm86 e Bm95 (figura 3). Mas salienta-se que foi mudança de apenas um aminoácido. No caso da amostra Betim, uma fenilalanina (F) foi substituída por uma leucina (L) com localização 27 de aminoácido e 111 no gene. Novamente, os dois aminoácidos possuem radical apolar, apresentando características de hidrofobicidade. E uma treonina (T), que possui radical polar, substituiu uma isoleucina (I), com radical apolar, em um dos clones da população de Mozo, no aminoácido 23 (posição 99 no gene). A amostra Mozo (1) mostrou-se conservada (tabela 10).

As demais amostras, comparando-se com o padrão Bm86, tiveram apenas uma histidina (H) substituída por uma tirosina (Y), na posição 400 de aminoácido e 1231 do gene, correspondendo ao peptídeo 4822 (figura 4). A histidina possui radical polar carregado positivamente e a tirosina grupo radical polar com fenol, sem carga. Esse resultado concorda com os de SOSSAI (2004).



**Tabela 9** - Polimorfismos do gene *bm86* e proteína Bm86 de *R. (B.) microplus*, na seqüência 4822. Comparando-se com as seqüências Bm86 (GenBank™ número de acesso AF150891) e Bm95 (GenBank™ número de acesso AF150891).

	Diferenças na Seqüência		Diferenças na Seqüência	
	Padrão Bm86		Padrão Bm95	
	Mutação nucleotídeos/Total (%)	Mutação aminoácidos/Total (%)	Mutação nucleotídeos/Total (%)	Mutação aminoácidos/Total (%)
Betim	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Bugre	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
MClaros	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
BoaE	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
UFV	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Alegre	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Vnoval.	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Psul	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
SSalto	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Guara	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Jaboti	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Scarlos (1)	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Scarlos (2)	2/129 (1,55)	1/43 (2,32)	1/129 (0,78)	0/43 (0,0)
Goiania	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Coeste	2/129 (1,55)	1/43 (2,32)	1/129 (0,78)	0/43 (0,0)
Aracaju	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	2/129 (1,55)	2/43 (4,65)
Mucuri	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Queren	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Auto	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Itaqui (1)	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Itaqui (2)	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Slivra	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Tucurui	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
LaPaz	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
SJose	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Mozo	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Cara (1)	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Cara (2)	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
PDV (1)	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
PDV (2)	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)

**Tabela 10** - Polimorfismos do gene *bm86* e proteína Bm86 de *R. (B.) microplus*, na seqüência 4823. Comparando-se com as seqüências Bm86 (GenBank™ número de acesso AF150891) e Bm95 (GenBank™ número de acesso AF150891).

	Diferenças na Seqüência			
	Padrão Bm86		Padrão Bm95	
	Mutação nucleotídeos/Total (%)	Mutação aminoácidos/Total (%)	Mutação nucleotídeos/Total (%)	Mutação aminoácidos/Total (%)
Betim	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)
BoaE	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Bugre (1)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Bugre (2)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
MClaros	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
UFV	1/129 (0,78)	0/43 (0,0)	1/129 (0,78)	0/43 (0,0)
Alegre (1)	1/129 (0,78)	0/43 (0,0)	1/129 (0,78)	0/43 (0,0)
Alegre (2)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
VnovaI.	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Psul (1)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Psul (2)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
SSalto	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Guara (1)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Guara (2)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Querência	1/129 (0,78)	0/43 (0,0)	1/129 (0,78)	0/43 (0,0)
Mucuri	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Jaboti	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Scarlos (1)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Scarlos (2)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Coeste	1/129 (0,78)	0/43 (0,0)	1/129 (0,78)	0/43 (0,0)
Goiania	1/129 (0,78)	0/43 (0,0)	1/129 (0,78)	0/43 (0,0)
Itaqui	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Slivra	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Tucurui (1)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Tucurui (2)	2/129 (1,55)	0/43 (0,0)	2/129 (1,55)	0/43 (0,0)
Auto	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Aracaju (1)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Aracaju (2)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
LaPaz	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
SJose (1)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
SJose (2)	2/129 (1,55)	0/43 (0,0)	2/129 (1,55)	0/43 (0,0)
Mozo (1)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
Mozo (2)	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)	1/129 (0,78)	1/43 (2,32)
Cara	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)
PDV	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)	0/129 (0,0)	0/43 (0,0)

Mesmo somados aos resultados de SOSSAI *et al.* (2005), a taxa de variação total de aminoácidos correspondentes à vacina SBm7462 não ultrapassou a três aminoácidos em nenhuma das populações analisadas quando comparadas à seqüência Bm86, e não ultrapassou a variação de dois aminoácidos quando o padrão foi a proteína Bm95. A grande maioria das populações apresentou um e zero aminoácido de variação no padrão Bm 86 e Bm95, respectivamente. De modo geral, as seqüências de aminoácidos do peptídeo mostraram-se conservadas entre essas populações. Estas porções conservadas evolutivamente, normalmente, exercem importantes funções biológicas. A identificação de seqüências consenso, observadas em estudos de variabilidade genética entre populações distintas geograficamente ou em condições ambientais distintas, infere maior chance de proteção da vacina contra outras amostras e até espécies diferentes (DE LA FUENTE e KOCAN, 2003). Além do mais, nem sempre uma mudança de aminoácido corresponde a uma mudança efetiva de epitopo.

Outra informação relevante é a de que a amostra UFV (de Viçosa), que apresenta o mesmo padrão de variação dos epítomos imunogênicos da maioria das populações, já foi testada *in vivo* no *R. (B.) microplus* vacinado com a SBm7462 e apresentou eficiência vacinal de 81,05% (PATARROYO *et al.*, 2002).

Mudanças morfológicas, fisiológicas e/ou moleculares podem implicar em diferentes graus de susceptibilidade de cepas de carrapato frente à ação de medidas de controle (GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2000). Em muitas linhagens de carrapatos, uma mutação pontual no canal de sódio foi capaz de conferir altíssimas taxas de resistência a acaricidas piretróides (HERNANDEZ *et al.*, 2000, GUERRERO *et al.*, 2001; FOIL *et al.*, 2004). GARCÍA-GARCÍA *et al.* (1999) observaram uma correlação inversa na eficácia da vacinação com a rBm86 e a variação no locus Bm86, sugerindo que uma variação superior a 2,8% de aminoácidos é suficiente para conferir menor eficácia vacinal quando antígenos recombinantes foram usados. A amostra UFV (Viçosa), no entanto, apresentou variação total de 8,83%, ao longo da seqüência da proteína Bm86, somados os resultados do presente trabalho e os de SOSSAI *et al.* (2005), e ainda assim a vacina de peptídeos sintéticos SBm7462 apresentou resultados satisfatórios na avaliação da resposta imune humoral e celular (PATARROYO

*et al.*, 2002). Portanto, os resultados desse trabalho concluem que mesmo quando uma dada população apresenta variação significativa ao longo do gene *bm86* ou *bm95*, as poucas variações dos determinantes antigênicos 4822, 4824 e 4823 não são capazes de interferir na eficiência vacinal, sugerindo a idéia de um imunógeno universal.

