

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTA A ESTRESSE OXIDATIVO E
MECANISMOS DE MORTE CELULAR EM *Boophilus microplus***

Tese de Doutorado

DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS

Orientadora: Dr^a. Aoi Masuda

Co-orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr.

Porto Alegre

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTA A ESTRESSE OXIDATIVO E
MECANISMOS DE MORTE CELULAR EM *Boophilus microplus***

Daniela Reis Joaquim de Freitas

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dr^a. Aoi Masuda

Co-orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr.

Porto Alegre

Setembro, 2006

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul - UFRGS, com apoio financeiro do CNPq, PADCT, PRONEX, e FAPERGS.

DEDICATÓRIA

“Quem comete um erro e não o corrige, comete outro erro. E ainda outro, se o justifica.”

Confúcio.

Dedico este trabalho a todos aqueles que me ajudaram a errar menos, ensinaram-me a aprender com os erros já cometidos e mostraram-me que sempre existe alguém que abre uma janela onde muitos lhe fecharam uma porta.

E dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Aoi Masuda e ao Prof. Itabajara Vaz pela grande oportunidade que me deram em trabalhar ao seu lado, por tudo que me ensinaram e pelos seus valiosos conselhos;

À Profa. Sandra Estrazulas Farias, pela ajuda em todos os momentos, pelos conselhos, pelo exemplo de pessoa que é e pela sua amizade;

A todos os meus colegas de laboratório e em especial a Clotilde Pinto, pela grande ajuda com soluções e tampões e material em geral dentro do laboratório;

Agradeço de forma especial a Carlos Alexandre Sanchez Ferreira, Alexandre Leal, Ilo Dias, Carolina Weber, ao trímero Gabriel, Maurício e Matheus e a Letícia, por terem tornado meu trabalho mais agradável e descontraído com suas presenças;

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Proteínas – em especial a Adriana Seixas e Andréia Estrela;

À minha Comissão de Acompanhamento, Prof. Henrique Ferreira e Prof. Carlos Termignoni, pela grande contribuição ao meu trabalho;

Aos funcionários da Secretaria, Luciano Saucedo e Sílvia Centeno, e demais professores, alunos e funcionários do Centro de Biotecnologia pelos anos que estiveram a meu lado, sempre dispostos a contribuir com o que fosse necessário;

Por último, quero agradecer aos meus amigos, que sempre estiveram comigo em todos os momentos, por pior que eles fossem.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. O carrapato <i>Boophilus microplus</i>	15
1.2. O ciclo biológico do <i>B.microplus</i>	16
1.3. Importância econômica de <i>B.microplus</i>	17
1.4. Métodos de controle de <i>B.microplus</i>	18
1.4.1 Controle químico.....	18
1.4.2 Controle imunológico.....	20
1.4.3 Controle biológico.....	23
1.5 Estresse oxidativo durante o desenvolvimento embrionário e larval: mecanismos de proteção.....	25
1.6 Morte celular.....	30
1.6.1 Morte não programada.....	30
1.6.2 Morte Celular Programada.....	31

1.6.2.1 <i>Autofagia</i>	31
1.6.2.2 <i>Apoptose</i>	32
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivos Gerais.....	35
2.2 Objetivos Específicos.....	35
3. CAPÍTULO I: MECANISMOS DE PROTEÇÃO A ESTRESSE OXIDATIVO EM	
<i>B. microplus</i>	37
3.1 DISCUSSÃO.....	45
3.2 CONCLUSÕES.....	52
4. CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS DE MORTE CELULAR	
EM <i>B. microplus</i>	53
4.1 DISCUSSÃO.....	90
4.2 CONCLUSÕES.....	95
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES FINAIS	96
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
7. ANEXOS.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	catalase
cDNA	DNA complementar ao RNA
CDNB	1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno (1-chloro-2, 4-dinitrobenzene)
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
GPx	glutaciona-peroxidase
GSH	glutaciona
GST	glutaciona-S-transferase
MDA	malondialdeído
pb	pares de bases
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (<i>Reverse transcription - polymerase chain reaction</i>)
PCD	morte celular programada (<i>programed cell death</i>)
RNA	ácido ribonucléico
ROS	espécies reativas de oxigênio (<i>reactive oxygen species</i>)

SOD superóxido-dismutase

TBARS espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid reactive species*)

TUNEL *TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*

RESUMO

O carrapato bovino *Boophilus microplus* está presente em áreas tropicais e subtropicais no mundo e é um ectoparasito hematófago que causa inúmeras perdas à bovinocultura, através da espoliação ao bovino ou das doenças que transmite como vetor. Atualmente, o principal método de controle empregado baseia-se em produtos químicos, que são onerosos e contaminam o ambiente. Estudos a respeito da ecologia, comportamento e fisiologia de *B. microplus* são importantes para o desenvolvimento de novos métodos de controle do carrapato. A resposta ao estresse oxidativo e a morte celular programada, examinadas neste estudo, permitem compreender melhor os mecanismos fisiológicos usados pelo carrapato adulto e seus ovos e larvas para sobreviver no ambiente. A resposta a estresse oxidativo foi analisada em ovos e larvas. A atividade de GST e outras moléculas envolvidas em mecanismos de proteção contra estresse oxidativo variaram dependendo do tempo transcorrido após a postura e eclosão. A cinética do consumo de oxigênio apresentou correlação positiva com o aumento na atividade de GST durante a embriogênese. Um alto conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi observado em extratos de ovos e larvas, indicando que carrapatos apresentam alto estresse oxidativo durante a embriogênese e desenvolvimento larval. Além disso, a atividade de GST apresentou forte correlação com peroxidação de lipídeos, uma indicação de seu papel na defesa antioxidante em ovos. Com o objetivo de melhor caracterizar o processo de morte celular, que elimina tecidos não mais necessários e leva à degeneração de glândulas salivares, ovários e singânglios, foi feita uma

investigação usando ensaios de visualização de fragmentação de DNA em gel de agarose, teste cometa e TUNEL e a ativação da via apoptótica foi analisada usando ensaio de caspase. A fragmentação de DNA e a atividade enzimática de caspase-3 foram observadas em glândulas salivares e ovários 48 e 72 h após a remoção do carrapato do hospedeiro; em singânglios estes parâmetros foram mantidos em baixos níveis após 48 h. Estes resultados obtidos sugerem que há um controle refinado de manutenção de tecido através de apoptose.

Palavras-chave: *Boophilus microplus*, estresse oxidativo, desenvolvimento embrionário; desenvolvimento larval; morte celular; fisiologia.

ABSTRACT

The cattle tick *Boophilus microplus* is present in tropical and subtropical areas in the world and it is a haematophagous ectoparasite that causes several losses to cattle breeding, through the bovine exploiting and diseases transmitted. Currently, the main control method is based on chemicals, which are expensive and contaminate the environment. Studies about ecology, behavior and physiology of *B. microplus* are important to develop new methods for the tick control. The data examined in this study allow understanding the physiologic mechanisms used by the tick, eggs and larvae to survive in the environment. For this, the oxidative stress response in eggs and larvae and the cell death in different tissues of adult tick females during the pre-oviposition period were analyzed. The oxidative stress response was analyzed in eggs and larvae and the results showed that the GST activity and other molecules involved in mechanism of protection against oxidative stress varied depending on the time elapsed after oviposition and eclosion. A positive correlation was observed between the oxygen consumption kinetics and the increase in GST activity during embryogenesis. A high content of thiobarbituric acid reactive substances were observed in egg and larva extracts, indicating that ticks face high oxidative stress during embryogenesis and aging. In addition, GST activity presented strong positive correlation with lipid peroxidation, an indication that it plays a role in oxidant defences in eggs. In order to better characterize the cell death process that eliminates unnecessary tissues, the degeneration of salivary glands, ovaries and synganglia was investigated using DNA fragmentation in agarose gel, comet and TUNEL assays, and apoptosis activation pathway by the caspase assay. DNA fragmentation and enzymatic activity of caspase-3 were

observed in salivary glands and ovaries at 48 and 72 h after tick removal from the host; in synganglia these parameters were maintained at low levels upon 48 h. These results obtained suggest that there is a refined control of tissue maintenance through apoptosis.

Key words: *Boophilus microplus*, oxidative stress; embryonic development; larval ageing; cell death; tick physiology.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O carrapato *Boophilus microplus*

O *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) é um ectoparasito hematófago originário da Ásia, cujo principal hospedeiro é o bovino, embora seja capaz de completar, eventualmente, o seu ciclo no búfalo, na ovelha, no cavalo e no veado (GONZALES, 1995). É um carrapato que está amplamente distribuído na América, África, Ásia e Oceania, entre os paralelos 32°N e 32°S (JOHNSTON *et al.*, 1986), sendo um dos principais parasitos que afetam a pecuária destas áreas. Assim como todos os ixodídeos, ele possui como características diagnósticas da ordem uma placa esclerotizada na superfície do corpo – o escudo quitinoso - que serve de sustentação a importantes músculos do corpo (SONENSHINE, 1991), quatro pares de patas, corpo composto de cefalotórax e abdômen e peças bucais modificadas (URQUHART *et al.*, 1998). Diferente de outras espécies de ixodídeos, espécies do gênero *Boophilus* possui olhos e os palpos são extremamente curtos, inseridos dorsal e lateralmente. Uma característica comportamental de espécies do gênero é o parasitismo monoxênico, tendo apenas um hospedeiro em todo o seu ciclo de vida (SONENSHINE, 1991).

1.2 O ciclo biológico do *B. microplus*

O ciclo biológico de *B. microplus* divide-se em uma fase de vida livre e uma fase de vida parasitária. A fase de vida livre tem início com a queda ao solo da fêmea ingurgitada (teleógina), seguida de um período de pré-postura de dois a três dias (ROCHA, 1998), postura de ovos e subsequente morte da fêmea, havendo então eclosão dos ovos e encontro das larvas eclodidas com um hospedeiro. O ingurgitamento da fêmea é bastante rápido, podendo as fêmeas ingurgitadas no final do período de infestação, com tamanho de 4-6 mm (10-30 mg de massa) atingir um rápido final de ingurgitamento à noite, chegando a 8-11 mm (150-250 mg de massa) (ROCHA, 1998). Uma fêmea pode pôr, em média, 3.000 ovos. Em condições ideais de temperatura (28°C) e umidade (85%), a postura e eclosão dos ovos ocorrem em aproximadamente 18 dias (GONZALES, 1975). Uma vez eclodidas, as larvas migram para as extremidades apicais da vegetação e ficam à espera do hospedeiro. A fase parasitária tem duração de aproximadamente 21 dias, na qual o carrapato passa pelos estágios de larva, ninfa e adulto. Quando alcançam o hospedeiro, as larvas se alojam em regiões como parte posterior da coxa, perineal, perianal e perivulvar (WAGLAND, 1978), e passam a se alimentar de linfa até chegarem à fase adulta, o que ocorre em torno de 15 dias (CASTRO & PEREIRA, 1946). Na fase adulta, ocorre a cópula e as fêmeas passam a se alimentar de sangue, até alcançarem seu ingurgitamento total e caírem ao solo. Os machos – menores que as fêmeas – permanecem no hospedeiro procurando novas fêmeas, sendo capazes de sobreviver até duas vezes mais tempo que elas (ROBERTS, 1968).

1.3 Importância econômica de *B. microplus*

B. microplus acarreta diversos danos econômicos (HORN & ARTECHE, 1985), sendo considerado o principal ectoparasito dos rebanhos de gado bovino (GEORGE, 2000). Segundo GUERRERO *et al.* (2006), ele causa perdas anuais de centenas de milhões de dólares no mundo todo. Além da espoliação ao couro causada por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato (SEIFERT *et al.*, 1968), existe ainda uma grande perda na produção de leite e carne (SUTHERST *et al.*, 1983) devido à perda de sangue do animal (2 a 3 ml de sangue/carrapato (GONZALES, 1995)). Ainda, *B. microplus* é um importante vetor de doenças, como a tristeza parasitária bovina, causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela riquetsia do gênero *Anaplasma* (McCOSKER, 1981; YOUNG & MORZARIA, 1986). Além das perdas relacionadas à bovinocultura em si, existem diversos prejuízos relacionados à mão-de-obra necessária para o controle desse parasito, despesas com instalações, compra de acaricidas e equipamentos adequados para sua aplicação, entre outros (JAMROZ *et al.*, 2000). Sendo o Brasil hoje um dos maiores produtores de carne bovina do mundo - com um rebanho bovino de aproximadamente 200 milhões de cabeças, e uma produção em torno de 8,5 milhões de toneladas de carne e 23 bilhões de litros de leite por ano (IBGE, 2006; MAPA, 2006), os custos com o controle químico podem chegar a uma ordem de 2 bilhões de dólares (FERNANDES *et al.*, 2006).

1.4 Métodos de controle de *B. microplus*

1.4.1 Controle químico

O método de controle para o *B. microplus* mais eficiente e utilizado no momento é o controle químico. Entretanto, apresenta uma série de desvantagens, como representar um risco à saúde humana através de resíduos na carne e no leite e contaminar o meio ambiente, através de resíduos deixados na água e nos solos, além de selecionar populações resistentes (DAVEY & GEORGE, 1998). O controle químico é utilizado desde a década de 1950 (PRUETT, 1999), com o uso do DDT, mas, na realidade, as propriedades inseticidas do DDT já eram conhecidas desde a década de 1930, sendo utilizado no controle de pragas agrícolas. Seu uso massivo como pesticida, porém, começou nos anos 1950, tanto para ácaros como para insetos e diferentes compostos já foram utilizados, como arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, nitroguanidinas, fenilpirazoles, formamidinas, piretróides, avermectinas, lactonas macrocíclicas e fenil-uréias. Os compostos arsenicais e organoclorados foram retirados de circulação pela FAO, embora ainda seja possível encontrar à venda alguns produtos a base de organofosforados (GOMES, 2000). Os três grupos químicos mais utilizados recentemente no controle do carrapato que se encontram disponíveis hoje no mercado são as formamidinas, os piretróides e as avermectinas. LI *et al.* (2005) mostraram recentemente que o uso de ivermectina e moxidectina não só externo, mas de forma subcutânea foi capaz de controlar uma infestação experimental de *B. microplus* em 94,8 e 91%, respectivamente.

CRAMPTON (1999), bem como diversos autores têm demonstrado que carrapatos têm apresentado crescente resistência aos compostos químicos

presentes nos carrapaticidas. Alguns grupos têm, inclusive, acompanhado parâmetros biológicos, tais como reprodução, em populações resistentes e suscetíveis a acaricidas, de forma a melhor compreender como funcionam esses mecanismos de resistência (DAVEY *et al.*, 2006; FOIL *et al.*, 2004). O *B. microplus*, em teoria, apresenta resistência mais rapidamente que outros carrapatos, provavelmente pelo menor período de tempo entre as gerações (KOCAN, 1995); ou seja, existe a necessidade de troca periódica de produtos químicos, além de um cuidado especial para utilização da dose correta do produto, pois a subdosificação é uma das causas da seleção de populações resistentes. Isto pode gerar um ciclo vicioso: por estarem sendo selecionadas populações resistentes a determinados princípios ativos, há uma necessidade de utilizar seqüencialmente acaricidas com diferentes composições; e o uso destes acaricidas com diferentes composições, muitas vezes em um curto período de tempo ou concomitantemente, acaba por selecionar populações mais resistentes ou resistentes a mais de um princípio ativo.

Uma série de compostos, como as avermectinas, que tiveram seu uso intensificado no Brasil a partir da década de 1990 (MARTINS & FURLONG, 2001), amitraz (DUCORNEZ *et al.*, 2005), organofosforados (PRUETT & POUND, 2006) e piretróides (RODRIGUEZ-VIVAS *et al.*, 2006), têm se mostrado já ineficientes contra populações isoladas de *B. microplus*. Novos acaricidas, como os inibidores de desenvolvimento fluazuron e fipronil, ainda relativamente novos no mercado, têm sido utilizados numa tentativa de evitar esta resistência causada pelo uso indiscriminado de tantos princípios químicos concomitantes (SABATINI *et al.*, 2001; GEORGE *et al.*, 2004).

1.4.2 Controle imunológico

Tendo em vista a problemática do uso de pesticidas, a possibilidade de proteger o bovino por indução de uma resposta imune através de uma vacina contra *B. microplus* tem sido testada por diferentes grupos de pesquisa, há quase três décadas (McGOWAN *et al.*, 1980; WILLADSEN & KEMP, 1988; DA SILVA VAZ Jr *et al.*, 1998; WILLADSEN, 2001). KELLY & COLLEY (1988) mostraram que anticorpos monoclonais podem auxiliar na identificação e caracterização de novos antígenos protetores, bem como propiciar um maior conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica de animais imunizados.

A resistência adquirida mediada imunologicamente (ALLEN, 1989) pode ser aferida pela redução no número de carrapatos que se fixam ao hospedeiro, pela diminuição no peso das teleóginas e pela redução da produção de ovos e, conseqüentemente, de larvas (WIKEL & BERGMAN, 1997). A observação da diminuição de peso e número de ovos forneceu bases para as futuras tentativas de utilização de vacinas no controle de ectoparasitas.

Para a produção de uma vacina comercial contra qualquer espécie de carrapato é necessário antes de tudo identificar antígenos protetores; produzir, ou purificar, então, essas proteínas como antígenos recombinantes, de forma a tornar a produção economicamente viável; e formular uma vacina com antígenos capazes de estimular uma resposta imunológica efetiva contra o carrapato (WILLADSEN, 2001). Embora as vacinas contra carrapato atualmente não tenham, em princípio, o mesmo efeito imediato dos produtos químicos usados atualmente e não protejam totalmente o animal, não se corre, com elas, o risco de

contaminação dos alimentos e do ambiente por resíduos químicos, e elas ainda podem ser espécie-específicas (PRUETT, 1999).

Conhecimentos a respeito dos mecanismos de resposta imunológica do hospedeiro e de evasão ou supressão desta resposta imune por parte do parasito são fundamentais para o desenvolvimento de vacinas. Bovinos infestados naturalmente com carrapatos desenvolvem linfócitos T e B de memória, que permitem uma resposta mais eficiente em futuras infestações (WIKEL, 1996). Foi observada a existência de bovinos com diferentes graus de resistência a *B. microplus* e um aumento da capacidade desses bovinos em desenvolver uma resposta imunológica naturalmente adquirida contra o parasito e esta foi a base para experimentos de vacinação contra *B. microplus* (WILLADSEN, 2004). ROBERTS & KERR (1976) demonstraram transferência passiva de imunidade através da transferência de soro de bovinos resistentes ao *B. microplus* para bovinos sensíveis, confirmando o envolvimento de anticorpos na resistência adquirida, apesar do limitado grau de proteção. A partir da observação de indução de uma resposta imunológica protetora, iniciou-se uma busca por antígenos com potencial protetor. Os antígenos de carrapatos foram divididos em duas categorias – a dos antígenos naturalmente expostos ao sistema imune do hospedeiro durante a fase parasitária, como proteínas presentes na saliva (FERREIRA *et al.*, 2002) e os antígenos ocultos, aqueles que não entram em contato com o hospedeiro (WILLADSEN & KEMP, 1988). Recentemente passou-se a investigar antígenos expostos, tendo como alvo moléculas envolvidas na interação parasita-hospedeiro (WILLADSEN, 2004; NUTTALL & LABUDA, 2004). Inicialmente, as pesquisas concentraram-se nos antígenos ocultos, como a Bm86, uma glicoproteína presente em intestino de *Boophilus* utilizada como antígeno nas

vacinas comerciais disponíveis hoje no mercado. A identificação desta proteína foi um marco no desenvolvimento de vacinas contra *B. microplus*. As duas vacinas comerciais que estão atualmente disponíveis são a TickGard (de origem australiana, produzida em *E. coli* pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO) e a Gavac (de origem cubana e produzida em *Pichia pastoris* pelo Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba). Estas vacinas, porém, não asseguram um grau de proteção suficiente para serem utilizadas sem o uso concomitante de acaricidas (WILLADSEN *et al.*, 1996; JONSSON *et al.*, 2000). Outros antígenos têm sido associados à Bm86 para aumentar a eficiência da resposta imune em bovinos, como a Bm91, outro antígeno oculto (RIDING *et al.*, 1994; WILLADSEN *et al.*, 1996).