### 5.3. Identidade de seqüência com outras espécies

Moléculas de artrópodes são identificadas, purificadas, caracterizadas, clonadas e possuem suas seqüências depositadas em banco de dados. *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 e KOCAN, 2003; GUERRERO *et al.*, 2005; KRASKY *et al.*, 2006).

Nesse trabalho realizou-se o alinhamento de todas as seqüências 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 seqüências 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 seqüência Bm86 depositados no banco de dados, de diversas populações de *R. (B.) microplus* (SOSSAI *et al.*, 2005).

O fragmento C de todas as amostras apresentou simiolaridade com a seqüência 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 seqüência 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 seqüências (figuras 5 e 6). Nossos dados reforçam os estudos sobre a proximidade filogenética do *Rhipicephalus* com o *Boophilus* (MURREL *et al.*, 2000; MURREL *et al.*, 2001; BEATI e KEIRANS, 2001).

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

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. O peptídeo 4822 está inserido nessa seqüência do *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 6).

Viçosa Rsanguineus	GAAGCGATACGGACCAGTATCGGAAAAGAAGTTTTTAAGGTTGAGATACTTAACTGCACG GACGCGATAAAGACCAGTATCGGAAGCGAAGTTTTTAAAGTTGAGATACTGAACTGCACA ** *****
Viçosa Rsanguineus	CAGGACATTAAGGCAAGACTCATAGCAGAGAAACCA <b>CTGTCAA</b> AATAC <b>CTGTGCTCAGGAAA</b> GAGGACATTAAGCAAGGCTCATAGCATCGAAACCG <b>CTGTCAAAGCACGTGCTCAAGAGG</b> *****
Viçosa Rsanguineus	<b>CTACAAGCATGCGAGCAT</b> CCAATCGGCGAATGGTGCATGATGTATCCGAAGTTGCTGATC <b>CTTCAGGCGTGCAGCAT</b> CCTGTGCGGTGACCTGTGCATGCTGTATCCGAAGTTGCCGATC ** ** * *****
Viçosa Rsanguineus	AAGAAAACTCTGCAACAGAAATGAAGAAGAGAACCTTTGCGACAGTCTGCTCAAGAAT AAGAAAGTTCTGCAACAGAAATCGAAGAAGAGAACCTTTGCGACAGTATCCTCAAGACG *****
Viçosa Rsanguineus	CAGGAAGCTGCCTACAAAGGTCAAACAAATGCGTCAAGGTCGACAACCTTTCTGGTTC CAGGAAAATGGATACAAGGTCGAAACAAGTGCCTCAAGGTCGATAACTTTTCTGGTTC *****
Viçosa Rsanguineus	CAGTGCCTGATGGTTACACAACAACCTTACGAGATGACACGAGGTCGCCTACGCCGCTCC CAGTGCCTGACGGTTATAGACAGTTGACGAGATCGAACGAGGTCGCCTACGCCGCTCC *****
Viçosa Rsanguineus	GTGTG GTGTG *****

**Figura 5.** Alinhamento parcial, utilizando ferramentas do site JustBio, do gene *bm86* dos nucleotídeos 1125 ao 1489, da população UFV (Viçosa) com a seqüência da proteína Rs86 de *Rhipicephalus sanguineus* depositada no GenBank™ número de acesso DQ201646. As semelhanças são indicadas por asterisco (\*) e as diferenças pela ausência do mesmo. A seqüência em negrito e sublinhado corresponde ao peptídeo 4822 da vacina sintética SBm7462.

Bm95	GAIRTSIGKEVFKVEILNCTQDIKARLIAEKPL <b><u>LSKYVLRKLOACEHP</u></b> IGEWCMMPKLLI
Bm86	EAIRTSIGKEVFKVEILNCTQDIKARLIAEKPL <b><u>LSKHVLRKLOACEHP</u></b> IGEWCMMPKLLI
Viçosa	EAIRTSIGKEVFKVEILNCTQDIKARLIAEKPL <b><u>LSKYVLRKLOACEHP</u></b> IGEWCMMPKLLI
Rsanguineus	DAIKTSIGSEVFKVEILNCTEDIKARLIASKPL <b><u>LSKHVLRKLOACEHP</u></b> PVGDLCMLYPKLP ** **** ***** ** * ** * ** *
Bm95	KKNSATEIEEENLCDSLLKNQEAAAYKGQNKCVKVDNLFWFQCADGYTTTYEMTRGRLRRSV
Bm86	KKNSATEIEEENLCDSLLKDQEAAAYKGQNKCVKVDNLFWFQCADGYTTTYEMTRGRLRRSV
Viçosa	KKNSATEIEEENLCDSLLKNQEAAAYKGQNKCVKVDNLFWFQCADGYTTTYEMTRGRLRRSV
Rsanguineus	KKGSATEIEEENLCDSILKTQENGYKGQNKCVKVDNLFWFQCADGYRAVDEIERGRLRRSV ** ***** ** * ** ***** ***** * *****

**Figura 6.** 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 seqüência 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 seqüência em negrito e sublinhado corresponde ao peptídeo 4822 da vacina sintética SBm7462.

As seqüências 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). Os autores dessa seqüência estudaram o uso da vacina recombinante Bm86 (TickGARD™) em outras espécies de carrapatos além do *R. (B.) microplus* (DE VOS *et al.*, 2001). A amostra Viçosa apresentou 77,56% de identidade com a seqüência HA98, no fragmento C. Na seqüência do peptídeo 4822, uma lisina (K) e uma arginina (R) foram substituídas por uma asparagina (N) comparando-se as seqüências Bm86 e Bm95. E uma tirosina (Y) ainda foi substituída por uma histidina (H) em relação ao padrão Bm95 (figura 7).

Em relação aos nucleotídeos compreendidos entre o número 39 ao 438, grandes taxas de variabilidade foram apresentadas (figura 8).

840	850	860	870	880	890	900	910	920		
Bm86	839	TCGTGTGCACAAAGGAAC	TGTGTGTGAGTCCCGCTGGAATCAACATCTAGTGGGGACACGTCGATAGTGGTTCGCGTGCACAAAGAA	928						
Bm95	839	.....G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	928	
ViçosaC	839	.....G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	928	
HA98	839	C.....A..A.TCAG.....A.....CTG.....A...C...AC.GA.A...GC.....A.....T...C.G	.....	.....	.....	.....	.....	.....	928	
		R V H K E N S V C E C P S D Q Q L L D G K C A S E C V D N R								
		930	940	950	960	970	980	990	1000	1010
Bm86	929	ATGCCACGAAAGAAATTTATGGACTGTGGCGTATATATGAATCGACAAAGCTGCTATTGTCCATGGAAATCAAGGAAGCCGGGCCAAATGT	1018							
Bm95	929	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1018
ViçosaC	929	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1018
HA98	929	.....T.....GA.C.....C.....C..A..G..C.....CAA.....G.T.....G.....CCA.G.....CC.GG.GGC..	1018							
		C H E N F T D C G V Y M N K Q G C Y C P W T T R K P P G G V								
		1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
Bm86	1019	CAACATCAATGAATGCCTACTGAATGAGTATTACTACCGGTGTCATTCAACCCCAACATATCTTTTGTATTCTGACCAATTGCAAAATGGTA	1108							
Bm95	1019	.....C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1108
ViçosaC	1019	.....C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1108
HA98	1019	.....G.G.....G.CG.....A.G.....G.....C..AC.AA.....G.G.....	1108							
		E I S R C M L N E Y Y Y T V S F T P N I S L N S D H C E W Y								
		1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
Bm86	1109	TGAGGATCGTGTTTTGAAGCGATACGACACAGTATCGGAAAAGAAGTTTTTAAGGTTGAGATACTTAACATGCACGACAGACATTAAGGC	1198							
Bm95	1109	.....G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1198
ViçosaC	1109	.....G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1198
HA98	1109	.....A.A.....C.....G.....GA.....GC.....GTT.....G.....A.....A.G.....C.T.....	1198							
		E K R V L E A M R T A I G V E V F K V E I M N C T Q D I M A								
		1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280
Bm86	1199	AAGACTCATAGCAGAGAAACCACTGTCAAACACGCTGCTCAGGAACTACAAGCATCGGAGCATCCAATCGGGAATGGTGCATGATGTA	1288							
Bm95	1199	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1288
ViçosaC	1199	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1288
HA98	1199	.....C.G.....T.....GAGT.GG..G.....T..T..T.G.AC..G..T.....C..CG.....T..C.TC.....C.....	1288							
		R L I A S R P L S N H V L N K L Q A C E H P V G D F C M L Y								
		1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370
Bm86	1289	TCCGAAGTTGCTGATCAAGAAAACTCTGCAACAGAAATCGAAGAAGAGAACCTTTGCGACAGTCTGCTCAAGGATCAGGAAGCTGCCTA	1378							
Bm95	1289	.....G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1378
ViçosaC	1289	.....G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1378
HA98	1289	.....C.....GGG.....G.....C.....G.....CT.G..A.C.....GAAG.....	1378							
		P K L P I K K G S A T G I E E E N L C E S L L K N Q E K A Y								
		1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440	1450	1460
Bm86	1379	CAAAGGTCAAAAAAATGCCTCAAGGTCGACAACCTCTCTGGTTCAGTGGCTGATGGTTACACAACAACCTACGAGATGACACGAGG	1468							
Bm95	1379	.....G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1468
ViçosaC	1379	.....G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1468
HA98	1379	.....G.....G.G.....G.....G..T..A.....A..C.....G.G..GT.CG..TG.C..A.G..	1468							
		K G E N K C V K V D D F Y W F Q C A D G Y R A V R D V T R G								
		1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550
Bm86	1469	TCGCCTACGCGCTCCGTGTGTAAGCTGGAGTTCTTTCGCAACGAAAAACGAGCAGTGGAGTGTGCTGACAAAAGGCAATATTGTTTA	1558							
Bm95	1469	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1558
ViçosaC	1469	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1558
HA98	1469	.....G.....C..C.....C.....C..CA..T..A..A..CT..T.....CA.....G.....C.T	1558							
		R L R R S V C K A G V S C T D K E Q L D C A N K G Q I C V F								

Continua...

```

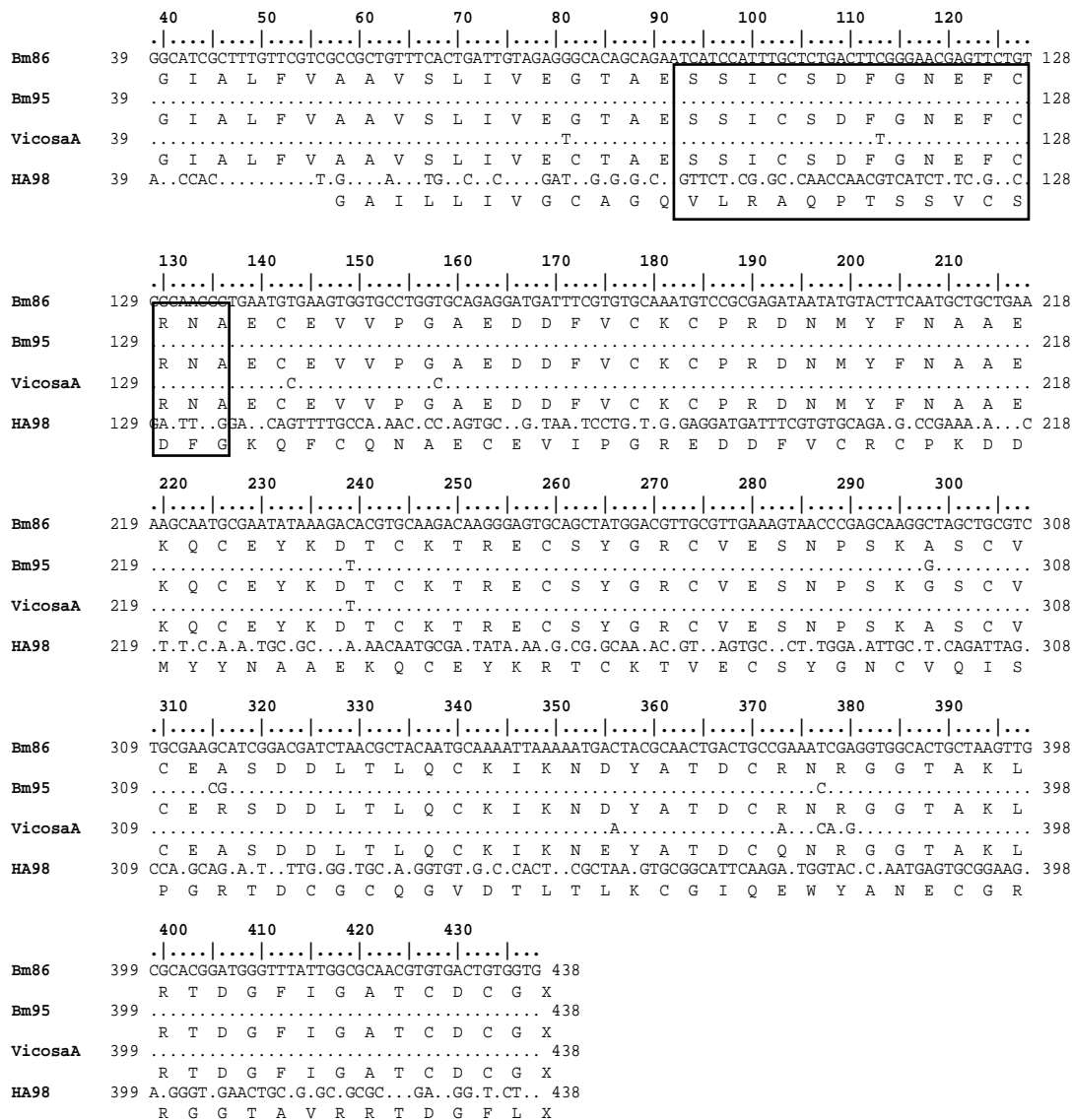
              1560      1570      1580      1590      1600
          .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|. .|.
Bm86      1559 CGAAAAACGGCAAAGCGAATTGCCAATGCCACCAGACACTAA 1600
          E N G K A N C Q C P P D T
Bm95      1559 ..... 1600
          E N G K A N C Q C P P D T
ViçosaC   1559 ..... 1600
          E N G K A N C Q C P P D T
HA98      1559 .....T.AG...C.A.....G..T..G.....GT 1600
          E N E K P N C Q C P P D T