Além dos antígenos descritos acima, outras proteínas também foram caracterizadas com o intuito de servirem como antígenos imunoprotetores, como o caso da glicoproteína BYC (*Boophilus* Yolk Cathepsin) (DA SILVA VAZ JR *et al.*, 1998; LOGULLO *et al.*, 1998), inibidores de tripsina (BmTIs) (ANDREOTTI *et al.*, 2002), e vitelina, a principal proteína de reserva do ovo (TELLAM *et al.*, 2002). Além disso, muitas moléculas encontradas estão envolvidas em diferentes funções fisiológicas do carrapato e são importantes para a compreensão da interação do carrapato com seu hospedeiro. Entre elas se pode citar a THAP (tick heme-binding aspartic proteinase), uma proteinase capaz de ligar-se a grupamentos heme e ter sua atividade regulada por estas moléculas (SORGINE *et al.*, 2000); a microfilina, um inibidor de trombina (CIPRANDI *et al.*, 2006); a glutathione S-transferase (GST), com função detoxificadora (HE *et al.*, 1999; ROSA DE LIMA *et al.*, 2002; Da Silva Vaz *et al.*, 2004); a VTDCE, uma cisteíno-endopeptidase degradadora de vitelina (SEIXAS *et al.*, 2003); a BmCL1, uma

cisteíno-proteinase possivelmente envolvida na degradação de hemoglobina no intestino do carrapato (RENARD *et al.*, 2000; RENARD *et al.*, 2002); a calreticulina (CRT), proteína ligadora de cálcio e ligadora de C1q, molécula de complemento plasmático (FERREIRA *et al.*, 2002b); a paramiosina (BmPRM), proteína muscular (FERREIRA *et al.*, 2002a); e a Bookase, proteína com atividade de cininase (BASTIANI *et al.*, 2002).

1.4.3 Controle biológico

Uma alternativa para evitar o emprego de compostos químicos no controle do carrapato, além do controle imunológico, é o controle biológico. Este tipo de estratégia pode ser utilizado de diversas formas: baseado nas relações ecológicas entre o carrapato e o meio onde ele se encontra e entre ele e seus predadores naturais, e na utilização de compostos naturais obtidos para utilização de seu controle.

O carrapato, como qualquer organismo, tem sua viabilidade relacionada às condições de estresse ambiental às quais estiver submetido. Assim sendo, as condições climáticas, como temperatura e umidade no campo, desempenham papel importante no equilíbrio das populações de carrapatos, diminuindo os índices de infestação nos bovinos (GONZALES, 1995). A vegetação também pode atuar como um fator limitante no crescimento da população de carrapatos. Algumas pastagens podem dificultar a sobrevivência das larvas, diminuindo a população de carrapatos por sua ação repelente ou tóxica, como é o caso das plantas do gênero *Stylosanthes* (SUTHERST *et al.*, 1982) ou ainda por imobilizarem as larvas através de suas secreções ou estruturas, como ocorre com

o capim-gordura (*Melinis minutiflora*). Uma forma alternativa de controle é o sistema de rotação de pastagens, no qual uma área fica livre de rebanho por um determinado período de tempo, de forma a impedir a sobrevivência das larvas. No entanto, esta prática não pode ser aplicada em propriedades rurais de pequeno porte (FARIAS *et al.*, 1986).

Existem ainda métodos de controle baseados em seleção de raças bovinas menos sensíveis ao carrapato e na utilização de predadores naturais para auxiliar no controle populacional de *B. microplus*. Aves como a garça vaqueira *Egretta ibis* (ALVES-BRANCO *et al.*, 1983), o "vira-bosta" (*Molotrus bonariensis*) e o quero-quero (*Vanellus chilensis*), ou formigas carnívoras (GONZALES, 1975), são exemplos de predadores naturais. Pode-se ainda recorrer à utilização de espécies parasitas, como bactérias (*Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* (BRUM, 1988), já normalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato) ou nematódeos, que têm se mostrado eficientes no controle biológico de insetos (SAMISH & GLAZER, 2001). Fungos, como o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, também têm sido estudados como ferramentas de controle de diferentes espécies de carrapato (ZHIOUA *et al.*, 1997; FRAZZON *et al.*, 2000; BASSO *et al.*, 2005).

Por último, ainda dentro do controle biológico, um método de controle que tem apresentado sucesso tem sido o uso de compostos naturais como pesticidas. Em diferentes espécies de insetos, em especial mosquitos (BOND *et al.*, 2004), um pesticida natural composto pela combinação de espinosinas A e D, duas lactonas macrocíclicas obtidas de produtos de fermentação isoladas do fungo *Saccharopolyspora spinosa* e comercialmente denominado Spinosad (HUANG *et*

al., 2004; LIU & LI, 2004) tem mostrado excelentes resultados. Foi demonstrado, em bovinos, que diferentes concentrações de Spinosad podem causar uma queda drástica no número de fêmeas ingurgitadas, na massa de ovos e no índice de fecundidade (DAVEY *et al.*, 2001). Outra lactona macrocíclica, moxidectina, usada como endectocida tem se mostrado eficientes: redução de quase 95% de infestação em bovinos banhados com ela (GUGLIELMONE *et al.*, 2000). Outras infestações experimentais mostraram um controle acima de 95% em fêmeas adultas ingurgitadas entre 7 e 28 dias após o tratamento dos bovinos com moxidectina e 74,9% no dia 35 após o tratamento (AGUILAR-TIPACAMU & RODRIGUEZ-VIVAZ, 2003).

1.5 Estresse oxidativo durante o desenvolvimento embrionário e larval: mecanismos de proteção

Todos os organismos possuem, de forma geral, uma série de mecanismos que permitem sua sobrevivência no ambiente em uma ampla faixa de temperatura, umidade, salinidade, oxigênio e radiação. Muitos destes mecanismos de proteção estão sendo caracterizados em artrópodes. A seleção de populações resistentes a drogas é, na maior parte das vezes, também baseada em uma série de mecanismos moleculares que permitem a essas populações sobreviverem à exposição a estas drogas e estes mecanismos estão, em sua grande parte, ligados à ativação de rotas metabólicas envolvidas na proteção contra estresse oxidativo. Com o rápido aumento de populações de carrapatos resistentes a diferentes drogas (DAVEY & GEORGE, 1998), torna-se

interessante estudar os mecanismos fisiológicos que levam à proteção do carrapato contra estresse oxidativo causado por produtos químicos ou pelo ambiente. Vários relatos (HEMINGWAY, 2000; KOSTAROPOULOS *et al.*, 2001) mostram a importância de mecanismos detoxificadores que, em geral, não atuam somente contra moléculas tóxicas, mas auxiliam também na manutenção da homeostase fisiológica, evitando danos advindos de radicais livres de oxigênio ou, como mais comumente são conhecidos, espécies reativas de oxigênio (ROS) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Esses mecanismos detoxificadores podem, inclusive, atuar em vias de detoxificação secundárias, evitando danos por espécies reativas de nitrogênio (RNS) (VALKO *et al.*, 2006). Em altas concentrações, ROS podem ser importantes mediadores de danos a estruturas celulares (MACKAY & BEWLEY, 1989; BARATA *et al.*, 2005). Apesar da presença de sistemas antioxidantes de defesa, muitos danos não podem ser totalmente evitados e são acumulados ao longo do ciclo de vida celular. Tem-se proposto que danos ao DNA, proteínas e lipídeos têm um papel-chave no desenvolvimento de doenças dependentes da idade em seres humanos e envelhecimento de forma geral (REBRIN *et al.*, 2004).

Os mecanismos antioxidantes podem ser de origem enzimática ou não enzimática. Os mecanismos de origem não enzimática utilizam moléculas “scavenger” como GSH (SIES, 1993), α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) (DANDAPAT *et al.*, 2003), carotenóides, tioredoxina, ácido lipóico, flavonóides naturais e outras moléculas pequenas, que se ligam facilmente a metais principalmente (McCALL & FREI, 1999). Alguns destes antioxidantes agem em ambiente hidrofílico, outros em ambiente hidrofóbico. Segundo VALKO *et al.*

(2006) um bom antioxidante deveria, em tese, ter as seguintes características: a) ligar-se especificamente a radicais livres; b) quelar metais com participação no sistema redox; c) interagir com (regenerar) outros antioxidantes dentro da rede antioxidante; d) ter um efeito positivo na expressão de genes; e) ser rapidamente absorvido; f) ter uma concentração fisiologicamente relevante em tecidos e biofluidos; g) trabalhar em domínios aquosos e/ou intermembranas.

Os mecanismos antioxidantes enzimáticos são compostos por uma série de enzimas. As mais eficientes são superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) (RIKANS & HORNBOOK, 1997), citocromos P450 (FEYEREISEN *et al.*, 1989; HEMINGWAY *et al.*, 2002) e glutathione S-transferases (GSTs) (KETTERER *et al.*, 1983). As SODs são enzimas que possuem afinidade por radicais ânion superóxido e são capazes de convertê-los inicialmente a peróxido de hidrogênio e, depois, a água (VALKO *et al.*, 2006). Dividem-se em Cu-SOD, Zn-SOD e Mn-SOD (CADENAS & DAVIES, 2000), tendo sido recentemente relatada a existência de uma outra classe distinta, Ni-SOD (BARONDEAU *et al.*, 2004). As SODs podem ser citosólicas, mitocondriais ou extracelulares (OBERLEY, 1998).

A CAT está presente em peroxissomos e promove, de forma eficiente, a conversão de peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular. A CAT tem uma das mais altas taxas de reciclagem entre todas as enzimas conhecidas: uma molécula de CAT pode converter em torno de 6 milhões de moléculas de H₂O₂ a água e oxigênio por minuto (VALKO *et al.*, 2006). As GPxs, por sua vez, são um grupo de isoenzimas Se-dependentes envolvidas na eliminação de H₂O₂. São conhecidas por adicionar 2 elétrons para reduzir peróxidos por formação de

selenóis. GPxs agem em conjunto com GSH, que está presente em altas concentrações moleculares (SIES, 1993).

Os citocromos P450 constituem uma superfamília ubíqua de enzimas que catalisam uma grande variedade de reações químicas e agem sobre diferentes substratos (FEYEREISEN *et al.*, 1989). Estão envolvidas no metabolismo tanto de compostos endógenos, como esteróides, ácidos graxos e colesterol, quanto de compostos exógenos, como drogas e pesticidas, ligando-se a eles e oxidando-os, tornando-os mais solúveis para as rotas de excreção (MARTIN *et al.*, 2003).

Por fim, as GSTs formam uma família multifuncional de enzimas, que catalisam a conjugação entre glutatona e várias moléculas, representando um dos principais grupos detoxificadores. Suas funções incluem transporte intracelular, participação em processos digestivos, síntese de prostaglandinas (SALINAS & WONG, 1999) e, principalmente, na detoxificação de substâncias tóxicas e na proteção ao estresse oxidativo (LEE *et al.*, 2002; ROSA DE LIMA *et al.*, 2002), metabolizando compostos endo e xenobióticos (AGIANIAN *et al.*, 2003). As GSTs podem ser microssômicas e citosólicas, havendo ainda um terceiro grupo, que é estruturalmente distinto dos demais e inclui enzimas que estão presentes em mitocôndrias e peroxissomos. As GSTs formam um grupo tão grande que se torna cada vez mais difícil separá-las em classes. Atualmente estão subdivididas em pelo menos 11 diferentes classes: cinco citosólicas presente em mamíferos (MANNERVIK & WIDERSTEN, 1995) - alfa, mu, pi, teta e sigma (; duas classes citosólicas presentes em várias espécies tanto de mamíferos quanto de artrópodes – ômega e zeta (BOARD *et al.*, 1997; SHEEHAN *et al.*, 2001; HAYES *et al.*, 2005); uma classe, épsilon, presente apenas em

insetos (DING *et al.*, 2003); uma classe, kapa, presente em mitocôndrias de mamíferos; e, finalmente, duas classes presentes em plantas, fi e tau (DIXON *et al.*, 2002).

Altos níveis de expressão de GST têm sido relacionados à resistência a inseticida em vários organismos (KETTERMAN *et al.*, 2001; WEI *et al.*, 2001). Em *B. microplus* a GST foi isolada de larvas (HE *et al.*, 1999) e de glândula salivar (ROSA DE LIMA *et al.*, 2002). Embora não se tenha ainda dados concretos sobre o papel das GSTs na resistência a piretróides, alguns autores apontam para um papel de seqüestro das moléculas de inseticida ou de metabolização de produtos de peroxidação de lipídios causados por inseticidas, em especial organoclorados e organofosforados (VONTAS *et al.*, 2002).

Em *B. microplus* já se têm algumas informações sobre GSTs. Uma GST clonada a partir de uma biblioteca de cDNA de glândula salivar de partenógina foi usada para expressão de GST recombinante, que apresentou atividade enzimática contra o substrato cromogênico CDNB (ROSA DE LIMA *et al.*, 2002). Ensaio de RT-PCR com tecidos de *B. microplus* indicaram que os sítios de síntese de BmGST são glândulas salivares e intestino de partenógina e teleógina (ROSA DE LIMA *et al.*, 2002). DA SILVA VAZ *et al.* (2004) demonstraram que rBmGST pode ter sua atividade inibida ou aumentada por diferentes moléculas presentes em acaricidas.

1.6 Morte celular

Morte celular está presente durante o desenvolvimento de todos os organismos multicelulares, determinando o número de células, sua proliferação, seu tipo celular específico (DANIAL & KORSMEYER, 2004; MURRAY & CRISPE, 2004). É um assunto que têm atraído muita atenção recentemente, pela grande quantidade de informação que tem sido conseguida utilizando ferramentas de biologia celular e molecular. A morte celular pode ser definida de duas formas: morte celular não-programada ou programada (LOCKSHIN & ZAKERI 2004).

1.6.1 Morte não-programada

Na morte celular não-programada, ocorre a necrose, até recentemente descrita como uma forma passiva de morte celular. Mas necrose também pode ter alguma base fisiológica, como a morte de osteócitos em osso ou durante a formação do zigoto em ovos de vertebrados (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004). É desencadeada geralmente através de insultos às células, como toxicidade ou dano físico, que levam a célula a ter uma depleção violenta de ATP, perder o controle das bombas de membrana, ter precipitação de proteínas, perder o controle de seu balanço iônico, acumular ou perder água e sofrer lise (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004). Em vertebrados, esta lise envolve muitos constituintes celulares, atraindo mastócitos e provocando uma resposta inflamatória. Conseqüentemente, a morfologia de células necróticas é variável e pobremente definida, sendo, em geral, morfológicamente caracterizada por vacuolação do citoplasma, ruptura de membrana plasmática e por indução de inflamação ao redor da célula morta (DANIAL & KORSMEYER, 2004).

1.6.2 Morte celular programada

A morte celular programada (PCD) é, de forma geral, fundamental para a manutenção da homeostase celular e é uma via extremamente conservada em organismos multicelulares. É responsável pelo ajuste do número de células em um dado órgão ou tecido, remoção de estruturas não mais necessárias, diferenciação celular e eliminação de células potencialmente perigosas (JACOBSON *et al.*, 1997). Além disso, é necessária durante a embriogênese (SHRAIMAN, 2005). PCD pode ser dividida em morte por autofagia ou morte por apoptose.

1.6.2.1 Autofagia

Até a descoberta das caspases, que caracterizam a morte apoptótica, acreditava-se que muitas células precisavam de um vacúolo lisossomal para ser destruídas. O termo “morte autofágica” foi aplicado mais tarde, quando se tornou mais clara noção de autofagossomo e lisossomo primário. Autofagia é caracterizada pela presença de múltiplos vacúolos característicos em células a serem destruídas (KERR, 2002; YIN & THUMMEL, 2005). Em músculos de larvas e glândulas salivares de insetos a massa de citoplasma é removida das células; em glândulas salivares de *Drosophila* spp ou glândulas labiais de *Manduca sexta* a formação de vacúolos autofágicos é bastante visível (LOCKSHIN & ZAKERI, 2001). Em insetos, morte celular durante a metamorfose é tipicamente autofágica. Durante a morte autofágica, organelas e partículas são capturadas em vacúolos autofágicos e lisossomos primários e secundários se expandem e colapsam a

célula (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004). A autofagia pode ocorrer concomitantemente com apoptose.

A autofagia é o maior mecanismo de regulação de *turnover* de muitas proteínas ou organelas. A via autofágica é usada para controle da proteólise em massa, e a ubiquitinação para o controle fino; é, às vezes, usada para a reciclagem de materiais durante períodos de falta de alimento ou mesmo pode ser induzida por estivação e por hormônios catabólicos. O bloqueio da autofagia leva ao acúmulo de mitocôndrias, sugerindo que estas são normalmente processadas por autofagia (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004).

1.6.2.2 Apoptose

A apoptose foi descrita primeiramente por KERR *et al.* (1972) e este termo foi usado para descrever primeiramente uma morfologia particular de morte, muito comum entre as células que morriam de forma fisiológica, mas que não era explicável pela perda de controle iônico: era caracterizada por modificações na membrana plasmática, condensação de citoplasma, condensação do núcleo e marginação da cromatina e fagocitose não acompanhada de resposta inflamatória. Hoje se sabe também que além destes sinais morfológicos ocorrem: a exteriorização de fosfatidilserina, que é um dos sinais para fagocitose (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004); a marginação da cromatina está associada à degradação do DNA nucleossômico (FRASER, 1999); e que todo cenário de morte apoptótica depende da ativação de caspases, um grupo de proteases conservadas e com papel-chave na cascata apoptótica, além de toda uma maquinaria de expressão de proteínas acessórias (SONG *et al.*, 2000;

RICHARDSON & KUMAR, 2002; DANIAL & KORSMEYER, 2004). Para que a apoptose ocorra, um grande número de moléculas é ativado, incluindo -caspases, proteases não-relacionadas à caspase e fatores de organização citoplasmática, além de moléculas de sinalização e reguladores de transcrição, entre outras. Estas moléculas e as vias nas quais estão inseridas têm sido bastante estudadas em artrópodes, em especial em *Drosophila* spp, um dos mais importantes modelos de desenvolvimento e organogênese e apoptose disponível (BAEHRECKE, 2003; SHRAIMAN, 2005). Em *Drosophila* spp, o papel da morte celular durante a embriogênese e em tecidos de adultos é bem conhecido (CHANDRASEKARAN & BECKENDORF, 2003; McCALL & PETERSON, 2004), bem como em outros insetos (LEE & BAEHRECKE, 2001; TERASHIMA *et al.*, 2000).

Duas vias de morte por apoptose estão descritas: a via extrínseca, mediada por receptores de membrana; e a via intrínseca, também chamada de via mitocondrial (HAJRA & LIU, 2004). A via extrínseca é caracterizada pela ativação de receptores de morte localizados na superfície da célula após a ligação destes aos seus ligantes específicos. A partir daí, caspases iniciadoras são ativadas e a via converge para morte celular (HAJRA & LIU, 2004). Na via intrínseca ou mitocondrial, não há necessidade de sinalização envolvendo receptores de morte: dano na mitocôndria causa a liberação de citocromo c no citoplasma, que complexa com proteínas citoplasmáticas e forma um complexo multimérico denominado apoptossoma, que levará a morte celular (BEERE, 2004).

Em carrapatos, pouca informação se tem a respeito de morte celular. Foi relatada por L'AMOREAUX *et al.* (2003) que em glândulas salivares de fêmeas

adultas de *Dermacentor variabilis* ocorre PCD, durante o período de pré-postura. Em *Boophilus microplus* até o presente momento não há nenhuma informação a respeito de morte celular, seja durante a fase adulta, a embriogênese ou o desenvolvimento larval.

2. OBJETIVOS

Este trabalho apresenta como objetivo principal a caracterização de mecanismos de controle do estresse oxidativo em embriões e larvas e da morte celular em fêmeas adultas. Apesar de serem vias metabólicas distintas, ambas fornecem informações para métodos alternativos para o controle do carrapato, de forma a auxiliar na solução contra os problemas econômicos e de contaminação do ambiente gerados pelo método de controle químico, o mais empregado atualmente.

2.1 Objetivos Gerais

- Caracterizar a relação de GST e outros antioxidantes com estresse oxidativo durante a embriogênese e fase larval de *B. microplus*.
- Evidenciar a ocorrência de morte celular em fêmeas adultas de *B. microplus* durante o período de pré-postura.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a atividade enzimática de GST em ovos e larvas com diferentes dias de desenvolvimento;
- Correlacionar a atividade enzimática de GST com outros indicadores de estresse oxidativo, como atividade de CAT, conteúdo de GSH e peroxidação de lipídeos;

- Determinar a fragmentação de DNA e morte celular em glândulas salivares, ovário e singânglio de fêmeas adultas de *B. microplus* durante o período de pré-postura após a remoção das mesmas do bovino;
- Análise de fragmentação de DNA nuclear, por teste de TUNEL, de glândula salivar, ovário e singânglio de fêmeas adultas de *B. microplus* durante o período de pré-postura;
- Analisar morte celular por apoptose através da determinação de uma via apoptóticas clássicas.

3. CAPÍTULO I

MECANISMOS DE PROTEÇÃO A ESTRESSE OXIDATIVO EM *B. microplus*

Neste capítulo serão discutidos mecanismos utilizados pelo carrapato durante a embriogênese e a fase de vida larval para controlar o estresse oxidativo. O foco principal do trabalho é o papel da GST durante o desenvolvimento embrionário e a senescência larval, correlacionando-a com diferentes indicadores de estresse oxidativo.