```

**Figura 7.** Alinhamento das seqüências parciais, gerado pelo software BioEdit® versão 7.0.5.3, dos genes *bm86* e *bm95* compreendidos do nucleotídeo 839 ao 1600, denominado fragmento C, e das seqüências protéicas codificadas dos aminoácidos 270 ao 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 seqüência correspondente ao peptídeo 4822 da vacina sintética SBm7462.

As seqüências amplificadas com os *primers* A, desse estudo, ainda apresentaram similaridade com outra seqüência 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 seqüência identidade representou 71,05%. A porção do peptídeo 4823 não está inserida nesse fragmento (figuras 9 e 10).





**Figura 8.** Alinhamento das seqüências parciais, gerado pelo software BioEdit® versão 7.0.5.3, dos genes *bm86* e *bm95* compreendidos do nucleotídeo 39 ao 438, denominado fragmento A, e das seqüências protéicas codificadas dos aminoácidos 3 ao 135 da amostra UFV (Viçosa) de *R. (B.) microplus* e da proteína HA98 (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 seqüência correspondente ao peptídeo 4823 da vacina sintética SBm7462.

Viçosa HA98like	ATGATTTTCGTGTGCAAATGTCCGCGAGATAATATGTACTTCAATGCTGCTGAA ATGATTTTCGTGTGCAAATGCCCGAACGATGACATGTACTACAATGCCGCGAGAA ***** ** * ***** ** **
Viçosa HA98like	AAGCAATGCGAATATAAAGATACGTGCAAGACAAGGGAGTGCAGCTATGGACGTTGCGTT AAACAATGTGAATATAAAGGACGTGCAAACTGTGCGAGTGTAGCTATGGATACTGCTAT ** ***** ***** ** ***** ***** ** *
Viçosa HA98like	GAAAGTAACCCGAGCAAGGCTAGCTGCGTCTGCGAAGCATCGGACGATCTAACGCTACAA GAGATTAGCCAGGCAGAACTGGTTGTGGATGCCAAGGTGTCGACACACTAACGCTAAAG ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ***** *
Viçosa HA98like	TGCAAAATTA AAAATGAATACGCAACTGACTGCCAAAACAGGGGTGGCACTGCTAAGTTG TGCGGCATCAAGAATGGTTTCGCTAATGACTGCGGAAGGAAGGTGGAAGTGTGCTGCTG *** ** * ** * * ** * * ***** ** * ***** ***** * **
Viçosa HA98like	CGCACGGATGGGTTTATTGGCGCAACGTGTGAC CGCACGGATGGATTTCCTGGCGCAAGGTGCGAT ***** ** ***** ** *

**Figura 9.** Alinhamento, utilizando ferramentas do *site* JustBio, do gene *bm86* dos nucleotídeos 166 ao 431, da população UFV (Viçosa) com a seqüência 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.

Bm95	DFVCKCPRDNMYFNAAEKQCEYKDTCKTRECSYGRCVESNPSKGCVCER
Bm86	DFVCKCPRDNMYFNAAEKQCEYKDTCKTRECSYGRCVESNPSKASCVCEA
Viçosa	DFVCKCPRDNMYFNAAESCVCESDDLTLQCKIKNEYATDCQNRGGTAKL
HA98like	DFVCKCPNDMYFNAAEKQCEYKRTCKTVECSYGICYEIRPGRGTGCGCQG ***** .*:**:***** ** * ** * * .*.:. * *
Bm95	SDDLTLQCKIKNDYATDCRNRRGGTAKLRTDGFIGATCD
Bm86	SDDLTLQCKIKNDYATDCRNRRGGTAKLRTDGFIGATCD
Viçosa	KQCEYKDTCKTRECSYGRCVESNPSKARTDGFIGATCD
HA98like	VDLTLKCGIQEWFANDCGRKGGTAVLRTDGFPGARCD * ***: * *: :*. ** .:***** ***** ** **

**Figura 10.** Alinhamento, utilizando ferramentas do *site* JustBio, do gene *bm86* das proteínas Bm95, Bm86, da população UFV (Viçosa) e da seqüência 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.

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. Contudo, as expectativas são animadoras, visto que, mesmo a rBm86 sendo mais sensível

ao polimorfismo genético entre populações do que a vacina por peptídeos sintéticos, pesquisadores já encontraram resultados satisfatórios no teste com a vacina recombinante rBm86 em outras espécies de carrapatos. Os melhores resultados foram para *Boophilus annulatus* (PIPANO *et al.*, 2003), *B. decoloratus*, *Hyaloma dromedarii* e *H. anatolicum* (DE VOS *et al.*, 2001).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho concluem que, mesmo quando uma dada população apresenta variação significativa ao longo do gene *bm86* ou *bm95*, as poucas variações dos determinantes antigênicos 4822 e 4823 não são capazes de interferir na eficiência vacinal, sugerindo a idéia de um imunógeno universal.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-RODRÍGUEZ, R., ALONSO-MORALES, R., BALLADARES, S., FLORES-AGUILAR, H., GARCÍA-VAZQUEZ, Z., GORODEZKY, C. 2005. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. **Veterinary Parasitology**. 127: 313 – 321.

ALMÁZAN, C., KOCAN, K. M., BERGMAN, D. K., GARCIA-GARCIA, J. C., BLOIN, E. F., DE LA FUENTE, J. 2003. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. **Vaccine**. 21: 1492-1501.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. L. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**. 215: 403-410.