Artigo publicado no periódico *Comparative Biochemistry and Physiology part A*. (disponível on line: [doi:10.1016/j.cbpa.2006.04.032](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.04.032))

Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus*

Daniela R. J. de Freitas, Renato M. Rosa, Jorge Moraes, Eldo Campos, Carlos Logullo, Itabajara da Silva Vaz Jr, Aoi Masuda

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A xx (2006) xxx–xxx

CBP

www.elsevier.com/locate/cbpa

Relationship between glutathione *S*-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae)[☆]

D.R.J. Freitas ^a, R.M. Rosa ^b, J. Moraes ^c, E. Campos ^e, C. Logullo ^e,
I. Da Silva Vaz Jr. ^{a,c}, A. Masuda ^{a,d,*}

^a Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C. P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C. P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C. P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^d Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C. P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^e Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, CBB, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Av. Alberto Lamego 2000, Horto, CEP 28015-620, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

Received 14 February 2006; received in revised form 20 April 2006; accepted 28 April 2006

Abstract

Glutathione *S*-transferases (GSTs) are enzymes that act in excretion of physiologic and xenobiotic substances, protecting cells against chemical toxicity and stress. In this work, we characterized the enzymatic activity of GST in eggs and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*, on different days after oviposition and eclosion. The results showed that the GST activity varied depending on the time elapsed after oviposition and eclosion. Molecules involved in mechanism of protection from oxidative stress are correlated with the increase in GST activity. The oxygen consumption kinetics showed a positive correlation with the increase in GST activity during embryogenesis. A high content of thiobarbituric acid reactive substances were observed in egg and larva extracts, indicating that ticks face high oxidative stress during embryogenesis and aging. In eggs and larvae, GST activity can be correlated to kinetic parameters of oxidative stress such as catalase and glutathione. In addition, GST activity showed strong positive correlation with lipid peroxidation, an indication that it plays a role in oxidant defences in eggs.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Boophilus microplus*; Embryonic development; Catalase; Glutathione *S*-transferases; Larval aging; Lipid peroxidation; Oxidative stress; Total glutathione

1. Introduction

Ticks (Arachnida) are blood-sucking arthropods that infest a wide array of species (Sauer et al., 1995), including humans and almost every animal of economic importance, and cause significant losses to livestock production (Bowman et al., 1996). The tick *Boophilus microplus* is one of the most important cattle ectoparasites, and causes great economic losses due to the diseases it transmits, along with bovine weight loss and the related high control costs (Jamroz et al., 2000). Studies about ecology, behaviour and physiology of ticks afford a better understanding of these organisms and therefore become important tools to develop new control methods. Due to the

[☆] This paper is part of a special issue of CBP dedicated to “The Face of Latin American Comparative Biochemistry and Physiology” organized by Marcelo Hermes-Lima (Brazil) and co-edited by Carlos Navas (Brazil), Rene Beleboni (Brazil), Tania Zenteno-Savín (Mexico) and the editors of CBP. This issue is in honour of Cicero Lima and the late Peter W. Hochachka, teacher, friend and devoted supporter of Latin American science.

* Corresponding author. Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul–UFRGS, C. P. 15005–Campus do Vale, 91501-970 Porto Alegre RS, Brazil. Tel.: +55 51 33166078; fax: +55 51 33167309.

E-mail address: aoi@cbiot.ufrgs.br (A. Masuda).

rapid increase in pesticide-resistant tick populations (Davey and George, 1998), the study of tick physiology has gained increasing importance as regards the mechanisms involved in detoxification of toxins (Hemingway, 2000; Kostaropoulos et al., 2001). These mechanisms, in general, not only act against specific toxic molecules, but also help in the maintenance of physiologic homeostasis, avoiding oxidative damage generated by reactive oxygen species (ROS). There are two antioxidant systems: non-enzymatic and enzymatic systems. The non-enzymatic antioxidant system use scavenger molecules as GSH (Sies, 1999), α -tocopherol (vitamin E) and ascorbic acid (vitamin C) (Dandapat et al., 2003), apart from other smaller molecules; the enzymatic antioxidant system is represented by enzymes such as SOD (superoxide dismutase), CAT (catalase), GPx (glutathione peroxidase) (Rikans and Hornbrook, 1997), and GSTs (glutathione *S*-transferases) (Ketterer et al., 1983).

Glutathione *S*-transferases form a group of ubiquitous enzymes that catalyze the conjugation between glutathione and several molecules, and play the most important role in the cellular detoxification mechanism of xenobiotic and endogenous compounds (Agianian et al., 2003). There are at least two ubiquitously distributed groups of GSTs, microsomal and cytosolic. A third group of GSTs, structurally distinct from the microsomal and cytosolic GSTs, form the Kappa class and were described in mammalian mitochondria and peroxisomes (Morel et al., 2004; Robinson et al., 2004). This superfamily is subdivided into several classes, such as the five cytosolic mammalian classes Alpha, Mu, Pi, Theta and Sigma (Widersten and Mannervik, 1995); some cytosolic classes of GSTs, such as the Omega (Sheehan et al., 2001) and Zeta (Board et al., 1997) classes are represented in a wide range of species, including mammals (Hayes et al., 2005) In rodents and humans, cytosolic GST isoenzymes within a class typically share >40% identity, and those between classes share <25% identity (Hayes et al., 2005). The Epsilon class is present in insects (Ding et al., 2003), and the Phi and Tau classes are present in plants (Dixon et al., 2002).

The chemical exposure of insects is a classical event that selects pesticide resistance, and has been related with a high GST activity (Ketterman et al., 2001; Wei et al., 2001). It has been suggested that the pesticide may conjugate to glutathione by GST and that the compound obtained may therefore act as a detoxification mechanism in arthropods (Beall et al., 1992; Wei et al., 2001). GSTs also perform other physiological roles such as sequestration and transport of endogenous hydrophobic compounds, which include hormones, steroids, heme, bilirubin, bile acids and their metabolites (Salinas and Wong, 1999). The characterization and molecular cloning of GST of *B. microplus* from larvae (He et al., 1999) and from partially engorged female salivary glands have been reported (Rosa de Lima et al., 2002). In our work we identified a relationship between GST and physiologic stress by measuring the oxygen consumption and lipid peroxidation in eggs and larvae, through the analysis of GSTs enzymatic activity. The data obtained were compared with levels of others known antioxidants, CAT and GSH. Based on the correlation between GST activity and oxidative stress

during larva senescence and starvation, we proposed the involvement of GST in oxidative stress protection.

2. Materials and methods

2.1. Ticks

Fully engorged females of *Boophilus microplus* (Acarina, Ixodidae) (Porto Alegre isolate) were experimentally maintained in the laboratory at 28 °C and 85% relative humidity, and their parasitic life completed in calves housed in individual pens on slatted floors.

2.2. Eggs and larvae

Eggs and larvae were collected every 5 days up to the 20th day of oviposition and egg eclosion, respectively. The materials were stored at -70 °C or in liquid nitrogen.

2.3. Extract preparation

Egg and larva extracts (100 mg/mL buffer) were macerated in 100 mM Tris-HCl 5 mM EDTA buffer pH 8.0, centrifuged at 15,000×*g* for 5 min. Next, the supernatants were strained through a 0.45- μ m pore size filter to remove fat present in the supernatant after centrifugation. The extracts obtained were incubated in ice bath and then immediately tested for the determination of the enzymatic activity with a specific substrate for GST, or for the determination of catalase activity, lipid peroxidation or GSH content.

2.4. Biochemical analysis

The GST activity of the extracts was measured as described by Habig et al. (1974) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (Sigma) as substrate. About 90 μ L of the reaction mixture, consisting of 50 mM CDNB in methanol, 5 mM glutathione in 100 mM Tris-HCl pH 7.5, and 10 μ L of extract in 100 mM Tris-HCl pH 7.5 were tested in a 96-well plate, according to Da Silva Vaz et al. (2004). Buffer without enzyme was used as negative control. The concentration of the product formed was calculated using the extinction coefficient of 9.6 mM⁻¹ cm⁻¹ for *S*-(2,4-dinitrophenyl glutathione) (Widersten and Mannervik, 1995). The protein concentrations of extracts were measured using the Bradford method (Bradford, 1976) with bovine serum albumin as standard. Each assay was run in duplicate and the results were expressed as the calculated mean and standard deviation of three separate experiments.

Oxygen consumption units were assayed using a Clark-type electrode (YSY, model 5775, Yellow Springs, OH, USA), calibrated to 100% with air-saturated buffer at 28 °C, according to Logullo et al. (2002). Reactions were carried out with 200 mg of eggs or larvae in 2 mL of 20 mM PBS buffer pH 7.4, 0.1 mM EDTA, for 60 min. 1 mM KCN was added to inhibit respiration in control samples. Eggs and larvae at 1, 5, 10, 15 and 20 days of age were tested. Assays were carried out in three independent experiments, each in duplicate.

The TBARS (thiobarbituric acid reactive species) assay was used as an index of lipid peroxidation in egg and larva extracts based on the formation of lipid peroxidation products during an acid-heating reaction as previously described by Draper and Hadley (1990). Briefly, the egg and larva extracts prepared were mixed with trichloroacetic acid 10% (v/v), 1 mM butylated hydroxytoluene (BHT), and thiobarbituric acid 0.67% (v/v), and then heated in a boiling water bath for 15 min. TBARS were determined by absorbance at 535 nm and expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (nmol/mg protein). Assays were carried out in three independent experiments, each in duplicate.

The catalase (CAT) activity assay was determined in egg and larva extracts as described by Aebi (1984). Briefly, 20 μ L of egg or larva extracts were added to 80 μ L of 10 mM Tris–HCl pH 8.0 and 900 μ L of 9 mM H₂O₂, to a final volume of 1 mL. CAT activity was determined spectrophotometrically by monitoring the disappearance of H₂O₂ at 240 nm, using the extinction coefficient of 43.6 M⁻¹ cm⁻¹ (Aebi, 1984). The results were expressed as U/mg protein. Assays were carried out in three independent experiments, each in duplicate.

The CAT activity in egg and larva extracts was inhibited using aminotriazole, a specific inhibitor of catalase, adapting the method described by Wagner et al. (2005). Briefly, the egg and larva extracts incubated for 30 min with 3-aminotriazole (Sigma), at different concentrations. The catalase activity was based on H₂O₂ degradation, using its extinction molar coefficient, 43.6 M⁻¹ cm⁻¹. The results were expressed as U/mg protein. Assays were carried out in three independent experiments, each in duplicate.

The glutathione (GSH) determination was carried out as described by Akerboom and Sies (1981). Briefly, an equal volume of 2 M HClO₄, 4 mM EDTA solution was added to egg and larva extracts, and the precipitated proteins were separated by centrifugation for 5 min at 5000 \times g. The supernatant was neutralized with 2 M KOH in 0.3 M Mops solution in water, centrifuged and assayed. Total glutathione – the sum of reduced glutathione and oxidized glutathione (GSH and GSSG) was determined in the supernatant by a kinetic assay. In the assay, catalytic amounts of GSH and glutathione reductase caused a continuous reduction in 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (NADPH). The DTNB reduction rate was measured spectrophotometrically at 412 nm. Total glutathione was expressed as μ mol/mg protein. Assays were carried out in three independent experiments, each in duplicate.

2.5. Statistical analysis

All data values were expressed as mean \pm S.D. The ANOVA was used to determine significant differences between groups when data were normally distributed. The *t*-tests were used when comparing data between two groups. Significance was set at *p*<0.05. Regression analyses were also performed to compare the changes of various parameters tested for embryonic development and larval aging (Swin-scow, 1996).

3. Results

3.1. Specific enzymatic activity

A gradual increase in GST activity was observed during embryo development. The highest GST activity was found on day 20 after oviposition (0.19 μ mol/min/mg protein). GST activity 1 day after egg eclosion decreased significantly and remained approximately so until day 5. On day 10 an increased level was observed and the highest activity in larva was found on day 20 after eclosion (0.24 μ mol/min/mg protein) (Fig. 1). GST activity took place exclusively in embryo and larva tissues, since no activity remained in egg shells (data not shown).

3.2. Oxygen consumption

To test the relationship between GST activity and oxidative stress, we determined oxygen consumption (Fig. 2) in egg and larva extracts at the same time point used for GST enzymatic activity determination.

In eggs, oxygen consumption increased according to the time elapsed after oviposition. A gradual increase was observed in eggs upon day 20, when the highest level was observed (23.18 μ mol O₂/min mg egg). In contrast, oxygen consumption in larvae was high on day 1 after egg eclosion (18.33 μ mol O₂/min mg larva) and decreased significantly until the last day tested, in particular in 15- and 20-day-old larvae (8.4 μ mol O₂/min mg larva and 10.2 μ mol O₂/min mg larva).

3.3. Catalase activity and inhibition assays

CAT activity was measured in egg and larva extracts at the same time point used for GST enzymatic activity determination (Fig. 3). In 1–5- and 10-day old eggs CAT activity remained at a lower level when compared to 15- and 20-day-old eggs (0.78 U/mg protein and 1.49 U/mg protein, respectively). CAT activity was significantly lower in 1-day-old larvae (0.642 U/mg protein) than in 20-day-old eggs, but remained at higher level on all days after eclosion as compared to 1- to 10-day-old eggs

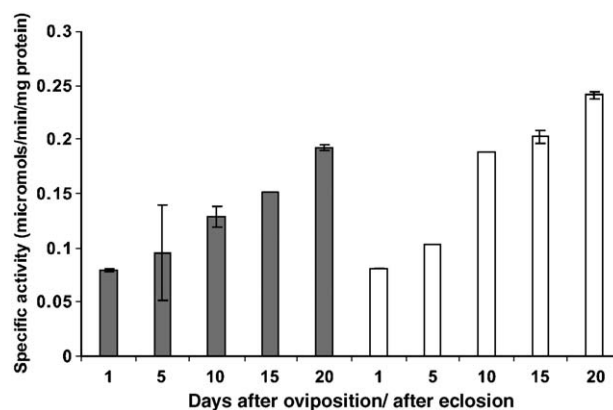


Fig. 1. Enzymatic activity of GST in eggs and larvae of *B. microplus*. Specific enzymatic GST activity in eggs and larvae on different days after oviposition/eclosion. In grey bars, eggs; in white bars, larvae. The results represent mean \pm S. D. of three independent experiments, in duplicates.

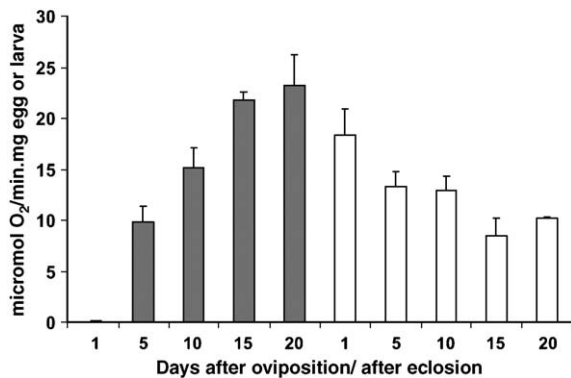


Fig. 2. Oxygen consumption in eggs and larvae. Oxygen consumption was monitored using a Clark-type oxygen electrode. Three assays of 200 mg of eggs or larvae were made in cuvettes containing 2 mL of 20 mM PBS, pH 7.4, 0.1 mM EDTA. In grey bars, eggs; in white bars, larvae. The results represent mean \pm S.D. of three independent experiments, in duplicates.

(Fig. 3A). The specificity of CAT activity to degrade H₂O₂ in egg and larva extracts was confirmed by inhibition of the activity by aminotriazole at several concentrations, a compound that is a specific catalase inhibitor (Fig. 3B).

3.4. Glutathione determination

The levels of GSH in eggs increased significantly during embryo development. The highest GST activity was observed in 20-day-old eggs (92.23 μ mol/mg protein). A decrease in GSH levels was observed in 1-day-old larvae (2.33 μ mol/mg protein) when compared to the days before egg eclosion. Until day 5 after eclosion, GSH concentration was low and gradually increased thereafter until day 20 (Fig. 4).

3.5. Lipid peroxidation

A significant increase in lipid peroxidation in 20-day-old eggs (3.50 nmol MDA/mg protein) was observed when compared to 1-day-old eggs (2.86 nmol MDA/mg protein). In 1-day-old larvae (3.33 nmol MDA/mg protein) and 5-day-old larvae (2.82 nmol MDA/mg protein) the lipid peroxidation was maintained at the same level as in 20-day-old eggs, but decreased significantly in 10-day-old larvae (2.05 nmol MDA/mg protein). Afterwards, a significant increase was observed in 15- and 20-day-old larvae (2.32 and 2.74 nmol MDA/mg protein) in comparison to 10-day-old larvae, but the concentration of MDA produced in 15- and 20-day-old larvae was significantly lower than that observed for 1- and 5-day-old larvae (Fig. 5).

3.6. Correlation between GST activity and other biological parameters

A correlation between GST activity and other biological parameters involved in oxidative stress was established to evaluate the GST role in physiologic oxidative stress. The kinetics of GST activity in eggs and larvae was compared with oxygen consumption, CAT activity and GSH content in its

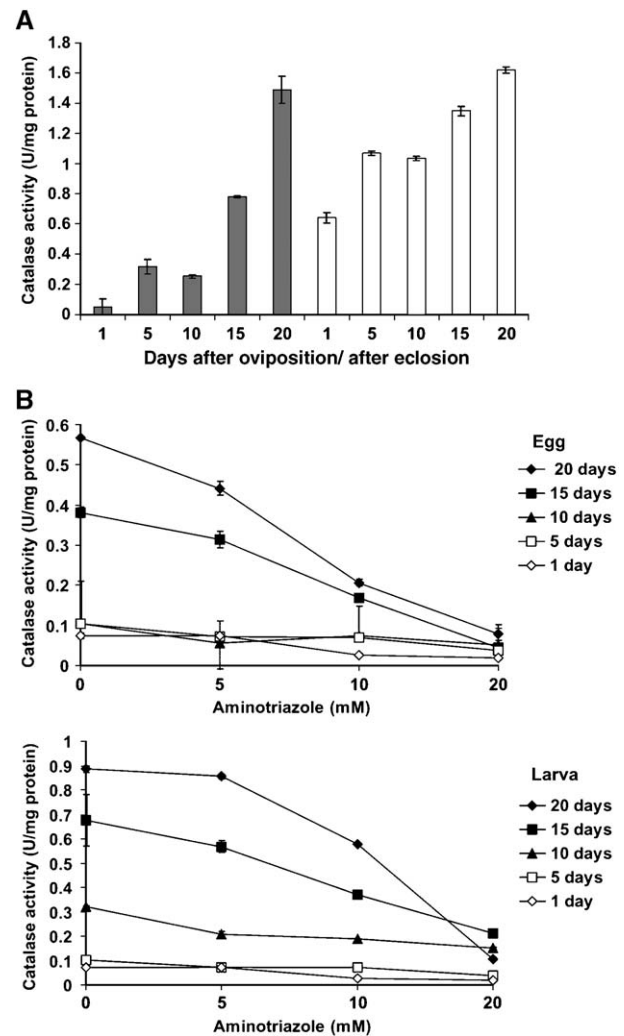


Fig. 3. Catalase activity and inhibition assays. (A) Catalase activity in egg and larva extracts of *B. microplus* in different days. In grey bars, eggs; in white bars, larvae. The results represent mean \pm S.D. of three independent experiments, in duplicates (B) Catalase inhibition in egg (upper) and larva (lower) extracts of *B. microplus* on different days, using different concentrations of 3-aminotriazole (Sigma). The catalase activity was based on H₂O₂ degradation, using its extinction molar coefficient, 43.6 M⁻¹ cm⁻¹. The results represent mean \pm S.D. of three independent experiments, in duplicates.

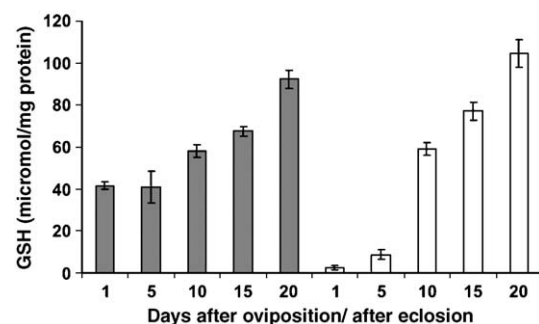


Fig. 4. Determination of total GSH content in egg and larva extracts of *B. microplus*. The GSH content was expressed as μ mol/mg protein. In grey bars, eggs; in white bars, larvae. The results represent mean \pm S.D. of three independent experiments, in duplicates.

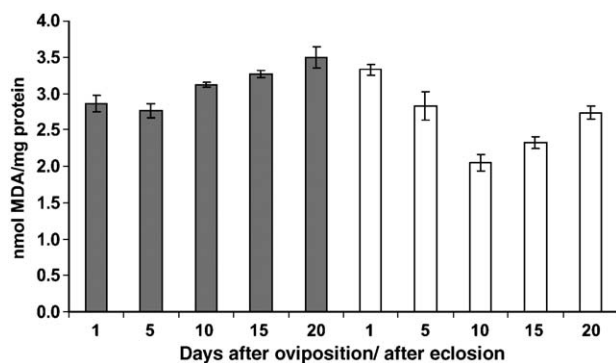


Fig. 5. Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in eggs and larvae of *B. microplus* on different days. In grey bars, eggs; in white bars, larvae. The results represent mean \pm S.D. of three independent experiments, in duplicates.

respective life stages. A positive correlation was observed between GST activity and O_2 consumption in embryos ($r=0.930$), and a negative correlation in larvae ($r=-0.832$). There were positive correlations between kinetics of CAT and GST activities in eggs ($r=0.941$) and larvae ($r=0.879$). Also, positive correlations were found between GST activity and GSH content for eggs ($r=0.985$) and larvae ($r=0.993$). The correlation between kinetics of GST activity and lipid peroxidation in eggs was positive ($r=0.944$), whereas in larvae the correlation was negative ($r=-0.703$).

4. Discussion

GSTs are present in almost all eukaryotes and in most of them this happens in multiple isoenzymic forms, constituting a significant intracellular mechanism of detoxification (Papadopoulos et al., 2004). Detoxification is reached through transport and subsequent excretion of toxic organic compounds. Other functions, not associated with detoxification, include repair of macromolecules oxidized by reactive oxygen species, regeneration of *S*-thiolated proteins, and biosynthesis of physiologically important metabolites (Armstrong, 1997; Sheehan et al., 2001).

In order to understand the role of GST in the tick development, we analyzed its physiological variation during the life stages of eggs and larvae.

The enzymatic GST activity had a significant increase during embryonic development (Fig. 1). The O_2 consumption increases progressively and reached its peak when the embryo is about to hatch (Fig. 2). This increase can be explained by the increased metabolism during the embryonic development in *B. microplus*. We observed strong correlation between O_2 consumption and GST activity.

The enzymatic GST activity increased during the senescence of larvae (Fig. 1). By analyzing the kinetics of GST activity and O_2 consumption during larva aging a strong negative correlation was observed. This decrease in O_2 consumption can be explained by the observation that the larva keeps a high metabolic activity only during the first 5 days after hatching, in order to mature and thus acquire the ability to infest a host. The

optimum period for the Porto Alegre *B. microplus* isolate to infest the bovine is approximately between the 5th and the 7th day post-eclosion (Da Silva Vaz, personal communication). Ogunji and Dipeolu (1977) showed the feeding of larval stages of *Amblyomma variegatum*, *Hyalomma rufipes* and *Boophilus decoloratus* in sheep to be more effective when larvae were fed within 1–4 days of hatching. Also, similar observations were described for other ixodid ticks (Sonenshine, 1991). After this time, the metabolic activity of *B. microplus* larvae decreased because the larva is senescent; however, GST activity remains high, since this enzyme is important to protect against oxidative stress to which the larva is submitted, as shown by the equally high CAT activity and GSH content (Figs. 3 and 4).

One of the consequences of elevated O_2 in the cellular environment is the elevation of ROS levels that could cause oxidative damage, such as nuclear DNA and protein breakdown, as well as lipid peroxidation (Mackay and Bewley, 1989; Barata et al., 2005). The antioxidants CAT and GSH tested presented a positive correlation with GST activity in eggs and in larvae. In fact, a high content of thiobarbituric acid reactive substances was observed in egg and larva extracts, indicating that ticks face high oxidative stress during embryogenesis and aging (Fig. 5). It is possible that the high level of lipid peroxidation verified during embryonic development occurs due to a high concentration of lipids, which are used by the egg as energy source (Logullo et al., 2002; Atella et al., 2005). Since the kinetic parameters of GST and catalase as well as GSH content during embryo development were modulated during different stages, and taking into account the fact that these parameters presented a positive correlation with lipid peroxidation, it is possible to suggest a role of GST in oxidative stress process.

The decreased oxygen consumption during larval aging may be related to metabolic depression and starvation. Phillips et al. (1995) showed that the metabolic rates of *Ornithodoros turicata* adults and larvae were affected by starvation and that oxygen consumption was lower than fed ticks. Some animals maximize their survival time using metabolic depression in response to low concentrations of oxygen available, as a common strategy through which they reduce their metabolism (Lutz and Storey, 1997; Hochachka and Lutz, 2001). Several authors have reported that the level of endogenous antioxidant defences is increased in several species during metabolic depression as a means to protect against oxidative stress. Oliveira et al. (2005) reported an increase in GST activity in gills of *Chasmagnathus granulata* during a metabolic depression induced by anoxia. At low temperatures, the larvae of *B. microplus* (Davey and Cooksey, 1989) and of other ticks (Labruna et al., 2003; Estrada-Pena et al., 2004) reduced their metabolism and managed to survive for long periods without feeding. These data are in accordance with the experiments conducted by Papadopoulos et al. (2004), which demonstrated that adult bees kept at low temperatures and starvation had GST activity increased, suggesting that *B. microplus* larvae decrease metabolism and increase GST activity in order to survive longer in the environment, until a host is found.

The results of this work help to elucidate the role of GST in tick development and assist in the understanding of the importance of GST in the excretion of toxic compounds.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq, PRONEX and FAPERGS.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Agianian, B., Tucker, P.A., Schouten, A., Leonard, K., Bullard, B., Gros, P., 2003. Structure of a *Drosophila* sigma class glutathione *S*-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *J. Mol. Biol.* 326, 151–165.
- Akerboom, T.P., Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373–382.
- Armstrong, R.N., 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione *S*-transferase. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 2–18.
- Atella, G.C., Gondim, K.C., Machado, E.A., Medeiros, M.N., Silva-Neto, M.A., Masuda, H., 2005. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 77, 405–430.
- Barata, C., Lekumberri, I., Vila-Escale, M., Prat, N., Porte, C., 2005. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the trichoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat River Basin (NE Spain). *Aquat. Toxicol.* 74, 3–19.
- Beall, C., Fyrberg, C., Song, S., Fyrberg, E., 1992. Isolation of a *Drosophila* gene encoding glutathione *S*-transferase. *Biochem. Genet.* 30, 515–527.
- Board, P.G., Baker, R.T., Chelvanayagam, G., Jermin, L.S., 1997. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.* 328, 929–935.
- Bowman, A.S., Dillwith, J.W., Sauer, J.R., 1996. Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance. *Parasitol. Today* 12, 388–396.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Dandapat, J., Chainy, G.B., Rao, K.J., 2003. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 135, 221–233.
- Da Silva Vaz Jr, I., Torino Lermen, T., Michelon, A., Ferreira, C.A.S., Freitas, D.R.J., Termignoni, C., Masuda, A., 2004. Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione *S*-transferase. *Vet. Parasitol.* 119, 237–245.
- Davey, R.B., Cooksey, L.M., 1989. Effects of prolonged exposure at low temperature on *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 26, 407–410.
- Davey, R.B., George, J.E., 1998. *In vitro* and *in vivo* evaluations of a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) selected for resistance to permethrin. *J. Med. Entomol.* 35, 1013–1019.
- Ding, Y., Ortelli, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J., Ranson, H., 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics* 4, 35.
- Dixon, D.P., Laphorn, A., Edwards, R., 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* 3 (REVIEWS3004).
- Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421–431.
- Estrada-Pena, A., Martinez, J.M., Sanchez Acedo, C., Quilez, J., Del Cacho, E., 2004. Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). *Med. Vet. Entomol.* 18, 387–397.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione *S*-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88.
- He, H., Chen, A.C., Davey, R.B., Ivie, G.W., George, J.E., 1999. Characterization and molecular cloning of a glutathione *S*-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 737–743.
- Hemingway, J., 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 1009–1015.
- Hochachka, P.W., Lutz, P.L., 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 130, 435–459.
- Jamroz, R.C., Guerrero, F.D., Pruett, J.H., Oehler, D.D., Miller, R.J., 2000. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *J. Insect Physiol.* 46, 685–695.
- Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D.J., 1983. The role of glutathione in detoxification. *Environ. Health Perspect.* 49, 59–69.
- Ketterman, A.J., Prommeenate, P., Boonchaay, C., Chanama, U., Leetachewa, S., Promtet, N., Prapanthadara, L., 2001. Single amino acid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione *S*-transferases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 65–74.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2001. Glutathione *S*-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 313–319.
- Labruna, M.B., Amaku, M., Metzner, J.Á., Pinter, A., Ferreira, F., 2003. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. *J. Med. Entomol.* 40, 170–178.
- Logullo, C., Moraes, J., Dansa-Petretski, M., Vaz, I.S., Masuda, A., Sorgine, M. H., Braz, G.R., Masuda, H., Oliveira, P.L., 2002. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1805–1811.
- Lutz, P.L., Storey, K., 1997. Strategies for dealing with variations in gas tensions — vertebrates and invertebrates. In: Dantzler, W. (Ed.), *Handbook of Physiology, Section 13, Comparative Physiology*. American Physiology Society. Oxford University Press, pp. 1479–1522.
- Mackay, W.J., Bewley, G.C., 1989. The genetics of catalase in *Drosophila melanogaster*: isolation and characterization of acatalasemic mutants. *Genetics* 122, 643–652.
- Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Theret, N., Coles, B., Guillouzo, A., 2004. Gene and protein characterization of the human glutathione *S*-transferase Kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J. Biol. Chem.* 279, 16246–16253.
- Ogunji, F.O., Dipeolu, O.O., 1977. On the use of the scrotum for feeding larval ixodid ticks on hosts. *Z. Parasitenkd.* 51, 285–288.
- Oliveira, U.O., Da Rosa Araujo, A.S., Bello-Klein, A., Da Silva, R.S., Kucharski, L.C., 2005. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 140, 51–57.
- Papadopoulos, A.I., Polemitou, I., Laifi, P., Yiangou, A., Tananaki, C., 2004. Glutathione *S*-transferase in the insect *Apis mellifera* macedonica kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. *Comp. Biochem. Physiol. C* 139, 93–97.
- Phillips, J.S., Adeyeye, O., Bruni, D., 1995. Respiratory metabolism of the soft tick, *Ornithodoros turicata* (Duges). *Exp. Appl. Acarol.* 19, 103–115.
- Rikans, L.E., Hornbrook, K.R., 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1362, 116–127.
- Robinson, A., Huttley, G.A., Booth, H.S., Board, P.G., 2004. Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. *Biochem. J.* 379, 541–552.
- Rosa de Lima, M.F., Ferreira, C.A.S., Freitas, D.R.J., Valenzuela, J.G., Masuda, A., 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione *S*-transferase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 747–754.
- Salinas, A.E., Wong, M.G., 1999. Glutathione *S*-transferases — a review. *Curr. Med. Chem.* 6, 279–309.

- Sauer, J.R., McSwain, J.L., Bowman, A.S., Essenberg, R.C., 1995. Tick salivary gland physiology. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 245–267.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferase: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.
- Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 916–921.
- Sonenshine, D.E., 1991. 1st ed. *Biology of Ticks*, vol. 1. Oxford University Press, New York.
- Swinscow, T.D.V., 1996. *Statistics at Square One*, 9th ed. BMJ Books, London. Revised by MJ Campbell.
- Wagner, B.A., Evig, C.B., Reszka, K.J., Buettner, G.R., Burns, C.P., 2005. Doxorubicin increases intracellular hydrogen peroxide in PC3 prostate cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 440, 181–190.
- Wei, S.H., Clark, A.G., Syvanen, M., 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione *S*-transferase (MdGST-6A) from a hyperinsecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 1145–1153.
- Widersten, M., Mannervik, B., 1995. Glutathione transferases with novel active sites isolated by phage display from a library of random mutants. *J. Mol. Biol.* 250, 115–122.

3.1 DISCUSSÃO

Muitos fatores podem induzir estresse oxidativo (WINSTON *et al.*, 1991). Mecanismos de estresse oxidativo são diretamente correlacionados com a produção de ROS, que podem ocorrer em resposta a fatores abióticos encontrados no ambiente em que os organismos vivem e a fatores endógenos de cada organismo (TIMOFEYEV, 2006). A oxidação produzida por radicais livres causa dano em polímeros importantes (ácidos nucleicos e proteínas) e aumenta a peroxidação de lipídeos, o que leva a uma série de falhas nas funções celulares.

Uma série de adaptações morfológicas e fisiológicas permite ao carrapato um sucesso adaptativo e o torna um problema importante na pecuária, difícil de controlar pelos criadores de gado. Entre as adaptações que permitem ao carrapato sobreviver no ambiente, as mais importantes após a queda do carrapato são aquelas que estão ligadas à resistência dos ovos e larvas no ambiente em diferentes condições. Entre as adaptações que permitem que ovos permaneçam férteis estão barreiras físicas – como uma casca de quitina pouco permeável, o que evita que haja troca de substâncias com o meio – e barreiras fisiológicas, como o uso de moléculas de heme para evitar dano oxidativo (ATELLA *et al.*, 2005) e sistemas enzimático e não enzimático de metabolismo e excreção de componentes tóxicos para o embrião (ARUN & SUBRAMANIAN, 1998). Fatores ambientais e endógenos que possam gerar algum dano oxidativo ao embrião são neutralizados por estas barreiras fisiológicas.

O consumo de O₂ é um bom parâmetro para a caracterização de metabolismo, e em artrópodes é muito usado como uma referência para estudos da influência de fatores ambientais durante seu desenvolvimento e fisiologia

(CAMPOS *et al.*, 2006). Ambientes em situações de hipoxia, anoxia ou com saturação de oxigênio podem aumentar a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes (LUTZ & STOREY, 1997). No presente trabalho, foi observado que o consumo de O₂ em ovos de 1 a 20 dias aumenta de acordo com o desenvolvimento do embrião. Juntamente com o aumento do consumo de O₂, as enzimas antioxidantes testadas, GST e CAT – bem como GSH, molécula do sistema não-enzimático – tiveram seus níveis aumentados. A atividade de GST apresentou correlação positiva com a atividade de CAT e os níveis de GSH. TIMOFEYEV (2006) mostrou em anfípodos que altas concentrações de O₂ e radiação UV podem aumentar a atividade de CAT, GPx e GST. Foi demonstrado por ACETO *et al.* (1994) que enzimas como CAT, GPx e GST são fundamentais como antioxidantes no desenvolvimento embrionário de peixe, *Salmo iridaeus*. Em artrópodes foi visto um comportamento similar, com o aumento de atividade antioxidante durante o desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium malcomsonii* (ARUN & SUBRAMANIAN, 1998); moléculas anti-oxidantes como GSH, no entanto, não foram avaliadas neste trabalho, embora os autores ressaltem que seria interessante para medir o *status redox* da célula. No presente trabalho, o aumento nos níveis de GSH observado em ovos de 1 a 20 dias pode sugerir um aumento no *status redox* em ovos de carrapato, que serve para contrabalançar a peroxidação de lipídeos, provavelmente causada pelo aumento do consumo de O₂ (MACKAY & BEWLEY, 1989; BARATA *et al.*, 2005). Um alto conteúdo de produtos de peroxidação de lipídeos foi detectado, indicando um nível elevado de estresse oxidativo durante a embriogênese. É possível que o nível de peroxidação de lipídeos verificado durante o desenvolvimento embrionário ocorra devido a uma alta concentração de lipídeos que é usada no

ovo como fonte de energia (LOGULLO *et al.*, 2002; ATELLA *et al.*, 2005). CAMPOS *et al.* (2006) mostraram um alto conteúdo de lipídeos do primeiro ao quinto dia do desenvolvimento embrionário de *B. microplus*, durante a celularização; estes resultados podem explicar o alto nível de produtos de peroxidação de lipídeos visto em ovos de 1 e 5 dias neste trabalho. A partir do sétimo dia, porém, CAMPOS *et al.* (2006) relatam uma queda no conteúdo total de lipídeos. Neste trabalho, no entanto, é observado um aumento na peroxidação de lipídeos a partir do décimo dia. Isto pode significar que, embora a quantidade total de lipídeos disponível nos ovos esteja menor, ela está sofrendo um dano oxidativo maior que, em última análise, está induzindo um aumento de antioxidantes disponíveis.

Em larvas, as atividades de GST e CAT aumentam de acordo com seu tempo de vida. O conteúdo de GSH também aumenta de acordo com o desenvolvimento das larvas. Portanto, GST apresenta correlação positiva com CAT e GSH. REBRIN *et al.* (2004) demonstraram que em moscas os níveis de GSH aumentaram devido ao estresse oxidativo causado pela senescência. ARUN & SUBRAMANIAN (1998) mostraram também em larvas de *Macrobrachium malcomsonii* um aumento de antioxidantes. No entanto, ao contrário do que ocorre no ovo, o consumo de oxigênio diminui em larvas de 1 a 20 dias. Isto ocorre como uma consequência do envelhecimento da larva. Além disso, além do envelhecimento da larva em si, outro fator pode ocasionar uma diminuição no consumo de O₂, a fim de evitar a geração de dano oxidativo: a depressão metabólica ocasionada pela falta de alimento. As larvas de *B. microplus* a partir do sexto dia já estão metabolicamente ativas o suficiente para a infestação do hospedeiro (Da SILVA VAZ Jr., comunicação pessoal). No entanto, se há um

jejum prolongado pela falta de um hospedeiro, há a necessidade de se controlar o metabolismo para que consuma o mínimo de energia. PHILLIPS *et al.* (1995) mostraram que tanto adultos quanto larvas de *Ornithodoros turicata* eram afetados por jejum e que adultos alimentados possuíam um menor consumo de O₂. Depressão metabólica associada a jejum, baixas temperaturas ou baixa concentração de O₂ disponível já é bem conhecido em diferentes organismos (LUTZ & STOREY, 1997; HOCHACHKA & LUTZ, 2001). Vários autores demonstraram alta atividade de antioxidantes durante depressão metabólica, de forma a proteger contra estresse oxidativo gerado pela própria depressão em si. OLIVEIRA *et al.* (2005) observaram um aumento de atividade de GST em guelras de *Chasmagnathus granulata* durante depressão metabólica causada por ambiente anóxico. Em carrapatos não existem relatos a respeito de depressão metabólica envolvendo diferentes concentrações de O₂ no ambiente, mas sim envolvendo baixas temperaturas e jejum prolongado. DAVEY & COOKSEY (1989) mostraram que as larvas de *B. microplus* a baixas temperaturas reduzem seu metabolismo, podendo sobreviver sem alimento durante períodos prolongados. LABRUNA *et al.* (2003) e ESTRADA-PENA *et al.* (2004) mostraram o mesmo para outros carrapatos. Analisando o conjunto destes dados de depressão metabólica em carrapatos e associando-os com os dados obtidos por PAPADOPOULOS *et al.* (2004), que observaram em abelhas adultas submetidas a baixas temperaturas e jejum uma alta atividade de antioxidantes como GST, os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que as larvas de *B. microplus* diminuem seu consumo de O₂ – e, portanto, seu metabolismo – e aumentam a atividade de GST e outros antioxidantes para sobreviver mais tempo no ambiente, enquanto esperam por um hospedeiro.

Em situações de estresse oxidativo, seja por envelhecimento ou por depressão metabólica, o conteúdo de produtos de peroxidação de lipídeos aumenta. No presente trabalho foi verificado um alto conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, formando malondialdeído (MDA). O conteúdo de MDA é alto no primeiro e quinto dias, diminuindo no décimo dia e aumentando novamente no décimo quinto e vigésimo dias. O aumento da peroxidação de lipídeos em larvas nos primeiros dias pode ser justificado pelo alto consumo de O₂, que causa dano oxidativo. Quando a taxa de consumo de O₂ cai, a peroxidação de lipídeos também diminui. Conforme a larva envelhece, vai sofrendo dano oxidativo pelo envelhecimento e pela falta de alimento, que a obriga a baixar seu metabolismo; logo, aumenta novamente os níveis de peroxidação de lipídeos. Para contra-atacar este dano oxidativo, GST, CAT e GSH aumentam. MANFREDINI *et al.* (2005) demonstraram que em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a dano oxidativo causado por peroxidação de lipídeos tiveram seus níveis de GSH elevados, sugerindo que vias que utilizam GSH protegem contra dano em membranas lipídicas. A eficiência de GST e CAT em evitar aumento de peroxidação de lipídeos em diferentes organismos durante a fase larval também já está descrita. DAMIENS *et al.* (2004) mostraram que em larvas de moluscos bivalves as atividades de CAT e GST aumentaram, enquanto a peroxidação foi mantida, sugerindo que estas enzimas são essenciais para manter dano oxidativo envolvendo lipídeos em baixos níveis. Em larvas de tricóptero (*Hydropsiche exocellata*) também foi verificado a presença de enzimas antioxidantes evitando peroxidação de lipídeos (BARATA *et al.*, 2005).

Para que seja mantido o *status redox* normal de um organismo, uma variedade de enzimas de detoxificação pode atuar conjuntamente ou

separadamente. Muitas vezes, antioxidantes com atividades similares podem estar presentes e atuando ao mesmo tempo em um organismo, ou não, como é o caso da CAT e GPx em ovos e larvas de *B. microplus*. ARUN & SUBRAMANIAN (1998) mostraram que embriões e larvas de *M. malcolmsonii* apresenta atividade de CAT e GPx, mas somente CAT é eficiente em degradar H₂O₂. ACETO *et al.* (1994) mostrou apenas a atividade de CAT e não de GPx em embriões de *S. iridaeus*; em larvas de *H. exocellata*, a atividade de GPx é muito baixa quando comparada à atividade de CAT em situações de estresse oxidativo (BARATA *et al.*, 2005). Ou seja, CAT e GPx embora tenham o mesmo papel de degradação de peróxidos de hidrogênio podem estar presentes conjuntamente em um organismo e apenas uma estar efetivamente funcional, ou mais ativa. Em *B. microplus* foi testada a atividade de CAT e, para confirmar que a atividade de degradação de H₂O₂ era apenas e tão somente de CAT, foi usado um inibidor específico de catalases, aminotriazole (Sigma). A atividade da mesma foi quase totalmente inibida em ovos e larvas e não houve mais degradação de H₂O₂, mostrando que não há GPx ativa presente em ovos e larvas de *B. microplus*. COSSIO-BAYUGAR *et al.* (2005) relataram a clonagem de um gene de fosfolípídeo-hidroperóxido glutathione peroxidase (PHGPx) de *B. microplus* e cuja expressão do gene, verificada por RT-PCR, aumenta em linhagens de carrapato resistentes a organofosforados, mas a atividade enzimática não foi caracterizada em larvas.