ANDRÉ, F. E. 2001. The future of vaccines, immunization concepts and practice. **Vaccine**. 19: 2206 – 2209

ANDREOTTI, R., GOMES, A., MALAVAZI-PIZA, K. C., SASAKI, S. D., SAMPAIO, C. A. M., TANAKA, A. S. 2002. BmTI antigens induce a bovine

protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **International Immunopharmacology**. 2: 557 – 563.

ANDREOTTI, R., KOLLER, W. W., TADEI, W. J., DO PRADO, A. P., BARROS, J. C., DOS SANTOS, F., GOMES, A. 2003. Occurrence of the *Megaselia scalaris* (LOEW, 1866) (Díptera, Phoridae) as a parasitoid of *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 12 (1): 46-47.

AUCOUTURIER, J. DUPUIS, L., GANNE, V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**. 19: 2666 – 2672.

BAHIENSE, T. C., FERNANDES, E. K. K., BITTENCOURT, V. R. E. P. 2006. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. **Veterinary Parasitology**. 141: 319 - 324.

BARKER, S. C., MURRELL, A., 2002. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. **Experimental & applied acarology**, 28: 55-68.

BITTENCOURT, V. R. E. P., BAHIANSE, T. C., FERNANDES, E. K. K., DE SOUZA, E. J. 2003. Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOROKIN, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari; Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 12 (1): 38-42.

BABIUK, L. A. 2002. Vaccination: A Management Tool in Veterinary Medicine. **The Veterinary Journal**. 164: 188±201.

BAXTER, G. D., BARKER, S. C. 1998. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *R. (B.) microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. **Insect Biochemical Molecular Biology**. 28: 581 – 589.

BAXTER, G. D., BARKER, S. C. 2002. Analysis of sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and organophosphate resistant cattle ticks. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 32: 815 – 820.

- BEATI, L., KEIRANS, J. E. 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks genera *Rhopicephalus* and *Boophilus* (Acari:Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **Journal of Parasitology**. 87 (1): 32-48.
- BORÉM, A. VIEIRA, M L. C. 2005. **Glossário de Biotecnologia**. Ed. Folha de Viçosa. Viçosa, 158.
- BRUM, J. G. W., NUNES, J. P., 1992. Histologia de Ixodidae: vagina e ovário de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 1: 65-66.
- CAMPOS, E., MORAES, J., FAÇANHA, A. R., MOREIRA, E., VALLE, D., ABREU, L., MANSO, P.P.A, NASCIMENTO, A., PELAJO-MACHADO, M., LENZI, H., MASUDA, A., DA SILVA VAZ Jr., I., LOGULLO, C. 2006. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. **Veterinary Parasitology**. 13: 349-257.
- CHIGAGURE, N. N., BAXTER, G. D., BARKER, S. C. 2000. Microsatellite loci of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental & applied acarology**. 24: 951 – 956
- CIPRANDI, A., de OLIVEIRA, S. K., MASUDA, A., HORN, F. TERMIGNONI, C. 2006. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. **Experimental Parasitology**. 114:40-46.
- CORSON M. S., TEEL, T. D., GRANT, W. E. 2004. Microclimate influence in a physiological model of cattle-fever tick (*Boophilus* spp.) population dynamics. **Ecological Modelling**. 180: 487-514.
- COSSÍO-BAYÚGAR, R., MIRANDA, E., HOLMAN, P. J. 2005. Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxidase glutathione peroxidase gene from the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 35: 1378 – 1387.
- COUTO-PIMENTEL, J. 2002. A Vacina Sintética SBm 7462 no Controle do Carrapato *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887) em Animais Estabulados e a Campo. **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 77p.

- CRAMPTON, A. L., MILLER, C., BAXTER, G. D., BARKER, S. C. 1998. Expressed sequenced tags and new genes from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Experimental & Applied Acarology**. 22: 177 - 186.
- DA SILVA VAZ-JR, I. D. S., LOGULLO, C., TERMIGNONI, C., DE OLIVEIRA, P. L., MASUDA, A. 2004. Caracterização de novos antígenos em *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 13 (1): 146-149.
- DA SILVA VAZ-JR., I., IMAMURA, S., NAKAJIMA, C., CARDOSO, F. C., FERREIRA, C., A., S., RENARD, G., MASUDA, A., OHASHI, K., ONUMA, M. 2005. Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding for *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus appendiculatus* actins. **Veterinary Parasitology**. 127: 147-155.
- DALTON, J. P., MULCAHY, G. 2001. Parasite vaccine – a reality? **Veterinary Parasitology**. 98: 149 – 167.
- DAVEY, R. B., GEORGE, J. E., MILLER, R. J. 2006. Comparison of the reproductive biology between acaricide-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. 139: 211–220.
- DE LA FUENTE, J., RODRÍGUEZ, M., REDONDO, M., MONTERO, C., GARCÍA-GARCÍA, J. C., MÉNDEZ, L., SERRANO, E., VALDÉS, M., HENRÍQUEZ, A., CANALES, M., RAMOS, E., BOUÉ, O., MACHADO, H., LLEONART, R., DE ARMAS, C. A., REY, S., RODRÍGUEZ, J. L., ARTILES, M., GARCÍA, L. 1998. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac TM against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**. 16: 336-373.
- DE LA FUENTE, J., GARCÍA – GARCÍA, J. C., GONZÁLEZ, D. M., IZQUIERDO, G., OCHAGAVIA, M. E. 2000. Molecular analysis of *Boophilus* spp. (Acari: Ixodidae) tick strains. **Veterinary Parasitology**. 92: 209 – 222.
- DE LA FUENTE, J., KOCAN, K. M. 2003. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. **Expert Review of Vaccines**. 2: 583-593.



- DE LA FUENTE, J., ALMAZAN, C., NARANJO, V., BLOUIN, E. F., KOCAN, K. M. 2006. Synergistic effect of silencing the expression of tick protective antigens 4D8 and Rs86 in *Rhipicephalus sanguineus* by RNA interference. **Journal Parasitology Research**. 99 (2): 108 – 113.
- DE VOS, S., ZEINSTRA, L., TAOUFIK, O., WILLADSEN, P., JONGEJAN, F. 2001. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. **Experimental and Applied Acarology**. 25: 245 – 261.
- ESTRADA-PEÑA, A. 1999. Geostatistic and remote sensing using NOAA-AVHRR satellite imagery as predictive tools in tick distribution and habitat suitability estimations for *R. (B.) microplus* (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**. 81: 73-82.
- ESTRADA-PEÑA, A., BOUATTOUR, A., CAMICAS, J. L., GUGLIELMONE, A., HORAK, I., JONGEJAN, F., LATIF, A., PEGRAM, R., WALKER, A. R. 2006. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental & Applied Acarology**. 38:219–235.
- FERNANDEZ-RUVALCABA, M., PRECIADO-DE-LA TORRE, F., CRUZ-VAZQUEZ, C., GARCIA-VAZQUEZ, Z. 2004. Anti-tick effects of *Melinis minutiflora* and *Andropogon gayanus* grasses on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae. **Experimental and Applied Acarology**. 32: 293 – 299.
- FOGAÇA, A., ALMEIDA, I. C., EBERLIN, M. N., TANAKA, A. S., BULET, P., DAFFRE, S., 2005. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**. 27(4): 667-674.
- FOIL, L.D., COLEMAN, P., EISLER, M., FRAGOSO-SANCHEZ, H., GARCIA-VAZQUEZ, Z., GUERRERO, F. D., JONSSON, N. N., LANGSTAFF, I.G., LI, A.Y., MACHILA, N., MILLER, R.J., MORTON, J., PRUETT, J. H., TORR, S. 2004. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Veterinary Parasitology**. 125: 163 – 181.

FRAGOSO, H., ORTIZ, M., RODRIGUEZ, M., DE LA FUENTE, J. 1995. Evaluation of the efficacy of the recombinant vaccine (Gavac<sup>TM</sup>) in cattle artificially infested with *R. (B.) microplus* (Can). **Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick**. Habana: Elpos Scientiae, 280p.

FRISCH, J. E., O'NEILL, C. J., KELLY, M. J. 2000. Using genetics to control cattle parasites – the Rockhampton experience. **International Journal for Parasitology**. 30: 253 – 264.

GARCIA-GARCIA, J.C., SOTOT, A., NIGRO, F., MAZZA, M., JOGLAR, M., HECHEVARRIA, M., LAMBERTI, J., DE LA FUENTE, J. 1998. Adjuvant and immunostimulating properties of the recombinant Bm86 protein expressed in *Pichia pastors*. **Vaccine**. 16: 1053 – 1055.

GARCÍA-GARCÍA, J.C., GONZÁLEZ, I.L., GONZÁLEZ, D.M., VALDÉS, M., MÉNDEZ, L., LAMBERTI, J., D'AGOSTINO, B., CITRONI, D., FRAGOSO, H., ORTIZ, M., RODRÍGUEZ, M., DE LA FUENTE, J., 1999. Sequence variations in the *R. (B.) microplus*Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Experimental & Applied Acarology**. 23: 883–895.

GARCÍA-GARCÍA, J. C., MONTERO, C., REDONDO, M., VARGAS, M., CANALES, M., BOUÉ, O., RODRÍGUEZ, M., JOGLAR, M., MACHADO, H., GONZÁLES, I. L., VALDÉZ, M., MÉNDEZ, L., DE LA FUENTE, J. 2000. Control of Ticks resistant to the immunization with BM86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *R. (B.) microplus*. **Vaccine**. 18: 2275-2287.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, C., GARCIA, S. M. L. SCHNEIDER, F. L., SEVERINO, A. G., WINKELMANN, E. C. 1999. Regionalization of oviducts in *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) and its potential significance for fertilization. **Revista Brasileira de Parasitologia**. 59: 653-661.

GLICKMAN, L. 1999. Weighing the risks and benefits of vaccination. **Advances in Veterinary Medicine**. 41: 701 – 713.

GLÓRIA, M. A., FACCINI, J. L. H., DAEMON, E., GRISI, L. 1993. Biologia comparativa da fase não parasitária de estirpes de *Boophilus microplus*

(CANESTRINI, 1887) resistente e sensível a carrapaticidas em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 2 (2): 79-84.

GONZALES, J. C. 1974. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 101p.

GONZÁLEZ, L. J. CREMATA, J. A., GUANCHE, Y., RAMOS, Y., TRIGUERO, A., CABRERA, G., MONTESINO, R., HUERTA, V., PONS, T., BOUÉ, O., FARNÓS, O., PODRÍGUEZ, M. 2004. The cattle tick antigen, Bm95, expressed in *Pichia pastoris* contains short chains of N- and O-glycans. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 432: 205 – 211.

GONZÁLEZ LOMBANA, C. 2003. Resposta imune de bovinos vacinados com peptídeo sintético SBm7462 com vistas ao controle do *R. (B.) microplus* (CANESTRINI,1887). **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 77p.

GRAÇA-SOUZA, A., MAYA-MONTEIRO, C., PAIVA-SILVA, G. O., BRAZ, G. R. C., PAES, M. C., SORGINE, M. H. F., OLIVEIRA, M. F., OLIVEIRA, P. L. 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 36: 322–335.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, 21(125), p.8-10.

GUERRERO, F. D., DAVEY, R. B., MILLER, R. J. 2001. Use of an Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Assay to Genotype Pyrethroid Resistant Strain of *R. (B.) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**. 38 (1): 44 – 50.

GUERRERO, F. D., MILLEN, R. J., ROUSSEAU, M. E., SUNKARA, S., QUACKENBUSH, J., LEE, Y., NENE, V. 2005. BmiGI: A database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 35: 585–595.

GUERRERO, F. D., NENE, V. M., GEORGE, J. E., BARKER, S. C., WILLADSEN, P. 2006. Sequencing a New Target Genome: The *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Genome Project. **Journal of Medical Entomology**. 43(1): 9-6.

- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**. 41:95-98.
- HEIMERDINGER, A., OLIVO, C. J., MOLENTO, M. B., AGNOLIN, C. A., ZIECH, M. F., SCARAVELLI, L. F. B., SKONIESKI, F. R., BOTH, J. F., CHARÃO, P. S. 2006. Extrato alcoólico de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) no controle do *Boophilus microplus* em bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 15 (1): 37-39.
- HERNÁNDEZ, C. M., MASSARD, C. L., SOARES, C. O., FONSECA, A. H. 1997. Alterações histológicas do trato digestivo de *Boophilus microplus* pela ação de anticorpos anti rBm 86. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 6 (1): 33-37.
- HERNANDEZ, R., HE, H., CHEN, A. C., WAGHELA, S. D., IVIC, G. W., GEORGE, J. E., WAGNER, G. G. 2000. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick, *R. (B.) microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 30: 969 – 977.
- HILBURN, L. R., GUNN, S. J., DAVEY, R. B. 1989. The genetics of new world *Boophilus microplus* (Canestrini) and *Boophilus annulatus* (Say) in their possible control. **Bull Soc Vector Ecology**. 14: 222-231.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, 96(1): 23-28.
- JONSSON, N. N., MATSCHOSS, A. L., PEPPER, P., GREEN, P. E., ANSELL, J. 2000a Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Veterinary Parasitology**, 89: 297 – 305.
- JONSSON, N. N., MATSCHOSS, A. L., PEPPER, P., GREEN, P. E., ALBRECHT, M. S., HUNGERFORD, J., ANSELL, J. 2000b. Evaluation of TickGARDPLUS, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. **Veterinary Parasitology**. 88: 275 – 285.
- JONSSON, N. N. 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**. 137: 1-10.