Resumindo, para evitar dano oxidativo gerado por substâncias endógenas tóxicas descartadas durante o desenvolvimento embrionário e para conter o dano oxidativo gerado na larva por situações fisiológicas normais – como o envelhecimento – e situações fisiológicas anormais – como jejum prolongado ou fatores ambientais – uma série de mecanismos antioxidantes entram em atividade

e permitem ao carrapato sobreviver até encontrar um hospedeiro para completar seu ciclo. A compreensão de como funcionam tais mecanismos pode ser um passo fundamental para compreender melhor a fisiologia do carrapato e assim desenvolver novos métodos para seu controle.

3.2 CONCLUSÕES

Neste trabalho de caracterização de mecanismos contra estresse oxidativo, foi verificado que:

- As atividades de enzimas antioxidantes como GST e CAT aumentaram, bem como de GSH, molécula pertencente ao sistema não-enzimático, em ovos e larvas durante a embriogênese e desenvolvimento larval;
- GST apresentou uma correlação positiva com CAT e GSH;
- Ocorre peroxidação de lipídeos durante o desenvolvimento embrionário e desenvolvimento larval, e essa peroxidação é diminuída por mecanismos de proteção antioxidante;

A peroxidação de lipídeos em ovos ocorre provavelmente devido ao alto consumo de oxigênio durante a embriogênese e, em larvas, ocorre, provavelmente, devido ao jejum prolongado e envelhecimento das mesmas.

4. CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS DE MORTE CELULAR EM

B. microplus

Com a intenção inicial de se padronizar a técnica de RT-PCR para verificar a expressão de GST em ovos e larvas, foram feitas extrações de RNA e DNA nuclear de tecidos de fêmeas de carrapato adultas em diferentes dias do período de pré-oviposição. Foi então verificado que havia degradação no RNA e DNA extraídos. Para verificar a origem desta degradação foi realizada uma série de experimentos que acabaram por demonstrar não se tratar de degradação, mas fragmentação de DNA causada por morte celular.

Neste capítulo é abordada a morte celular por apoptose em fêmeas adultas ingurgitadas durante o período de pré-postura. Como parâmetros para a definição de tal morte foram analisadas por diferentes métodos a fragmentação de DNA e as modificações morfológicas nas células de glândulas salivares, ovário e singânglio. São discutidos, ainda, o papel de cada órgão para a sobrevivência do carrapato até o final do período de postura e a importância da morte celular por apoptose como um meio do organismo economizar energia.

Artigo aceito para publicação no periódico *Veterinary Parasitology*

Cell death during preoviposition period in *Boophilus microplus* tick

Daniela R. J. de Freitas, Renato M. Rosa, Dinara J. Moura, Anderson. L. Seitz.

Édson M. Colodel, David Driemeier, Itabajara da Silva Vaz Jr, Aoi Masuda



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



veterinary
parasitology

Veterinary Parasitology xxx (2006) xxx-xxx

www.elsevier.com/locate/vetpar

Cell death during preoviposition period in *Boophilus microplus* tick

D.R.J. Freitas^a, R.M. Rosa^a, D.J. Moura^a, A.L. Seitz^b, E.M. Colodel^b,
D. Driemeier^b, I. Da Silva Vaz Jr.^{a,b}, A. Masuda^{a,c,*}

^a Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Av. Bento Gonçalves 9500, C.P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500,
C.P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Av. Bento Gonçalves 9500, C.P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

Received 16 May 2006; received in revised form 17 October 2006; accepted 18 October 2006

Abstract

Programmed cell death (PCD) is present during the development of multicellular organisms and occurs from embryogenesis to death. In females of *Boophilus microplus*, the mass of several organs is reduced after the detachment from the host. In order to better characterize the cell death process that eliminates unnecessary tissues, the degeneration of salivary glands, ovaries and synganglia was investigated using DNA fragmentation in agarose gel, comet and TUNEL assays, and apoptosis activation pathway by the caspase assay. DNA fragmentation and enzymatic activity of caspase-3 were observed in salivary glands and ovaries at 48 and 72 h after tick removal from the host; in synganglia these parameters were maintained at low levels upon 48 h. The results obtained suggest that there is a refined control of tissue maintenance through apoptosis.

© 2006 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Apoptosis; *Boophilus microplus*; Life stage; Preoviposition; Programmed cell death; Tick organs

1. Introduction

The southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) is the main ectoparasite affecting cattle (George, 2000), and causes considerable economic losses worldwide (Guerrero et al., 2006). Currently, tick control is based on the application of chemical products; however, due to the rapid increase in pesticide-resistant

tick populations (Davey and George, 1998), alternative methods for tick control have been investigated (Willadsen, in press). Understanding the physiological mechanisms important for survival during the oviposition period is essential to establish effective methods to control the ectoparasite.

Programmed cell death (PCD) is a conserved pathway present in most eukaryotes, and plays a fundamental role in cellular homeostasis. PCD is responsible for a series of processes and stages, such as: sculpting organs and tissues; removing structures no longer required; adjusting cell numbers; terminally differentiating certain cell lineages; for eliminating potentially dangerous cells (Jacobson et al., 1997). PCD is required during embryonic development for the

* Corresponding author at: Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C.P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33166078; fax: +55 51 33167309.

E-mail address: aoi@cbiot.ufrgs.br (A. Masuda).

successful organogenesis and the crafting of complex multicellular tissues (Shraiman, 2005).

Cell death can be classified into three types: necrosis, autophagy and apoptosis. Apoptosis was described for the first time by Kerr et al. (1972). This type of cell death is characterized by membrane blebbing, nuclear and cytoplasmic condensation, DNA fragmentation and caspase activation (Danial and Korsmeyer, 2004), whereas autophagy is characterized by the destruction of the entire tissue and by the presence of multiple autophagic vacuoles in doomed cells (Schweichel and Merker, 1973; Yin and Thummel, 2005). In a different way, necrosis has been traditionally described as a passive form of cell death. Necrosis is the end result of a bioenergetic catastrophe that results from ATP depletion to a level that disables cell survival. Necrosis is initiated mainly by cellular ‘accidents’, such as toxic insults or physical damage (Lockshin and Zakeri, 2004), and is morphologically characterized by vacuolation of the cytoplasm, breakdown of the plasma membrane and by the induction of inflammation around the dying cell (Danial and Korsmeyer, 2004).

Different pathways of cell death, involving different families of proteins –such as caspases, noncaspase proteases, cytoplasmic organizing factors –apart from signaling molecules, transcription regulators as well as several unknown factors have all been equally studied at length in several arthropods, specially in *Drosophila* spp., the most important model for studies in development and organogenesis (Baehrecke, 2003; Shraiman, 2005). In *Drosophila* spp., the role of cell death during embryogenesis and in adult tissues is well known (Chandrasekaran and Beckendorf, 2003; McCall and Peterson, 2004). In other insects, PCD has been described in larval and adult tissues (Lee and Baehrecke, 2001; Terashima et al., 2000). L’Amoreaux et al. (2003) described the occurrence of cell death in salivary glands of the tick *Dermacentor variabilis* during the preoviposition period.

In this work, we detected cell death in organs of engorged *B. microplus* females during the preoviposition period. This study describes the relationships between sensitivity to apoptosis and the biological role of salivary glands, synganglia and ovaries of *B. microplus*.

2. Materials and methods

2.1. Ticks

Porto Alegre isolates of *B. microplus* ticks were maintained in cattle housed in individual tick-proof

pens on slatted floors. Engorged females were removed and incubated at 28 °C with 85% relative humidity for oviposition.

2.2. Organ dissection

Engorged females (around 350 mg) were manually removed from the cattle and dissected in 0, 24, 48 or 72 h after removal from the host to obtain salivary glands, ovaries and synganglia.

Engorged female ticks were washed with 70% ethanol and had the dorsal surface dissected with a scalped blade. Salivary glands, ovaries and synganglia were separated with fine-tipped forceps and washed in phosphate buffered saline pH 7.2 (PBS). These materials were maintained in iced PBS and used immediately for the comet assay. For the TUNEL assay, the tissues were immersion-fixed in 4% neutral-buffered formalin and then embedded in paraffin. For the nuclear DNA isolation, tissues were maintained in 100 mM Tris–HCl 5 mM EDTA buffer pH 8.0 and stored at –70 °C.

2.3. Purification and integrity of nuclear DNA from tick organs

Electrophoresis in gel de agarose was used to determine the DNA integrity, since fragmentation in ladder-like pattern is a signal of cell death. The nuclear DNA of salivary glands, ovaries and synganglia of engorged females were isolated using the following protocol: 100 mg of frozen tissue were macerated in 600 µl of lysis buffer (100 mM Tris–HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 60 mM NaCl) and samples were maintained at 55 °C for 45 min in 1% SDS. After the DNA samples were purified with phenol–chloroform method, then they were dissolved in distilled water. The samples were electrophoresed at 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) for 20 min in 0.8% agarose gel.

2.4. Comet assay

The second method used to verify the DNA fragmentation was the comet assay. The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. (1988), with minor modifications (Hartmann and Speit, 1997). After dissection, the engorged female tissues were incubated in 200 µl of iced PBS and the tubes containing the samples were stirred to disrupt the tissues. The cell suspensions were added to 0.75% low melting-point agarose and spread on agarose-precoated

145 microscope slides. Cells were lysed in 2.5 M NaCl,
146 100 mM EDTA and 10 mM Tris buffer, pH 10.0 with
147 freshly added 1% Triton X-100 and 10% DMSO
148 overnight at 4 °C until required. Slides were subse-
149 quently placed in a horizontal electrophoresis cham-
150 ber, containing freshly made alkaline buffer (300 mM
151 NaOH and 1 mM EDTA, pH 13.0) for 20 min at 4 °C.
152 Samples were electrophoresed at 300 mA and 25 V
153 (0.90 V/cm) for 15 min. Slides were then neutralized
154 with 0.4 M Tris buffer, pH 7.5, stained with silver
155 (Nadin et al., 2001) and inspected by light micro-
156 scopy. One hundred randomly selected cells (50 cells
157 from each of two replicate slides) were analyzed per
158 group. Analysis was performed by measuring the
159 length of DNA migration (nuclear region + tail) in
160 arbitrary units using a calibrated ocular scale. One
161 unit was approximately 5 μm at 200× magnification.
162 Damage frequency (%) was calculated based on the
163 number of cells with tails versus those without.
164 Positive controls (100%) were engorged females
165 tissues treated with 1 mM H₂O₂. Results are presented
166 as mean and standard deviation of three independent
167 experiments.
168

2.5. TUNEL Assay

169 To correlate changes in cellular morphology with
170 the apoptotic process, we performed the TUNEL assay
171 using the DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System
172 (Promega) according to the manufacturer's instruc-
173 tions. Briefly, the organs were dissected, fixed in 4%
174 formalin and paraffin-embedded. Sections of these
175 organs were mounted on microscope slides. The
176 paraffin-embedded tissue sections were then depar-
177 affinized, washed in 100% ethanol and then re-
178 hydrated by immersion in different ethanol concen-
179 trations. Samples were washed by immersing the
180 slides in 0.85% NaCl and after in PBS at room
181 temperature. Next, the tissue sections were fixed by
182 immersing the slides in 4% paraformaldehyde solution
183 at room temperature and washed with PBS. Each slide
184 was covered with 20 μg/ml Proteinase K solution,
185 washed in PBS and fixed by immersing the slides in
186 4% paraformaldehyde solution. Then, tissues were
187 covered with cell equilibration buffer which contained
188 recombinant Terminal deoxynucleotidyl Transferase
189 (rTdT) reaction mix. The sections were covered with
190 plastic coverslips to ensure the even distribution of the
191 reagent. After that, sections were incubated at 37 °C
192 for 60 min, incubated again in 2 × SSC at room
193 temperature and washed in fresh PBS to remove
194 unincorporated biotinylated nucleotides. Endogenous

195 peroxidases were blocked by immersing the slides in
196 0.3% hydrogen peroxide at room temperature. After
197 washes with PBS, Horseradish peroxidase-labeled
198 streptavidin (streptavidin HRP) diluted in PBS was
199 added to slides for 30 min at room temperature. 3,3'-
200 diaminobenzidine (DAB) was used for tissue coloration.
201
202

203 A sample treated with DNase I to cause DNA
204 fragmentation in tissues of engorged females was used
205 as positive control. The reaction without rTdT enzyme
206 was used as negative control.

2.6. Caspase-3 assay

207 Since the caspase-3 activity is characteristic of
208 apoptosis, we used the CaspAce™ Assay Colorimetric
209 System (Promega) according to the manufacturer's
210 instructions. Briefly, the organ extracts were prepared
211 in iced PBS, centrifuged and resuspended in cell lysis
212 buffer. The cells were lysed by freezing and thawing,
213 incubated in ice for 15 min and centrifuged at 15,000 g
214 for 20 min at 4 °C. After centrifugation, the supernatant
215 fraction was collected. The positive apoptosis controls
216 were organs submitted for treatment with ultraviolet
217 radiation for 10 min. The inhibited-apoptosis controls
218 were organs submitted for the same treatment and
219 followed by addition of caspase inhibitor Z-VAD-FMK
220 (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoro-
221 methylketone), according to the manufacturer's
222 instructions. The organ extracts (100 μg total protein),
223 the blank (without cell extract), the negative control
224 (extract from untreated cells), the apoptosis-induced
225 extracts and the inhibited apoptosis extracts (extract
226 from induced with ultraviolet radiation and cell
227 extracts treated with Caspase Inhibitor Z-VAD-
228 FMK) were tested in a total volume of 100 μl in 96-
229 well plates. Two micro-liters of the DEVD-pNA (*N*-
230 acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilide) substrate
231 (10 mM stock) were added to all wells. The plate
232 was covered with a plastic film and incubated at 20 °C
233 for 18 h. Color development was monitored by
234 absorbance in 405 nm. The specific caspase-3 activity
235 was calculated as one enzyme unit per pmol pNA
236 liberated/hour/mg of protein).
237

2.7. Statistical Analysis

238 All data values were expressed as mean ± standard
239 deviation. Significant differences between groups were
240 established by ANOVA. The *t*-tests were used when
241 comparing data between two groups. Significance was
242 set at *p* < 0.05.
243

Table 1
DNA integrity in 0, 24, 48 and 72 h engorged female organs

Organs	Time after collection (h)			
	0	24	48	72
Salivary glands	+++	+++	++	+
Ovaries	+++	+++	+	++
Synganglia	+++	+++	++	+

DNA isolation and electrophoresis were performed as described in Section 2. +++ indicates the genomic DNA appeared intact; ++ indicates a low level of DNA fragmentation was visible and + indicates the DNA migrated as a smear.

3. Results

3.1. DNA Fragmentation in agarose gel

Nuclear DNA extracted from tissues of engorged ticks dissected on the day of collection and after 24 h did not show fragmentation. At 48 h after tick removal, salivary glands, ovaries and synganglia presented fragmentation in ladder-like pattern and the ovary was the organ with the most prominent fragmentation. At 72 h, fragmentation was higher in salivary glands and synganglia than in ovaries, and the DNA appeared as a smear (Table 1).

3.2. Comet assay

The comet assay showed a significant increase in DNA breakdown for salivary glands and ovaries during the preoviposition period, when compared with tissues dissected at the time of tick removal. In salivary glands a damage frequency of 52.5% was verified on the day of tick removal, and then increased to 84% at 72 h. In ovaries the damage frequency was 25.5% at time 0 h, and increased to 74% at 72 h. In synganglia, no

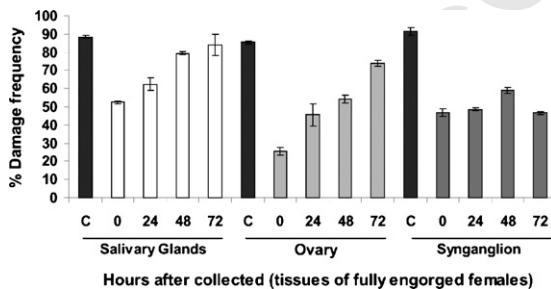


Fig. 1. Comet assay. Damage frequency in nuclear DNA from salivary glands, ovaries and synganglia of *B. microplus* engorged females. The breakdown frequency at DNA in samples is compared to tissues treated with 1 mM H₂O₂ (100% positive control). The results represent mean and S.D. to three independent experiments, all in duplicates. $p < 0.05$.

significant variation in the damage frequency during the 72 h period was observed, and varied from 46.5% to 59% (Fig. 1).

3.3. TUNEL assay

Salivary glands (Fig. 2A and B) and ovaries (Fig. 2C and D) presented cells with strong staining in the nuclei at 48 and 72 h. In synganglia, a strong staining was detected in tissues only at 72 h (Fig. 2F), and with no stained nuclei observed at 48 h (Fig. 2E). Salivary glands, ovaries and synganglia presented few or no stained nuclei at 0 and 24 h (data not shown).

3.4. Specific caspase-3 activity

Caspase-3 activity increased gradually in salivary glands and ovaries at all times tested, and the major increase occurred between 48 and 72 h. In synganglia, the specific caspase-3 activity was low at 0, 24 and 48 h, but it increased significantly at 72 h (Fig. 3).

4. Discussion

In this study, we evaluated cell death in organs of *B. microplus* engorged females, such as salivary glands, which are responsible for hydrostatic equilibrium and for the liberation of molecules that are essential to evade the host's immune response and anticoagulants that favor their blood meal (Sonenshine, 1991), ovaries that possess high metabolism due to elevated egg production and synganglia that are involved in nervous system and endocrine system functions (Sonenshine, 1991).

All the organs tested exhibited DNA fragmentation in ladder-like pattern (Table 1), which is a feature of programmed cell death (Kerr et al., 1972; Danial and Korsmeyer, 2004). To further characterize the process of PCD occurring in *B. microplus*, the comet and the TUNEL assays were carried out in detached female organs.

Both the comet (Fig. 1) and the TUNEL (Fig. 2A and B) assays revealed salivary glands to be the most affected organ (Table 1). Cell death by PCD has been detected in salivary glands of *Drosophila* spp. (Bowen et al., 1993; Yin and Thummel, 2005) and labial glands of *Manduca sexta* (Jochova et al., 1997). L'Amoreaux et al. (2003) showed morphological data suggesting that salivary gland degeneration in *D. variabilis* involves apoptotic process. So, a more comprehensive study of PCD in salivary gland was undertaken to understand its role in osmoregulation and hydration state during the preoviposition period.

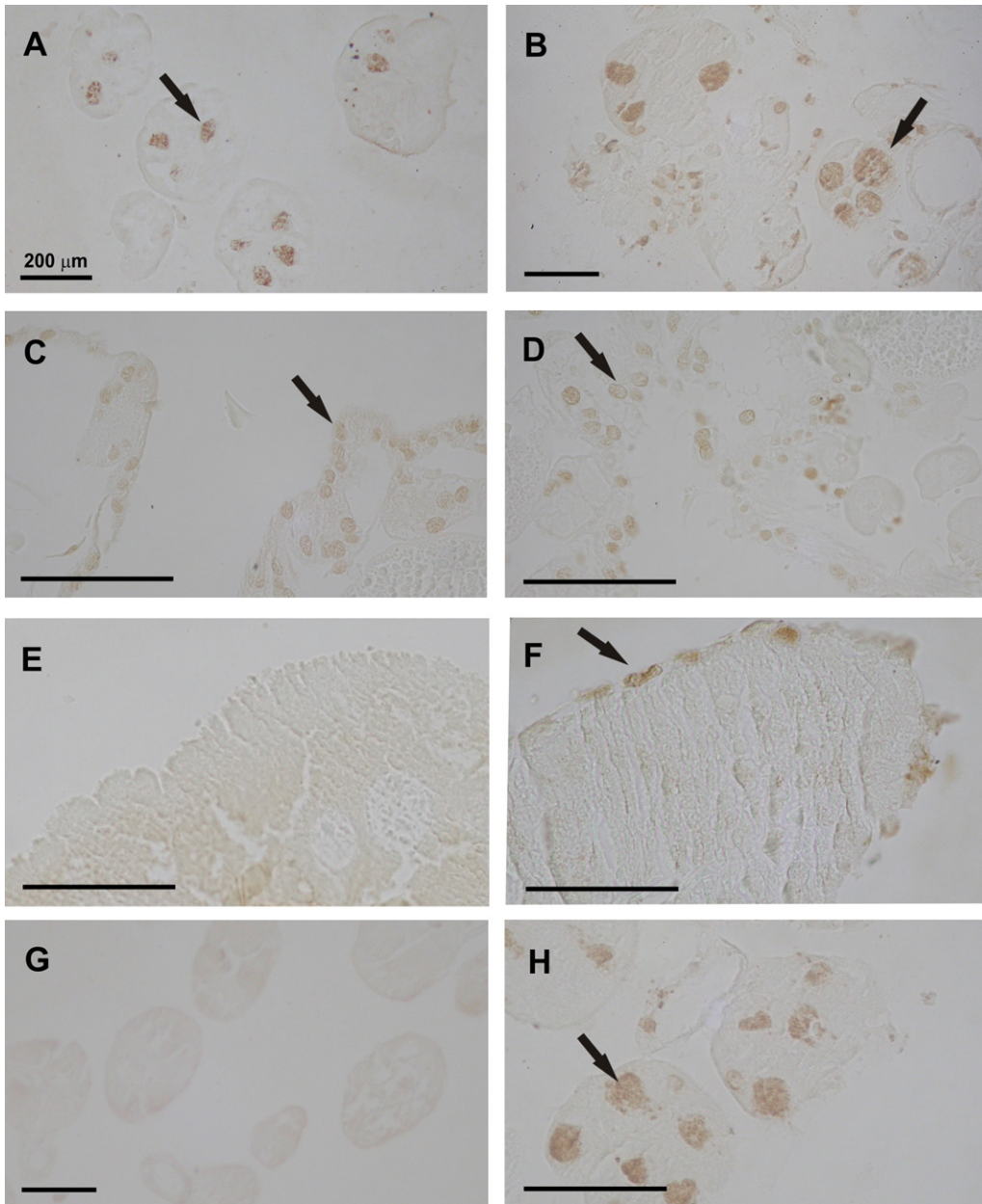


Fig. 2. TUNEL assay. The DNA fragments of the nuclear DNA from salivary glands, ovaries and synganglia dissected at different times after tick removal from the host were labeled with biotinylated nucleotides and visualized with DAB (see Section 2 for details). (A and B) salivary glands at 48 and 72 h after tick removal; (C and D) ovaries at 48 and 72 h; (E and F) synganglia at 48 and 72 h; (G and H) negative control (without rTdT Enzyme) and positive control (sample with DNase I). The scale bars represent 200 μm.

309
310
311
312
313
314
315
316
317

With respect to the ovaries, we observed DNA fragmentation to be more prominent in the 48-h than in the 72-h determination (Fig. 1). The lower DNA breakdown observed for ovaries at 72 h in agarose gel (Table 1) is possibly due to the nuclear DNA synthesized by the newly formed eggs in this period. Nonetheless, apoptosis occurs in ovaries in this period. There are several cell types in the ovary of *B. microplus*,

317
318
319
320
321
322
323
324
325

and it is possible that some redundant cell types are discarded during tissue turnover, to minimize energy losses. In *Drosophila* spp., the same phenomenon seems to occur by apoptosis and autophagy in ovary tissues at different stages of development (Kai and Spradling, 2004; Decotto and Spradling, 2005). Less DNA damage was detected in synganglia than in salivary glands and ovaries (Table 1 and Fig. 1). DNA

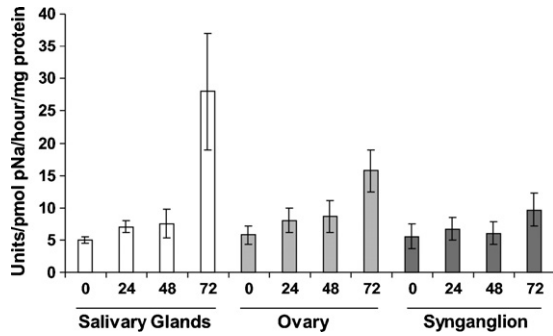


Fig. 3. Specific caspase-3 activity. The tissues extracts (100 μ g total protein) from salivary glands, ovaries and synganglia collected at 0, 24, 48 and 72 h were incubated with DEVD-pNA substrate at 37 °C for 18 h. Color development was monitored by absorbance in 405 nm. The results represent mean and S.D. to three independent experiments, all in duplicates. $p < 0.05$.

damage levels were not observed until 72 h (Fig. 1), as confirmed by the TUNEL assay (Fig. 2E and F). These data were similar to those observed in the nervous system of *Drosophila* during its development (Hidalgo and Ffrench-Constant, 2003) or when the adult fly is submitted to oxidative stress (Zheng et al., 2005). Although the tick has protection mechanisms against oxidative damage (Maya-Monteiro et al., 2004; Pereira et al., 2001), oxidative stress could ultimately be one of the causes for the apoptosis observed in the nervous system after 72 h.

Caspases are present as inactive precursors in cells, and undergo proteolytic processing to generate active enzymes when an apoptotic signal is received. We found that the specific caspase-3 activity increased gradually in salivary glands and synganglia, along all times tested (Fig. 3). Yet, caspase activity presented a more pronounced increase in salivary glands at 72 h, as compared to the other organs studied. In like manner, ovaries experienced an increased caspase activity at 72 h, but far less prominently than in salivary glands. Since the participation of caspase-3 is conserved in the apoptotic pathway (Song et al., 2000) our results are similar with the previous observation of L'Amoreaux et al. (2003), indicating the apoptotic process as one of the mechanisms through which salivary glands degenerate after detachment from the host. However, apoptosis in *B. microplus* was observed already at 24 h after tick removal, contrasting with the 5 days after tick removal detected in *D. variabilis*. Our results showed that apoptosis occurs along the entire ovary, and it is possible that death regulated by apoptosis can select tissues or specific cellular types by eliminating unnecessary cells to decrease energy consumption.

In ticks, the synganglion combines nervous system and endocrine functions, since it is capable to produce an egg development stimulation factor (Oliver et al., 1992). In the case of *B. microplus*, it is reasonable to consider that oxidative damage occurs in this organ, because until the end of oviposition, several molecules resulting from degenerated tissues undergo turnover, generating reactive oxygen radicals that are usually captured by proteins present in the haemolymph (Gudderra et al., 2002; Maya-Monteiro et al., 2004). Consequently, refined control of cell death may occur in synganglia in order to keep the nervous system as intact as possible, as it commands all primordial functions.

We analyzed the cell death in different organs of engorged females of *B. microplus*. The results obtained suggest that the tick regulates homeostasis using a refined control of tissue maintenance by apoptotic process. Although further studies are required to characterize the role of apoptosis in females during the oviposition period, our analysis in tick tissues provides relevant information in the context of physiologic mechanisms that allow tick survival until its reproductive cycle is completed. This knowledge can be useful in studies geared for methods to control tick infestation.

Acknowledgements

We thank Dr. José Cláudio Moreira Fonseca for helpful discussions about this work and to CNPq, FINEP, PRONEX and FAPERGS by financial support.

References

- Baehrecke, E.H., 2003. Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 10, 940–945.
- Bowen, I.D., Morgan, S.M., Mullarkey, K., 1993. Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Calliphora vomitoria*. *Cell Biol. Int.* 17, 13–33.
- Chandrasekaran, V., Beckendorf, S.K., 2003. Senseless is necessary for the survival of embryonic salivary glands in *Drosophila*. *Development* 130, 4719–4728.
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J., 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205–219.
- Davey, R.B., George, J.E., 1998. In vitro and in vivo evaluations of a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) selected for resistance to permethrin. *J. Med. Entomol.* 35, 1013–1019.
- Decotto, E., Spradling, A.C., 2005. The *Drosophila* ovarian and testis stem cell niches: similar somatic stem cells and signals. *Dev. Cell* 9, 501–510.
- George, J.E., 2000. Present and future technologies for tick control. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 916, 583–538.
- 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. *J. Med. Entomol.* 43, 9–16.

- 410 Gudderra, N.P., Sonenshine, D.E., Apperson, C.S., Roe, R.M.,
412 2002. Hemolymph proteins in ticks. *J. Insect Physiol.* 48,
413 269–278.
- 414 Hartmann, A., Speit, G., 1997. The contribution of cytotoxicity to
415 DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.*
416 90, 183–188.
- 417 Hidalgo, A., Ffrench-Constant, C., 2003. The control of cell number
418 during central nervous system development in flies and mice.
419 *Mech. Dev.* 120, 1311–1325.
- 420 Jacobson, M.D., Weil, M., Raff, M.C., 1997. Programmed cell death in
421 animal development. *Cell* 88, 347–354.
- 422 Jochova, J., Quaglino, D., Zakeri, Z., Woo, K., Sikorska, M., Weaver,
423 V., Lockshin, R.A., 1997. Protein synthesis, DNA degradation, and
424 morphological changes during programmed cell death in labial
425 glands of *Manduca sexta*. *Dev. Genet.* 21, 249–257.
- 426 Kai, T., Spradling, A., 2004. Differentiating germ cells can revert into
427 functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature*
428 428, 564–569.
- 429 Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic
430 biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue
431 kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- 432 L'Amoreaux, W.J., Junaid, L., Trevidi, S., 2003. Morphological
433 evidence that salivary gland degeneration in the American dog
434 tick, *Dermacentor variabilis* (Say), involves programmed cell
435 death. *Tissue Cell* 35, 95–99.
- 436 Lee, C.Y., Baehrecke, E.H., 2001. Steroid regulation of autophagic
437 programmed cell death during development. *Development* 128,
438 1443–1455.
- 439 Lockshin, R.A., Zakeri, Z., 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *Int.*
440 *J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2405–2419.
- 441 Maya-Monteiro, C.M., Alves, L.R., Pinhal, N., Abdalla, D.S., Oli-
442 veira, P.L., 2004. HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an
443 antioxidant role. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 81–88.
- 444 McCall, K., Peterson, J.S., 2004. Detection of apoptosis in *Droso-*
445 *phila*. *Methods Mol. Biol.* 282, 191–205.
- Nadin, S.B., Vargas-Roig, L.M., Ciocca, D.R., 2001. Silver staining
method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.* 49,
1183–1186.
- Oliver Jr., J.H., Zhu, X.X., Vogel, G.N., Dotson, E.M., 1992. Role of
synganglion in oogenesis of the tick *Ornithodoros parkeri* (Acari:
Argasidae). *J. Parasitol.* 78, 93–98.
- Pereira, L.S., Oliveira, P.L., Barja-Fidalgo, C., Daffre, S., 2001.
Production of reactive oxygen species by hemocytes from the
cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp. Parasitol.* 99, 66–72.
- Schweichel, J.U., Merker, H.J., 1973. The morphology of various
types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253–266.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple
technique for quantification of low levels of DNA damage in
individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Shraiman, B.I., 2005. Mechanical feedback as a possible regulator of
tissue growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 3319–3323.
- Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of Ticks*, first ed., 1. Oxford
University Press, New York, 447 pp.
- Song, Z., Guan, B., Bergman, A., Nicholson, D.W., Thornberry, N.A.,
Peterson, E.P., Steller, H., 2000. Biochemical and genetic inter-
actions between *Drosophila* caspases and the proapoptotic genes
rpr, hid, and grim. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2907–2914.
- Terashima, J., Yasuhara, N., Iwami, M., Sakurai, S., Sakurai, S., 2000.
Programmed cell death triggered by insect steroid hormone, 20-
hydroxyecdysone, in the anterior silk gland of the silkworm,
Bombyx mori. *Dev. Genes Evol.* 210, 545–558.
- Willadsen, P. Tick control: thoughts on a research agenda. *Vet.*
Parasitol., in press.
- Yin, V.P., Thummel, C.S., 2005. Mechanisms of steroid-triggered
programmed cell death in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16,
237–243.
- Zheng, J., Edelman, S.W., Tharmarajah, G., Walker, D.W., Pletcher,
S.D., Seroude, L., 2005. Differential patterns of apoptosis in
response to aging in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
102, 12083–12088.

4.1 DISCUSSÃO

A PCD é um componente essencial do desenvolvimento normal de todos os organismos multicelulares. A compreensão dos mecanismos que regulam este processo tem recentemente atraído considerável atenção (KAKEI *et al.*, 2005). A morte celular na verdade é um grande conjunto de sinais fisiológicos que levam a ativação e repressão de fatores intracelulares envolvidos no controle desta morte. A compreensão destes sinais fisiológicos em artrópodes pode ser interessante não somente como um modelo experimental que ajude a compreender o que ocorre em mamíferos, mas também pode servir de base, por exemplo, para o desenvolvimento de drogas que possam controlar pragas agrícolas e de produção animal.

O que tem sido mostrado em *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* spp e mamíferos é que uma grande parte das vias que compõe os diferentes tipos de morte celular é bastante conservada. Em carrapatos, muito pouco é conhecido. Assim sendo, neste trabalho tentou-se elucidar os mecanismos de morte celular em fêmeas adultas de *B. microplus*, durante período de pré-postura.

Inicialmente, procurou-se detectar algum dano que pudesse conduzir à morte celular através da análise da integridade do DNA genômico de diferentes tecidos de *B. microplus* – glândula salivar, ovário e sistema nervoso. A escolha dos tecidos foi baseada na sua importância – glândula salivar apresenta um importante papel de controle hidrostático e no controle osmoregulador (SONENSHINE, 1991); ovário é um órgão imprescindível para a ovipostura (SONENSHINE, 1991); e singânglio, além de função de sistema nervoso central,

ainda é responsável por funções endócrinas (SONENSHINE, 1991). O DNA genômico dos tecidos escolhidos foi analisado por eletroforese em gel de agarose e por teste cometa. Foi vista intensa fragmentação em tecidos de fêmeas coletadas com 48 e 72h após a coleta, mais especificamente em glândulas salivares e ovário; singânglio apresentou um nível de fragmentação de DNA constante desde o momento inicial da coleta (0 h) até momentos antes da postura dos ovos (72 h). A condensação de cromatina em torno do núcleo e a degradação do DNA nuclear em fragmentos em torno de 50–200 pb são características de PCD (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004) e principalmente a última característica citada é considerada um forte indício de apoptose (DANIAL & KORSMEYER, 2004). No entanto, não define de fato que tipo de PCD está em questão, apoptose ou autofagia.

Visto que a morfologia das células apoptóticas e autofágicas é bastante diferenciada (EDINGER & THOMPSON, 2004), sendo visível a formação de vacúolos no citoplasma de células autofágicas, enquanto células apoptóticas apresentam assimetria de membrana e pequenos vacúolos densos e localizados, formando corpos apoptóticos (HURD & CARTER, 2004), foi usado o teste TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*) para confirmar a fragmentação de DNA e verificar o tipo de morte celular. A partir de cortes histológicos em parafina, foi detectada a fragmentação de DNA em glândula salivar, ovário e singânglio, e observada uma morfologia que sugere morte celular por apoptose. Glândula salivar, ovário e singânglio foram testados em diferentes tempos após a coleta: 0, 24, 48 e 72 h. Nenhum dos tecidos em 0 h e 24 h após a coleta apresentou sinais de fragmentação de DNA. A partir de 48 h, no entanto, foi possível verificar forte coloração nos tecidos. Em glândulas salivares é possível identificar os ácinos

fortemente marcados, mostrando que ali há fragmentação de DNA. No ovário, é possível notar forte coloração nos núcleos de células ao longo das alças ovarianas e o restante das gônadas. Em singânglio, nenhuma marcação indicando fragmentação do DNA é vista em 48 h e pouquíssima fragmentação é vista em 72 h. Os dados encontrados em glândula salivar estão de acordo com os achados por L'AMOREAUX *et al.* (2003), que detectaram apoptose em glândulas salivares de *Dermacentor variabilis*, mostrando que sua degeneração faz parte de um processo de morte celular programada. BIOR *et al.* (2002) analisaram genes diferencialmente expressos em glândulas salivares de *Amblyomma americanum* e *Dermacentor andersoni* e encontraram um inibidor de apoptose, o que pode indicar que apoptose é um processo ocorrente em glândulas salivares de todos os carrapatos. Em ovário, assim como em glândulas salivares, foi observada por TUNEL maior fragmentação do DNA em 48 e 72 h. O ovário de *B. microplus* é composto de diferentes tipos celulares. É possível que as células que estão entrando em apoptose sejam não mais necessárias para dar continuidade ao processo de ovipostura; assim, seriam eliminadas para evitar uma despesa energética extra, mantendo tecidos não mais necessários. Singânglio foi o tecido menos afetado, embora também sofra dano. Em *Drosophila* spp também foi detectada fragmentação de DNA em sistema nervoso durante seu desenvolvimento (HIDALGO & FFRENCH-CONSTANT, 2003). ZHENG *et al.* (2005) mostraram que células de sistema nervoso de moscas submetidas a estresse oxidativo também poderiam sofrer apoptose. Associando esta informação ao presente trabalho, é possível pensar que as fêmeas de *B. microplus* estejam sofrendo estresse oxidativo devido ao seu envelhecimento, digestão do alimento ingerido do hospedeiro e preparação para a ovipostura.

Mesmo com conhecidos mecanismos de proteção contra estresse oxidativo (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2001), é possível que o dano oxidativo aumente em sistema nervoso em 72 h. Para a confirmação de PCD por apoptose, foi utilizado um ensaio que permite caracterizar uma via clássica de apoptose. Alguns pontos das vias de apoptose em diferentes organismos são distintos, mas em sua maior parte possuem mecanismos moleculares conservados ao longo da evolução. Um destes pontos comuns é a ativação de caspases, uma família de proteases com papel executor em apoptose (CLAVERIA & TORRES, 2003). A família das caspases é bastante grande e se divide em dois grupos: caspases iniciadoras - responsáveis pela iniciação da cascata de sinalização para apoptose – e caspases efetoras, responsáveis pela execução das etapas finais da apoptose. As caspases são responsáveis, em boa parte, pela morfologia das células. Alguns tipos de caspases estão envolvidos também em autofagia, mas são distintas daquelas envolvidas em apoptose. Em apoptose, a caspase-9 é iniciadora e as caspases-3 e -7 são executoras (SHI, 2004). Neste trabalho, foi usado um ensaio enzimático que permite analisar a atividade de caspase-3. Os resultados mostraram que a atividade de caspase-3 aumenta gradualmente em glândulas salivares, ovário e singânglio, mas o aumento mais pronunciado foi visto em glândulas salivares em 72 h. Singânglio é o tecido que apresenta atividade mais baixa de caspase-3. Portanto, foi confirmada a ocorrência de apoptose em tecidos de *B. microplus* durante o período de pré-postura. O fato de ocorrer apoptose nestes tecidos não descarta a possibilidade de mortes nestes tecidos também por necrose e autofagia. Em tecidos de ovário de *Drosophila* spp é descrito autofagia e apoptose, em diferentes estágios de desenvolvimento (KAI & SPRADLING, 2004; DECOTTO &

SPRADLING, 2005). Em glândulas salivares de *Drosophila* spp também foi detectada morte celular por autofagia (MYOHARA, 2004). É possível que o tipo de morte utilizada por cada organismo, em diferentes situações, seja uma estratégia para manter o organismo funcionando da maneira a manter um equilíbrio energético. O gasto energético em ativar toda a maquinaria de expressão, transcrição e tradução para eliminar células e tecidos não mais necessários deve ser contrabalançado pelo gasto de manter os mesmos intactos e funcionando. Neste trabalho é sugerido que o carrapato mantém um refinado controle de apoptose para manter-se vivo com gasto mínimo de energia até o final da ovipostura.

4.2 CONCLUSÕES

Neste trabalho de caracterização de mecanismos de morte celular, foi verificado que:

- Ocorre fragmentação de DNA genômico em glândula salivar, ovário e singânglio de fêmeas adultas ingurgitadas durante o período de pré-postura;
- Foi confirmada por TUNEL e atividade de caspase-3 morte celular nos tecidos testados;
- O tecido que sofre maior apoptose é glândula salivar, seguido de ovário; os níveis de apoptose em singânglio durante o período de pré-postura são constantes.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES FINAIS

O conhecimento obtido neste trabalho pode contribuir para a melhor compreensão da fisiologia do carrapato e colaborar no desenvolvimento de novos métodos de controle de populações de *B. microplus*. Em parasitos, atualmente, o conhecimento da função e estrutura de moléculas, bem como de diferentes mecanismos celulares e vias metabólicas obtidos através de projetos como genoma e proteoma de diferentes organismos já vem sendo aplicado no desenvolvimento de drogas antiparasitárias, como nos casos de *Leishmania mexicana* (CORDEIRO *et al.*, 2004) e *Plasmodium falciparum* (SARMA *et al.*, 2003). De maneira semelhante, o conhecimento das funções de GST durante o desenvolvimento do carrapato, bem como a importância de outras moléculas envolvidas em vias antiestresse oxidativo como CAT e GSH e a caracterização da morte celular por apoptose podem auxiliar no desenvolvimento de drogas que atuem nas vias de detoxificação e apoptose inibindo-as, de forma a dificultar ou impedir o desenvolvimento do carrapato. Além disso, o conhecimento da participação de GST em mecanismos envolvendo detoxificação e estresse oxidativo, aliado às informações que já se têm a respeito de sua atividade *in vitro* quando exposta a diferentes acaricidas (DA SILVA VAZ *et al.*, 2004) (ANEXO 1) podem fornecer pistas sobre o envolvimento de GSTs em seleção de populações de carrapatos resistentes a acaricidas no campo.