KASHINO, S. S., RESENDE, J., SACCO, A. M. S., ROCHA, C., PROENÇA, L., CARVALHO, W. A., FIRMINO, A. A., QUEIROZ, R., BENAVIDES, M., GERSHWIN, L. J., DE MIRANDA-SANTOS, I. K. F. 2005. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. . **Experimental Parasitology**. 110: 12-21.

KRASKY, A., ROHWER, A., SCHROEDER, J., SELZER, P. M. 2006. A combined bioinformatics and chemoinformatics approach for the development of new antiparasitic drugs. **Genomics**. *In press*.

LABRUNA, M. B., VERÍSSIMO, C. J. 2001. Observações sobre a infestação por *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bovinos mantidos em rotação de pastagem, sob alta densidade animal. **Arquivos do Instituto Biológico**. 68 (2): 115-120.

LARA, F. A., LINS, U., BECHARA, G. H., OLIVEIRA, P. L. 2005. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. **The Journal of Experimental Biology**. 208: 3093-3101.

LEAL, A. T., POHL, P. C., FERREIRA, C. A. S., NASCIMENTO-SILVA, M. C. L., SORGINE, M. H. F., LOGULLO, C., OLIVEIRA, P. L., FARIAS, S. E. 2006a. Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* *yolk* pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**. 45: 107-114.

LEAL, A. T., SEIXAS, A., POHL, P. C., FERREIRA, C. A. S., LOGULLO, C., OLIVEIRA, P. L., FARIAS, S. E., TERMIGNONO, C., DA SILVA VAZ Jr., MASUDA, A. 2006b. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* *Yolk* pro-Cathepsin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 114: 341-345.

LODOS, J., BOUE, O., DE LA FUENTE, J. 2000. A model to simulate the effect of vaccination against *Boophilus* ticks on cattle. **Veterinary Parasitology**. 87: 315 – 326.

LOGULLO, C., MORAES, J., DANSA-PETRETSKI, M., VAZ JR. , I. S., MASUDA, A., SORGINE, M. H. F., BRAZ, G. R., MASUDA, H., OLIVEIRA, P. L.

2002. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 32: 1805-1811.
- MASSARD, C. L., FONSECA, A. H., BITTENCOURT, V. R. E. P., SILVA, K. M. M. 1995. Avaliação da eficácia da vacina recombinante rBm86 “GAVAC™” contra o carrapato *R. (B.) microplus* no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. 17(4):167-173.
- MAYA-MONTEIRO, C. M., ALVES, L. R., PINHAL, N., ABDALLA, D. S. P., OLIVEIRA, P. L. 2004. HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 34: 81–87.
- MURREL, A., CAMPBELL, N. J. H., BARKER, S. C. 2000. Phylogenetic analyses of Rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 16 (1): 1-7.
- MURRELL, A., CAMPBELL, N. J. H., BARKER, S. C. 2001. A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 21 (2): 244-258.
- NALIN, D. R. 2002. Evidence based vaccinology. **Vaccine**. 20: 1624 – 1630.
- NARI, A. 1995. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne disease in South America. **Veterinary Parasitology**. 57: 153-165.
- NEURATH, A. R., KENT, S. B. H. 1986. Requirements for successful synthetic peptide vaccines. **Annals do Instituto Pasteur de Virologia**. 137: 513-514.
- NUNES, E. T., BECHARA, G. H., SAITO, K. C., DENARDI, S. E., OLIVEIRA, P. R., MATHIAS, M. I. C. 2005. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). **Mícron**. 36: 437–447.
- NUNES, E. T., MATHIAS, M. I. C., BECHARA, G. H. 2006. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): Acid phosphatase and ATPase activities localization in salivary glands of females during the feeding period. **Experimental Parasitology**. 114(2): 109-117.
- NUÑEZ, J. L., MUÑOZ, C. M. E., MOLTEDO, H. L. 1982. *R. (B.) microplus*: **La Garrapata Común del Ganado Vacuno**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 184p.

- NUTTALL, P. A., TRIMNELL, A. R., KAZIMIROVA, M., BABUDA, M. 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. **Parasite Immunology**. 28: 155-163.
- OLIVEIRA, R. C. 1998. Avaliação experimental do peptídeo sintético 4912 como imunógeno para o controle de carrapato *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887). **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 72p.
- OLIVEIRA-SIQUEIRA, T. C. G., OLIVEIRA, M. C. S., ARAUJO Jr., J. P. AMARANTE, A. F. T. 2005. PCR- based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal for Parasitology**. 35: 105 – 111.
- PASSOS, D. T., FERREIRA, C. A. S., DA SILVA, S. S., RICHTER, M. F., OZAKI, L. S. 1999. Detection of genomic variability in different populations of the cattle tick *R. (B.) microplus* in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**. 87: 83 – 92.
- PATARROYO, J. H. 1994. Babesiose bovina: controle de vetores com vacinas a base de peptídeos sintéticos. **Revista de Patologia Tropical**. 23: 145-146.
- 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. 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *R. (B.) microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary immunology and immunopathology** 88: 163 – 172.
- PATARROYO, J. H., S., SOSSAI, S. 2004. Alternativas para o controle de carrapatos: vacinas e medicamentos. **Anais do IV Simpósio Nacional das Raças Simental e Simbrasil**. 1 – 7.
- PATARROYO, J. H. S., GONZÁLEZ-LOMBANA, C. 2004. Resposta immune a vacinas sintéticas anti *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 13 (1): 129-134.
- PENICHET, M., RODRIGUEZ, M., CASTELLANO, O., MANDADO, S., ROJAS, Y., RUBIERA, R., SÁNCHEZ, P., LLEONART, R., DE LA FUENTE, J. 1994. Detection of Bm86 antigen in different strains of *R. (B.) microplus* and

effectiveness of immunization with recombinant Bm86. **Parasite Immunology**. 16: 493-500.

PEREIRA, M. C. 1982. ***Boophilus microplus*: Revisão Taxionômica e Morfo-Biológica**. Rio de Janeiro: Quimo Divisão Veterinária.

PIPANO, E., ALEKCEEV, E., GALKER, F., FISH, L., SAMISH, M., SHKAP, V. 2003. Immunity against *Boophilus annulatus* induced by the Bm86 (Tick-GARD) vaccine. **Experimental and Applied Acarology**. 29: 141-149.

POLAR, P., KAIRO, M. T. K., MOORE, D., PEGRAM, R., JOHN, S. A. 2005a. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. **Mycopathologia**. 160; 151-157.