Também é válido salientar que moléculas envolvidas em ambas as vias estudadas neste trabalho podem ainda apresentar características imunogênicas, que as tornem interessantes para serem usadas na formulação de uma vacina ou

para complementar as vacinas já existentes (FREITAS & DA SILVA VAZ, 2005) (ANEXO 2).

Além da parte de caracterização de morte celular e mecanismos de ação antiestresse oxidativo, procurou-se também avaliar paralelamente a atividade de GST *in vitro* quando a mesma era exposta a diferentes acaricidas (DA SILVA VAZ *et al.*, 2004; ANEXO 1). A partir deste trabalho foram escritos dois artigos em periódico de circulação nacional (ANEXOS 2 e 3) e um artigo em revista especializada na área de Pecuária (ANEXO 4). Estes trabalhos são revisões a respeito de métodos empregados no controle do carrapato (ANEXO 2) e de mecanismos de resistência do carrapato a acaricidas (ANEXO 3), bem como estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra *B. microplus* (ANEXO 4).

Estes trabalhos, por fim, abrem caminhos para muitas outras questões a serem respondidas. No trabalho de caracterização de estresse oxidativo, por exemplo, uma questão a ser considerada seria o papel da GSH durante o desenvolvimento larval do carrapato, uma vez que durante o início do desenvolvimento larval há atividade de GST, mas um conteúdo de GSH muito baixo. Outra questão importante a ser levantada diz respeito à taxa de peroxidação de lipídeos, bastante alta durante a embriogênese: quais os mecanismos, além de GST, CAT e GSH que permitem ao embrião sobreviver sofrendo uma lipoperoxidação tão alta?

De igual forma, o trabalho de morte celular abre caminhos para várias possibilidades, como caracterizar a morte celular por autofagia durante o mesmo período testado em fêmeas adultas, verificar se a morte celular por apoptose ocorre por via intrínseca ou extrínseca, caracterizar moléculas da via apoptótica e

verificar a morte celular por apoptose conjuntamente com indicadores de estresse oxidativo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACETO, A.; AMICARELLI, F.; SACCHETTA, P.; DRAGANI, B.; BUCCIARELLI, T.; MASCIOTTO, L.; MIRANDA, M.; DI ILIO, C. 1994. Developmental aspects of detoxifying enzymes in fish (*Salmo iridaeus*). *Free Radicals Research*, 21: 285-294.
- ALLEN, J.R. 1989. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals. *Experimental and Applied Acarology*, 7: 5-13.
- AGIANIAN, B.; TUCKER, P.A.; SCHOUTEN, A.; LEONARD, K.; BULLARD, B.; GROS, P. 2003. Structure of a *Drosophila* sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *Journal of Molecular Biology*, 326: 151-65.
- AGUILAR-TIPACAMU G.; RODRIGUEZ-VIVAS R.I. 2003. Effect of moxidectin against natural infestation of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 111: 211-216.
- ANDREOTTI R.; GOMES A., MALAVAZI-PIZA K.C.; SASAKI S.D.; SAMPAIO C.A.; TANAKA A.S. 2002. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International Immunopharmacology*, 2: 557-563.
- ALVES-BRANCO F.P.; ECHEVARRIA F.A.M.; SIQUEIRA A.S. 1983. Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. *Comunicado Técnico da EMBRAPA*, 1: 1-4.
- ARUN, S.; SUBRAMANIAN, P. 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 121: 273-277.

- APELLA, G.C.; GONDIM, K.C.; MACHADO, E.A.; MEDEIROS, M.N.; SILVA-NETO, M.A.; MASUDA, H. 2005. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77: 405-430.
- BARONDEAU, D.P.; KASSMANN, C.J.; BRUNS, C.K.; TAINER, J.A.; GETZOFF, E.D. 2004. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry*, 43: 8038–8047.
- BARATA, C.; LEKUMBERRI, I.; VILA-ESCALE, M.; PRAT, N.; PORTE, C. 2005. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquatic Toxicology*, 74: 3-19.
- BASSO, L.M.S.; MONTEIRO, A.C.; BELO, M. A.A.; SOARES, V.E.; GARCIA, M.V.; MOCHI, D.A. 2005. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 40: 595-600.
- BASTIANI, M.; HILLEBRAND, S.; HORN, F.; KIST, T.B.; GUIMARAES, J.A.; TERMIGNONI, C. 2002. Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. *Insect Biochemical and Molecular Biology*, 32: 1439-1446.
- BAEHRECKE, E.H., 2003. Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*, 10: 940–945.
- BEERE, H.M. 2004. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science*, 117: 2641-2651.
- BOARD, P.G.; BAKER, R.T.; CHELVANAYAGAM, G.; JERMIIN, L.S. 1997. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to

- humans. *Biochemical Journal*, 328: 929-935.
- BOND, J.G.; MARINA, C.F.; WILLIAMS, T. 2004. The naturally derived insecticide spinosad is highly toxic to *Aedes* and *Anopheles* mosquito larvae. *Medical Veterinary Entomology*, 1: 50-6.
- BRUM J.G.W. 1988. Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* Grimont *et al.*, 1981: etiopatogenia e sazonalidade. Tese (Doutor em ciências). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, R.J.
- CADENAS, E.; DAVIES, K.J.A. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 29: 222-230.
- 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*, 138: 349–357.
- CASTRO, M.P.; PEREIRA, C. 1946. Alimentação das proteroninfas de *Boophilus (Uroboophilus) microplus* Canestrini, (Ixodidae) com os restos necróticos da reação tissular do hospedeiro. *Arquivos do Instituto de Biologia*. São Paulo, 17: 149-162.
- CHANDRASEKARAN, V.; BECKENDORF, S.K. 2003. Senseless is necessary for the survival of embryonic salivary glands in *Drosophila*. *Development*, 130: 4719-4728.
- CIPRANDI, A.; OLIVEIRA, S. K.; MASUDA, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. 2006. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Experimental Parasitology*, correct proof.

- CLAVERIA, C; TORRES, M. 2003. Mitochondrial apoptotic pathways induced by *Drosophila* programmed cell death regulators. *Biochemistry and Biophysics Research Communication*, 304: 531-537.
- CORDEIRO, A.T.; MICHELS, P.A.; DELBONI, L.F.; THIEMANN, O.H. 2004. The crystal structure of glucose-6-phosphate isomerase from *Leishmania mexicana* reveals novel active site features. *European Journal of Biochemistry*, 271: 2765-2772.
- COSSIO-BAYUGAR, R.; MIRANDA, E.; HOLMAN, P.J. 2005. Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 1378-1387.
- CRAMPTON, A.L.; BAXTER, G.D.; BARKER, S.C. 1999. Identification and characterisation of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemical and Molecular Biology*, 29: 377-384.
- DAMIENS, G.; HIS, E.; GNASSIA-BARELLI, M.; QUINIOU, F.; ROMEO, M. 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology and Pharmacology*, 138: 121-128.
- DANDAPAT, J.; CHAINY, G.B.; RAO, K.J. 2003. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology and Pharmacology*, 135: 221-233.
- DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S.J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*, 116: 205-219.

- DA SILVA VAZ JR., I.; LOGULLO, C. J.; SORGINE, M.; VELLOSO, F.F.; GONZALES, J.C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P. L.; MASUDA, A. 1998. Immunization of bovines with a new protein isolated from egg of *Boophilus microplus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 66: 331-341.
- DA SILVA VAZ JR., I.; TORINO LERMEN, T.; MICHELON, A.; FERREIRA, C.A.S.; FREITAS, D.R.J.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. 2004. Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*, 119: 237-245.
- DAVEY, R.B.; COOKSEY, L.M. 1989. Effects of prolonged exposure at low temperature on *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 26: 407-410.
- DAVEY, R.B.; GEORGE, J.E. 1998. *In vitro* and *in vivo* evaluations of a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) selected for resistance to permethrin. *Journal of Medical Entomology*, 35, 1013-1019.
- 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.
- DAVEY, R.B., GEORGE, J.E.; SNYDER, D.E. 2001. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Veterinary Parasitology*, 99: 41-52.
- DECOTTO, E.; SPRADLING, A.C. 2005. The *Drosophila* ovarian and testis stem cell niches: similar somatic stem cells and signals. *Developmental Cell*, 9: 501-510.
- DING, Y.; ORTELLI, F.; ROSSITER, L.C.; HEMINGWAY, J.; RANSON, H. 2003.

- The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics*, 4: 35.
- DIXON, D.P.; LAPHORN, A.; EDWARDS, R. 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3: REVIEWS3004.
- DUCORNEZ, S.; BARRE, N.; MILLER, R.J.; GARINE-WICHATITSKY, M. 2005. Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test. *Veterinary Parasitology* 130: 285–292.
- EDINGER, A.L.; THOMPSON, C.B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16: 663-669.
- ESTRADA-PENA, A.; MARTINEZ, J.M.; SANCHEZ ACEDO, C.; QUILEZ, J.; DEL CACHO, E. 2004. Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). *Medical Veterinary Entomology*, 18: 387-397.
- FARIAS, N.A.R.; GONZALES, J.C.; SAIBRO J.C. 1986. Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 21: 1313-1320.
- FERNANDES, E.K.K.; COSTA, G.L.; MORAES, Á.M.L.; ZAHNER, V.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2006. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. *Parasitology Research*, 98: 324-332.
- FERREIRA C.A.; BARBOSA M.C.; SILVEIRA T.C.; VALENZUELA J.G.; DA SILVA VAZ JR. I.; MASUDA A. 2002. cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. *Parasitology*, 125: 265-74.
- FERREIRA, C.A.; DA SILVA VAZ JR., I.; DA SILVA, S.S.; HAAG, K.L.; VALENZUELA, J.G.; MASUDA, A. 2002. Cloning and partial characterization

- of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Experimental Parasitology*, 101: 25-34.
- FEYEREISEN, R.; KOENER, J.F.; FARNSWORTH, D.E. NEBERT, D.W. 1989. Isolation and sequence of cDNA encoding a cyto-chrome P-450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 86: 1465-1469.
- 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.
- FRASER, A.G. 1999. Programmed cell death in *C. elegans*. *Cancer Metastasis Review*, 18: 285-294.
- FRAZZON, A. P.; DA SILVA VAZ JR., I.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94: 117-125.
- FREITAS, D.R.J.; POHL, P.C.; DA SILVA VAZ, I. 2005. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33: 109-117.
- FREITAS, D.R.J.; DA SILVA VAZ, I. 2005. Estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra carrapato. *Revista Brahman Repórter*, v. 16, p. 1-2, 01 nov. 2005.

- GEORGE, J. E., 2000. Present and future technologies for tick control. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 916: 583-538.
- GEORGE, J.E.; POUND, J.M.; DAVEY, R.B. 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129: S353–S366.
- GOMES, A. 2000. Carrapato-de-boi: Prejuízos e controle. *EMBRAPA*. Campo Grande (MS), Dez, n.42. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD42.html>. Arquivo capturado em 03 de fevereiro de 2006.
- GONZALES J.C. 1975. O controle do carrapato bovino. Porto Alegre, Sulina.
- GONZALES, J.C. 1995. *O controle do carrapato do boi*. 2ed. Porto Alegre. Edição do Autor.
- 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: 9-16.
- GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; MUNOZ COBENAS, M. E.; SCHERLING, N.; GARCIA POSSE, F.; ANZIANI, O. S.; IOPPOLO, M. 2000. Moxidectin pour-on for control of natural populations of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 87: 237-241.
- HAJRA; K.M.; LIU, J.R. 2004. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis*, 9: 691-704.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press.

- HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45: 51-88.
- HE, H.; CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W.; GEORGE, J. E. 1999. Characterization and molecular cloning of glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect and Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 737-743.
- HEMINGWAY, J. 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect and Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1009–1015.
- HEMINGWAY, J.; FIELD, L.; VONTAS, J. 2002. An overview of insecticide resistance. *Science*, 298: 96-97.
- HIDALGO, A.; FFRENCH-CONSTANT, C.; 2003. The control of cell number during central nervous system development in flies and mice. *Mechanisms of Development*, 120: 1311-25.
- HOCHACHKA, P.W.; LUTZ, P.L. 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 130: 435-459.
- HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. 1985. Situação parasitária da pecuária no Brasil. *A hora Veterinária*, 23: 12-32.
- HUANG, F.; SUBRAMANYAM, B.; TOEWS, M.D. 2004. Susceptibility of laboratory and field strains of four stored-product insect species to spinosad. *Journal of Economic Entomology*, 6: 2154-2159.
- HURD, H; CARTER, V. 2004. The role of programmed cell death in *Plasmodium*-mosquito interactions. *International Journal of Parasitology*, 34: 1459-1472.

- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2006. Disponível *on line* no endereço <http://www.ibge.gov.br/>. Arquivo capturado em 07 de julho de 2006.
- JACOBSON, M.D.; WEIL, M.; RAFF, M.C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88: 347-354.
- JAMROZ, R.C.; GUERRERO, F.D.; PRUETT, J.H.; OEHLER, D.D.; MILLER, R.J., 2000. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Journal of Insect Physiology*, 46: 685-695.
- JOHNSTON, L.A.Y.; KEMP, D.H.; PEARSON, R.D. 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. *International Journal for Parasitology*, 16: 27-34.
- JONSSON, N.N.; MAYER, D.G.; GREEN, P.E. 2000. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Veterinary Parasitology*, 88: 79-92.
- KAI, T.; SPRADLING, A. 2004. Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature*, 428: 564-569.
- KAKEI, M.; IWAMI, M.; SAKURAI, S. 2005. Death commitment in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 51: 17-25.
- KELLY, E. A. B.; COLLEY, D. G. 1988. *In vivo* effects of monoclonal anti-I3t4 antibody on immune responsiveness of mice infected with *Schistosoma mansoni* - reduction of irradiated cercariae-induced resistance. *Journal of Immunology*, 140:2737-2745.
- KERR, J.F. 2002. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181-182:471-474.

- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26: 239-257.
- KETTERER, B.; COLES, B.; MEYER, D.J. 1983. The role of glutathione in detoxification. *Environmental Health Perspectives*, 49: 59–69.
- KETTERMAN, A.J.; PROMMEENATE, P.; BOONCHAUY, C.; CHANAMA, U.; LEETACHEWA, S.; PROMTET, N.; PRAPANTHADARA, L. 2001. Single amino acid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 65–74.
- KOCAN, K.M. 1995. Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle. *Veterinary Parasitology*, 57: 121-151.
- KOSTAROPOULOS, I.; PAPADOPOULOS, A.I.; METAXAKIS, A.; BOUKOUVALA, E.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. 2001. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 313–319.
- LABRUNA, M.B.; AMAKU, M.; METZNER, J.Á.; PINTER, A.; FERREIRA, F. 2003. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 40: 170-178.
- L'AMOREAUX, W.J.; JUNAID, L.; TREVIDI, S. 2003. Morphological evidence that salivary gland degeneration in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say), involves programmed cell death. *Tissue Cell*, 35: 95-99.
- LEAL, A.T.; FREITAS, D.R.J.; DA SILVA VAZ, I. 2003. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, 31: 01-11.

- LEE, A.J.; HUNTLEY, J.; VAN DEN BROEK, A.; COATES, D.; ISAAC, R.E. 2002. Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*, 105: 49-63.
- LEE, C.Y.; BAEHRECKE, E.H. 2001. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development*, 128: 1443-1455.
- LI, A.Y.; DAVEY, R.B.; MILLER, R.J.; GEORGE, J.E. 2005. Mode of inheritance of amitraz resistance in a Brazilian strain of the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 37: 183-198.
- LIU, S.; LI, Q. X. 2004. Photolysis of spinosyns in seawater, stream water and various aqueous solutions. *Chemosphere*, 11: 1121-1127.
- LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z. 2001. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, 2: 545-550.
- LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z. 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36: 2405-2419.
- LOGULLO, C.; DA SILVA VAZ JR., I.; SORGINE, M.H.F.; PAIVA-SILVA, G.O.; FARIA, F.S.; ZINGALI, R.; ROSA DE LIMA, M.; ABREU, L.; OLIVEIRA, E.F.; ALVES, E.W.; MASUDA, H.; GONZALES, J.C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P.L. 1998. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 116: 525-532.
- LUTZ, P.L.; STOREY, K. 1997. Strategies for dealing with variations in gas tensions — vertebrates and invertebrates. In: W. Danzler (Editor), *Handbook of Physiology, Section 13, Comparative Physiology*. American Physiology Society, Oxford University Press, 1479–1522.
- MACKAY, W.J.; BEWLEY, G.C. 1989. The genetics of catalase in *Drosophila melanogaster*: isolation and characterization of acatalasemic mutants.

- Genetics*, 122: 643-652.
- MANFREDINI, V.; MARTINS, V.D.; PERALBA, M. DO C.; BENFATO, M.S. 2005. Adaptative response to enhanced basal oxidative damage in sod mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 276: 175-181.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento), 2006. Disponível *on line* no endereço <http://www.agricultura.gov.br>. Arquivo capturado em 07 de julho de 2006.
- MAYA-MONTEIRO, C.M.; ALVES, L.R.; PINHAL, N.; ABDALLA, D.S.; OLIVEIRA, P.L. 2004. HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 81-88.
- MANERVICK, B.; WIDERSTEN, M. 1995. Human glutathione transferases: tissue distribution, structure and funcional properties. In: *Advances in Drug Metabolism in Man*. G. Pacific, and Fracchia (Eds). EUR 15439, ECDGX11-E4, 408-459.
- MARTIN T.; OCHOU O.G.; VAISSAYRE M.; FOURNIER, D. 2003. Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hubner) to triazophos in West Africa. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 9: 883-887.
- MARTINS, J.R.; FURLONG, J. 2001. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *The Veterinary Record*, 14: 64.
- MCCALL, M.R.; FREI, B. 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radicals Biology and Medicine*, 26: 1034–1053.

- MCCALL, K.; PETERSON, J.S. 2004. Detection of apoptosis in *Drosophila*. *Methods in Molecular Biology*, 282: 191-205.
- MCCOSKER, P.L. 1981. The global importance of babesiosis. In: Ristic, M. & Kreir, J. P. (Eds.). Babesiosis. New York, Academic Press.
- MYOHARA, M. 2004. Real-time observation of autophagic programmed cell death of *Drosophila* salivary glands *in vitro*. *Development Genes and Evolution*, 214: 99-104.
- MURRAY, D.A.; CRISPE, I.N. 2004. TNF-alpha controls intrahepatic T cell apoptosis and peripheral T cell numbers. *Journal of Immunology*, 173: 2402-2409.
- NUTTALL, P. A.; LABUDA, M. 2004. Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, 129: S177-S189.
- OAKESHOTT, J.G.; HORNE, I.; SUTHERLAND, T.D.; RUSSEL, R.J. 2003. The genomics of insecticide resistance. *Genome Biology*, 4: 202.
- OBERLEY, L.W. 1998. Role of antioxidant enzymes in cell immortalization and transformation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 84: 147–153.
- OLIVEIRA, U.O.; DA ROSA ARAUJO, A.S.; BELLO-KLEIN, A.; DA SILVA, R.S.; KUCHARSKI, L.C. 2005. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 140: 51-57.
- PAPADOPOULOS, A.I.; POLEMITOU, I.; LAIFI, P.; YIANGOU, A.; TANANAKI, C.; 2004. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica* kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. *Comparative Biochemistry and*

Physiology C, 139: 93-97.

- PEREIRA, L.S.; OLIVEIRA, P.L.; BARJA-FIDALGO, C.; DAFFRE, S. 2001. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental Parasitology*, 99: 66-72.
- PHILLIPS, J.S.; ADEYEYE, O.; BRUNI, D. 1995. Respiratory metabolism of the soft tick, *Ornithodoros turicata* (Duges). *Experimental and Applied. Acarology*, 19: 103-115.
- PRUETT, J. H. 1999. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. *International Journal for Parasitology*, 29: 25-32.
- PRUETT, J. H.; POUND, J. M. 2006. Biochemical diagnosis of organophosphate-insensitivity with neural acetylcholinesterase extracted by sonication from the adult tick synganglion. *Veterinary Parasitology*, 135: 355–363.
- REBRIN, I.; BAYNE, A. C.; MOCKETT, R. J.; ORR, W. C.; SOHAL, R. S. 2004. Free aminothiols, glutathione redox state and protein mixed disulphides in aging *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Journal*, 382: 131-136.
- RENARD, G.; GARCIA, J.F.; CARDOSO, F.C.; RICHTER, M.F.; SAKANARI, J.A.; OZAKI, L.S.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. 2000. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1017-1026.
- RENARD, G.; LARA, F.A.; DE CARDOSO, F.C.; MIGUENS, F.C.; DANSA-PETRETSKI, M.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. 2002. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Molecular Biology*, 11: 325-328.