POLAR, P., MURO, M. A., KAIRO, M. T. K., MOORE, D., PEGRAM, R., JOHN, S. A., ROACH-BENN, C. 2005b. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. **Veterinary Parasitology**. 134: 159–167.

PRATA, M. C. A., FACCINI, J. L. H., DAEMON, E. 1999. Biologia da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) de origem caprina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 8 (2): 107-111.

PRICHARD, R., TAIT, A. 2001. The role molecular biology in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**. 98: 169-194.

PRUETT, J. H., UNTALAN, P. M., DAVEY, R. B. 2006. Identification and partial purification of serologically defined *Boophilus microplus* larval antigens by natural ectoparasite exposure. **Veterinary Parasitology**. 140:148-157.

RODRÍGUEZ, M., RUBIERA, R., PENICHET, M., MONTESINO, R., CREMATA, J., FALCÓN, V., SÁNCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOBÉS, C., VALDÉS, M., LEONART, R., HERRERA, L., DE LA FUENTE, J. 1994. High-level expresión of the *Boophilus microplus* BM86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal of Biotechnology**. 33, 135-146.



- RUIZ, P. M. G., PASSOS, L. M. F., RIBEIRO, M. F. B. 2005. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. **Veterinary Parasitology**. 128: 325 – 331.
- SAITO, K. C., BECHARA, G. H., NUNES, E. T., OLIVEIRA, P. R., DENARDI, S. E., MATHIAS, M. I. C. 2005. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. 129: 299 – 311.
- SALES-JUNIOR, P. A., GUZMAN, F., VARGAS, M. I., SOSSAI, S., PATARROYO, A. M. V., GONZÁLEZ, C. Z. L., PATARROYO, J. H. 2005. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm742. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 107: 281 – 290.
- SAMISH, M., GLAZER, I. 2001. Entomophagous Nematodes for the biocontrol of ticks. **TRENDS in Parasitology**. 17 (8): 368-371.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. 1977. DNA Sequence with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. USA, 74: 5463-5467.
- SANGSTER, N. C. 2001. Managing parasiticida resistance. **Veterinary Parasitology**. 98: 89 – 109.
- SANTOS, T. R. B., GONZALES, J. C., CHIES, J. M., FARIAS, N. A. R. 1998. Transmissão transovariana de *Babesia bigemina*, (SMITH 7 KILBORNE, 1893) por partenóginas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 7 (1): 7-10.
- SINGH, N. K. GHOSH, S. 2003. Experimental immunization of crossbred cattle with glicoproteins isolated from the larvae of *Hyalomma anatolicum* and *Boophilus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**. 31; 297 – 314.
- SMITH, D. R., HUNGERFOD, J., WILLADSEN, J. 1995. The development of TickGard – a commercial vaccine against the cattle tick *R. (B.) microplus*. **Indooroopilly: Biotec Australia-CSIRO**, 17 p.
- SOSSAI, S. 2004. Polimorfismo do gene *bm86* de *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) e análise da conservação genética dos

peptídeos integrantes da vacina sintética SBm7452. **Dissertação (mestrado). Viçosa: UFV**, 60p.

SOSSAI, S., PECONICK, A. P., SALES-JUNIOR, P. A., MARCELINO, F. C., VARGAS, M. I., NEVES, E. S., PATARROYO, J. H. 2005. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**. 37: 199- 214.

SUTHERST, R. W. 2001. The vulnerability of animal and human health to parasites under global change. **International Journal for Parasitology**. 31: 933 -948.

SUTHERST, R. W., BOURNE, A. S. 2006. The effect of desiccation and low temperature on the viability of eggs and emerging larvae of the tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Ixodidae). **International Journal for Parasitology**. 36: 193–200.

TAVARES, E. 2006. Maior controle de carrapatos em Goiás. **Balde Branco**. 500: 69-72.

TAYLOR, M. A. 2001. Recent Developments in Ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**. 161: 253-268.

TEODORO, R. L., MARTINEZ, M. L., BARBOSA DA SILVA, M. V. G., MACADO, M. A., VERNEQUE, R. D. S. 2004. Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: experiência brasileira. **Anais do V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**. Pirassununga, SP. CD ROM.

TIZARD, I. 1999. Grease, Anthraxgate, and Kennel Cough: A revisionist history of early veterinary vaccines. **Advances in Veterinary Medicine**. 41: 7 - 24.

TRIMNELL, A. R., HAILS, R. S., NUTTALL, P. A. 2002. Dual action ectoparasite vaccine targeting “exposed” and “concealed” antigens. **Vaccine**. 20: 3560-3568.

TRIMNELL, A. R., DAVIES, G. M., LISSINA, O., HAILS, R. S., NUTTAL, P. A. 2005. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. **Vaccine**. 23: 4329-4341.

- TURNI, C., LEE, R. P., JACKSON, L. A. 2004. A comparasion of the immunosuppressive effects of salivary gland extracts from two laboratory strains of *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**. 34: 833 – 838.
- ULLMANN, A. J., LIMA, C. M. R., GUERRERO, F. D., PIESMAN, J., BLACK IV, W. C. 2005. Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* and the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Molecular Biology**. 14 (2): 217-222.
- UNTALAN, P. M., GUERRERO, F. D., HAINES, L. R., PEARSON, T. W. 2005. Proteome analysis of abundantly expressed proteins from unfed larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 35 141–151.
- VASCONCELOS, V. O., FURLONG, J., FREITAS, G. M., DOLINSKI, C., AGUILLERA, M. M., RODRIGUES, R. C. D., PRATA, M. 2004. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA Strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. 94: 201–206.
- VERÍSSIMO, C. J., OTSUK, I. P., ZEITLIN, A. Z., BECHARA, G. H. 2004. Infestação por carrapatos *Boophilus microplus* (acari: ixodidae) em vacas Jersey. **Arquivos do Instituto Biológico**. 71: 630-632.
- WIKEL, S. K., ALARCON-CHAIDEZ, F. J. 2001. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. **Veterinary Parasitology**. 101: 275–287.
- 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. 1989. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *R. (B.) microplus*. **Journal of immunology**. 143(4): 1346-1351.
- WILLADSEN, P., SMITH, D., COBON, G., MCKENNA, R. V. 1996. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. **Parasite Immunology**. 18: 241-246.

- WILLADSEN, P. 1997. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**. 71: 209-222.
- WILLADSEN, P., JONGEJAN, F. 1999. Immunology of the Tick–Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. **Parasitology Today**.15 (7): 258-262.
- WILLADSEN, P. 2001. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. **Veterinary Parasitology**. 101: 353-367.
- WILLADSEN, P. 2004. Anti-tick vaccines. **Parasitology**. 129: 367-387.
- WILLADSEN, P. 2006. Tick control: Thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**. 138: 161-168.
- ZARLENGA, D. S., HIGGINS, J. 2001. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**. 101: 215 – 230.