- RICHARDSON, H.; KUMAR, S. 2002. Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. *Journal of Immunology Methods*, 265: 21-38.
- RIDING, G.A.; JARMEY, J.; MAKENNA, R.V.; PEARSON, R.; COBON, G.S.; WILLADSEN, P. 1994. A protective “concealed” antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *Journal of Immunology*, 153: 5158-5166.
- RIKANS, L.E.; HORNBROOK, K.R., 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochemica and Biophysica Acta*, 1362: 116–127.
- ROBERTS, J. A. 1968. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (Canestrini) II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest. *Journal of Parasitology*, 54: 667-673.
- ROBERTS, J. A.; KERR, J. D. 1976. *Boophilus microplus*: passive transfer of resistance in cattle. *Journal of Parasitology*, 62: 485-488.
- ROCHA, C.M.B.M. 1998. Aspectos relevantes da biologia do *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887). Lavras: UFLA, 1997. Boletim técnico: série Extensão da Universidade Federal de Lavras, ano VII.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; ALONSO-DIAZ, M.A.; RODRIGUEZ-AREVALO, F.; FRAGOSO-SANCHEZ, H.; SANTAMARIA, V.M.; ROSARIO-CRUZ, R. 2006. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 136: 335-342.
- ROSA DE LIMA, M.F.; SANCHEZ FERREIRA, C.A.; JOAQUIM DE FREITAS, D.R.; VALENZUELA, J.G.; MASUDA, A. 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-

- transferase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 747-754.
- SABATINI, G.A.; KEMP, D.H.; HUGHES, S.; NARI, A.; HANSEN, J. 2001. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 95:53-62.
- SALINAS, A.E., WONG, M.G., 1999. Glutathione S-transferases — a review. *Current Medicinal Chemistry*, 6: 279–309.
- SAMISH, M.; GLAZER, I. 2001. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends in Parasitology*, 17: 368-71.
- SARMA, G.N.; SAVVIDES, S.N.; BECKER, K.; SCHIRMER, M.; SCHIRMER, R.H.; KARPLUS, P.A. 2003. Glutathione reductase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: crystal structure and inhibitor development. *Journal of Molecular Biology*, 328: 893-907.
- SEIFERT, G.W.; SPRINGELL, P.H.; TATCHELL R.J. 1968. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*, 58: 415-430.
- SEIXAS, A.; DOS SANTOS, P.C.; VELLOSO, F.F.; DA SILVA VAZ JR., I.; MASUDA, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*, 126: 155-163.
- SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V.M.; DOWD, C.A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferase: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360: 1–16.
- SHI, Y. 2004. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Science*, 13: 1979-1987.

- SHRAIMAN, BI. 2005. Mechanical feedback as a possible regulator of tissue growth. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 102: 3318-3323.
- SIES, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215: 213-219.
- SONENSHINE, D.E., 1991. *Biology of Ticks*. 1st Ed. Vol. 1. Oxford University Press, New York.
- SORGINE, M.H.; LOGULLO, C.; ZINGALI, R.B.; PAIVA-SILVA, G.O.; JULIANO, L.; OLIVEIRA, P.L. 2000. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 28659-28665.
- SUTHERST, R. W.; JONES, R. J.; SCHNITZERLING, H. J. 1982. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. *Nature*, 295: 320-321.
- SUTHERST, R.W.; MAYWALD, G.F.; KERR, J.D.; SIEGEMAN, D.A. 1983. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34: 317-27.
- TELLAM, R.L.; KEMP, D.; RIDING, G.; BRISCOE, S.; SMITH, D.; SHARP, P.; IRVING, D.; WILLADSEN, P. 2002. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Veterinary Parasitology*, 103: 141-56.
- TERASHIMA, J.; YASUHARA, N.; IWAMI, M.; SAKURAI, S.; SAKURAI, S. 2000. Programmed cell death triggered by insect steroid hormone, 20-hydroxyecdysone, in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Developmental Genes and Evolution*, 210: 545-558.

- TIMOFEYEV, M.A. 2006. Antioxidant enzyme activity in endemic Baikalean versus Palaearctic amphipods: Tagma - and size-related changes. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 143: 302-308.
- VALKO M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC M.; MAZUR, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1–40.
- VONTAS, J. G.; SMALL, G. J.; NIKOU, D. C.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. 2002. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochemistry Journal*, 362: 329–337.
- WAGLAND, B. M. 1978. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animals. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 401-409.
- WEI, S.H.; CLARK, A.G.; SYVANEN, M. 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyperinsecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 1145–1153.
- WIKEL, S.K. 1996. Tick Modulation of Host Cytokines. *Experimental Parasitology*, 84: 304-309.
- WIKEL, S.K.; BERGMAN, D. 1997. Ticks-host immunology: significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*, 13: 383-389.
- 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: S367–S387.

- WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. 1988. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. *Parasitology Today*, 4: 196–198.
- WILLADSEN, P.; COBON, G.; MCKENNA, R.V. 1996. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunology*, 18: 241-246.
- WINSTON, G.W. 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 100: 173-176.
- YOUNG, A.S. & MORZARIA S.P. 1986. Biology of *Babesia*. *Parasitology Today*, 2: 211-219.
- Zheng, J.; Edelman, S.W.; Tharmarajah, G.; Walker, D.W.; Pletcher, S.D.; Seroude, L. 2005. Differential patterns of apoptosis in response to aging in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 102: 12083-12088.
- YIN, V.P.; THUMMEL, C.S. 2005. Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Seminaries of Cell Developmental Biology*, 16: 237-243.
- ZHIOUA, E.; BROWNING, M.; JOHNSON, P.W.; GINSBERG, H.S.; LEBRUN, R.A. 1997. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal for Parasitology*, 83: 815-818.

7. ANEXOS

ANEXO 1

Artigo publicado no periódico *Veterinary parasitology*, 119: 237-245, 2004.

Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase

Itabajara da Silva Vaz Jr., Tiago Torino Lermen, André Michelin, Carlos Alexandre Sanches Ferreira, Daniela Reis Joaquim de Freitas, Carlos Termignoni, Aoi Masuda



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Veterinary Parasitology 119 (2004) 237–245

veterinary
parasitology

www.elsevier.com/locate/vetpar

Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase

Itabajara da Silva Vaz, Jr. ^{a,b}, Tiago Torino Lermen ^a,
André Michelin ^e, Carlos Alexandre Sanchez Ferreira ^a,
Daniela Reis Joaquim de Freitas ^a, Carlos Termignoni ^{a,d},
Aoi Masuda ^{a,c,*}

^a Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C.P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C.P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C.P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^d Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, C.P. 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Pelotas, RS, Brazil

Accepted 18 November 2003

Abstract

In the present study, we report the effect of several acaricides on the enzyme activity of a *Boophilus microplus* recombinant glutathione S-transferase (rGST). GST was expressed in *Escherichia coli* and was purified with glutathione (GSH) affinity column chromatography. The kinetic constants were determined by reacting GST with the substrates 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and glutathione. We report the effect of several acaricides on the enzyme activity of rGST. Some acaricides (ethion, amitraz, chlorpyrifos, DDT, cypermethrin, diazinon, ivermectin, deltamethrin and flumethrin) inhibited rGST. Contrarily, coumaphos had an activating effect. Although the accurate mechanisms of the *B. microplus* resistance to acaricides remain elusive, this work helps in understanding how acaricides can interact with GST.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Boophilus microplus*; Glutathione S-transferase; Acaricides; Drug resistance

* Corresponding author. Tel.: +55-51-331-66078; fax: +55-51-331-67309.

E-mail address: aoi@dna.cbiot.ufgrs.br (A. Masuda).

1. Introduction

The tick *Boophilus microplus* is an obligate parasite, principally of cattle, and is recognized as the most important barrier to beef production in several areas of the world. Acaricide resistance to several classes of acaricides has been rapidly increasing as a result of the excessive selection pressure by long-term and intensive use of acaricides (Davey and George, 1998). Consequently, tick control is based almost totally on the application of a limited range of acaricides, essentially amitraz and synthetic pyrethroids (Jonsson et al., 2000; Aguirre et al., 2000).

Glutathione S-transferases (GSTs) are a group of enzymes that catalyze the conjugation between glutathione (GSH) and several molecules. These enzymes have a central role in detoxification of xenobiotic and endogenous compounds. In populations with a long history of chemical exposure, high GST activity is associated with resistance to insecticides (Wei et al., 2001; Ketterman et al., 2001). Resistance to organochlorine and organophosphate insecticides is specifically associated with increased GST activity (Vontas et al., 2000). These facts suggest that acaricide/insecticide conjugation to glutathione, which is catalyzed by GST, may be a detoxification mechanism in arthropods (Wei et al., 2001). Despite their enormous economic importance, the mechanisms of *B. microplus* resistance to pyrethroid and amitraz are still unknown. The lack of such knowledge is a constraint in the development of new control strategies. Previously, He et al. (1999a) reported the purification, characterization, and molecular cloning of a larval *B. microplus* GST. Partially and fully engorged female guts as well as partially engorged female salivary glands express a different GST (Rosa de Lima et al., 2002). However, the participation of these GSTs in the mechanisms of acaricide resistance has not been studied to date. The purpose of the study was to determine the effect of several acaricides on some enzymatic properties of a *B. microplus* recombinant GST. Results from this study could be of great value in developing new strategies against acaricide-resistant tick populations.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

In the study, we evaluated organophosphate acaricides (ethion, coumaphos, chlorpyrifos, and diazinon), pyrethroid acaricides (cypermethrin and flumethrin), a formamidine compound (amitraz), and a macrocyclic lactone endectocide (ivermectin). Ethion, amitraz, coumaphos, chlorpyrifos, DDT, cypermethrin, and diazinon were purchased from Chem-Service Inc. (USA). Ivermectin was purchased from Sigma (USA), and deltamethrin from Biomol Research Laboratories Inc. (USA). Flumethrin was a generous gift by Bayer S.A. (Brazil).

2.2. Cloning and expression of rBmGST

The cDNA of BmGST was previously obtained and expressed as fused to a β -galactosidase N-terminal portion (Rosa de Lima et al., 2002). In order to obtain BmGST without the

fusion protein, the mature BmGST-coding cDNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned in the expression vector pET5b (Novagen, USA). The upstream primer (TTTCATTTTCATATGGCACCTACTCCGGTC) includes the ATG start codon and an *NdeI* restriction site for cloning, while the downstream primer (CTCCTTGAATTCGCACTTTATTTGTGTCCCC) includes the stop codon and an *EcoRI* cloning restriction site. The amplified fragment was digested with *NdeI* and *EcoRI*, and ligated to *NdeI/EcoRI*-cut pET5b, resulting in a plasmid named pET-BmGST. Correct cloning was confirmed by sequencing and its expression was induced in the BL21 (DE3) *Escherichia coli* strain. BL21 (DE3)-pET-BmGST cells were collected after growth in Luria–Bertani medium. Recombinant protein expression was induced with 0.4 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 16 h at 30 °C. The cell pellet from a 2000 ml culture was suspended in 50 ml of phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.2; 0.01 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl) and frozen at –70 °C until used.

3. rBmGST purification

Cells were thawed and disrupted in a French press. Triton X-100 was added to the supernatant to a final concentration of 1% and centrifuged at 12,000 \times g. The clear supernatant was loaded onto a glutathione-Sepharose 4B column (Pharmacia Biotech Inc.), previously equilibrated with buffer A (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3). After being washed with the same buffer, the recombinant protein (named rBmGST) was eluted with buffer B (50 mM Tris–HCl + 10 mM glutathione; pH 8.0) according to the instructions of the manufacturer (Pharmacia Biotech Inc.).

Protein purity was monitored by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with 5% stacking gel and 12% running gel stained with Coomassie Blue G-250 and Western blot probed with an anti-GST rabbit serum (Rosa de Lima et al., 2002).

4. SDS-PAGE and Western blot

Fully and partially engorged female ticks were washed with PBS. The dorsal surface was dissected with a scalpel blade. Guts were separated with a fine-tipped forceps and washed in PBS. These materials were kept frozen at –70 °C until used.

The frozen tissues were thawed and protein extracts prepared according to da Silva Vaz et al. (1994). The protein concentrations of the extracts were measured using the Bradford method (Bradford, 1976) with bovine serum albumin as standard.

For SDS-PAGE and Western blot analysis, gut extracts (80 μ g protein per lane), BL21 (DE3)-BmGST extracts (30 μ g protein per lane), and purified rBmGST (4 μ g protein per lane) in sample buffer containing 2% SDS, 250 mM Tris (pH 6.8), 0.025% bromophenol blue, 5% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, and 5 M urea were applied to SDS-PAGE (12% gel) and transferred to a nitrocellulose membrane at 70 V for 1 h at 4 °C in 12 mM carbonate buffer (pH 9.9) (Dunn, 1986). The nitrocellulose sheet was blocked with 5% cow non-fat dry milk–PBS (pH 7.2) (BLOTTO) for 2 h at room temperature. Anti-GST rabbit serum (1:500) was incubated in BLOTTO overnight at 4 °C. After three washes in BLOTTO, goat

anti-rabbit IgG–phosphatase alkaline conjugate was incubated for 1 h at room temperature. After three washes with PBS, and once with revelation buffer (5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl in 100 mM Tris (pH 9.5)), the reaction was revealed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) in the revelation buffer.

5. Enzyme activity assay

rBmGST activity was measured as described by Habig et al. (1974) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (Sigma, USA) as substrate. Ninety microliters of the reaction mixture, consisting of 50 mM CDNB in methanol, 5 mM glutathione in 100 mM Tris–HCl (pH 7.5), and 10 μ l of purified enzyme in 100 mM Tris–HCl (pH 7.5; or buffer without enzyme in negative controls), were tested in a 96-well plate. The absorbance ($A_{340\text{nm}}$) was measured each 15 s in a VersaMAX microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA) at 25 °C. The concentration of the product formed was calculated using the extinction coefficient of 10.9mM cm⁻¹, corrected for the 96-well microplate light path. Results are expressed as the calculated mean of three separate experiments. Each assay was run in duplicate.

6. Inhibition studies

The inhibition studies were performed using the standard GST assay conditions described above in the absence or presence of various acaricides. Acaricide stock solutions were prepared in methanol. All assays, including controls, contained a constant concentration of methanol (5%). The results are expressed as the calculated mean of three separate experiments and each assay was run in duplicate. The data were analyzed using the *t*-test.

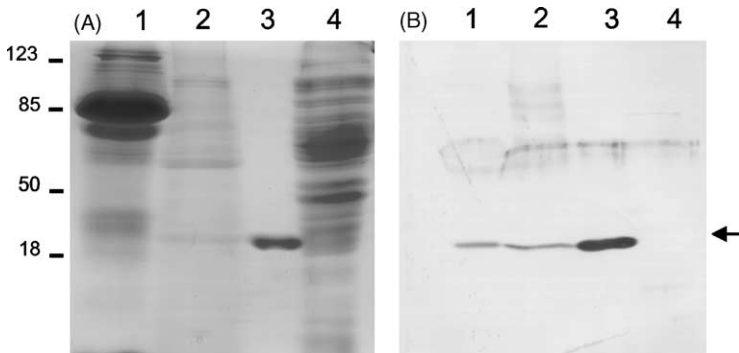


Fig. 1. (A) SDS-PAGE (12% gel performed under reducing conditions) and (B) Western blot of tissue extract and recombinant *B. microplus* GST. (A) Stained with Coomassie blue; (B) probed with rabbit serum anti-GST. (1) Fully engorged female gut extract; (2) BL21 (DE3)-rBmGST extract; (3) purified rBmGST; (4) BL21 (DE3) extract. Molecular weight markers $\times 10^3$.

Table 1
rBmGST kinetic constants for glutathione transfer to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene

Constant	Enzyme
V_{\max} (CDNB) ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	3981 ± 664
K_m (CDNB) (mM)	1.87 ± 0.22
V_{\max} (GSH) ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	2189 ± 5
K_m (GSH) (mM)	0.13 ± 0.04

The kinetic studies were performed using the standard GST assay conditions described above but at variable substrate concentrations. The initial rate of the enzymatic reaction was measured at 6 mM GSH with CDNB concentrations ranging from 0.2 to 3 mM and at 3 mM CDNB with GSH concentrations varying from 0.025 to 6 mM. Inhibitory studies were performed in the presence of two different concentrations of each inhibitor. The kinetic constants K_m , V_{\max} and K_i were determined by non-linear regression analysis using an Excel worksheet (Hernandez and Ruiz, 1998).

7. Results

The pET5b-BmGST plasmid was transformed and expressed in *E. coli*. Coomassie-stained SDS-PAGE and Western blot analyses of the rBmGST purified by GSH affinity column chromatography showed that it was obtained as a pure preparation. Only a single

Table 2
Inhibition of rBmGST activity by acaricides

	Inhibition (%)	S.D.
Pyrethroids		
Deltamethrin	12.94	± 19.31
Flumethrin	34.02*	± 4.59
Cypermethrin	17.92*	± 2.74
Formamide		
Amitraz	13.98*	± 5.61
Organochlorines		
DDT	13.72*	± 7.93
Phosphorothioates		
Diazinon	12.24*	± 6.70
Coumaphos	-82.69*	± 6.33
Ethion	19.18*	± 5.04
Chlorpyrifos	21.91*	± 10.45
Avermectin		
Ivermectin	0.18	± 3.13

All acaricides were assayed at a final concentration of 0.1 mM. The concentrations of glutathione and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene were 5 and 1 mM, respectively. Data are the calculated mean (\pm S.D.) of three experiments, and each assay was performed in duplicate. There is a significant difference (* $P < 0.05$) in relation to the control (without acaricide).

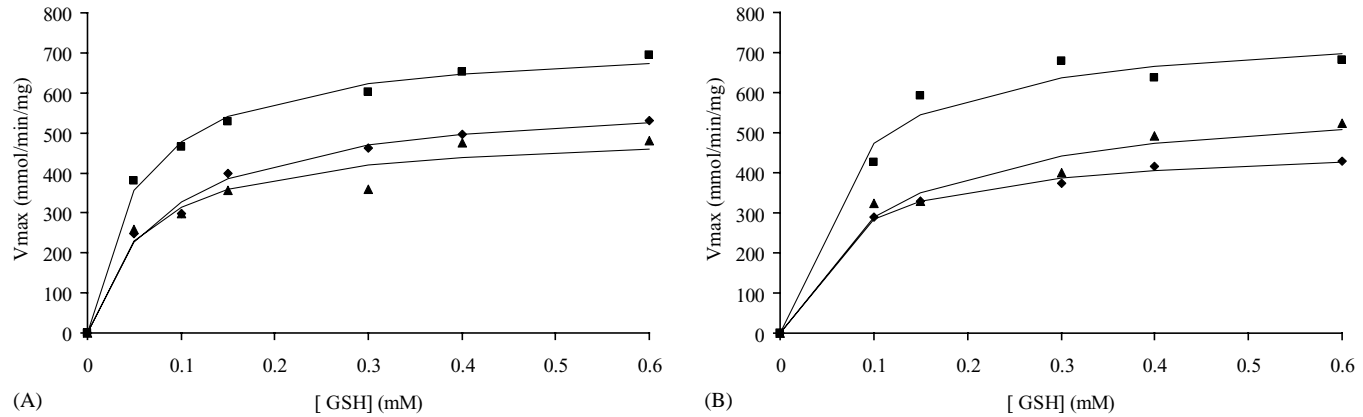


Fig. 2. GSH activity dependence on the substrate concentration. Several glutathione (0.6–0.05 mM) concentrations at a fixed CDNB (3 mM) concentration in the presence of 0.1 mM (▲) or 0.05 mM (◆) or absence (■) of flumethrin (A) or ethion (B). The reactions were carried out in 100 mM Tris–HCl (pH 7.5) at 25 °C.

protein band, having a molecular mass of 25,500 (identical to the native protein (BmGST)), was observed in both methods (Fig. 1), confirming the recombinant protein identity.

Preliminarily, the conditions to perform rBmGST activity assays at initial velocities were determined (data not shown). The kinetic constants were determined by measuring rBmGST activity using CDNB and GSH as substrates at concentrations ranging from 3 to 0.2 mM and from 6 mM to 25 μ M, respectively (Table 1). Acaricide interference in the rBmGST activity seems to be unique for each compound (Table 2), although none of the tested acaricides inhibits GST activity completely. Except for ivermectin, which does not inhibit GST at all, other acaricides inhibit GST activity in 12–34% compared to control group. Contrarily, coumaphos has an activating effect.

Two acaricides, ethion and flumethrin, were chosen to perform more detailed studies. Lineweaver–Burk plots showed that they are non-competitive inhibitors. The K_i values for ethion and flumethrin are 17 and 27 μ M, respectively (Fig. 2).

8. Discussion

The role played by cytochrome P450, acetylcholinesterase, voltage-dependent sodium channel, and GST in insecticide resistance has been demonstrated for various insect species (Casida and Quistad, 1998). Moreover, the overexpression of GST is highly correlated with resistance to insecticides, particularly organophosphorous compounds (Wei et al., 2001). However, there are few studies regarding the association of biochemical mechanisms with drug resistance in ticks (Jamroz et al., 2000). Results of the study showed that rBmGST activity is sensitive to various compounds used in commercial acaricides.

The expression of a *B. microplus* GST as a recombinant protein fused with a fragment of β -galactosidase was previously reported (Rosa de Lima et al., 2002). In order to determine some of its properties while avoiding any possible contribution from the β -galactosidase moiety, the tick GST was expressed without any fused protein.

The SDS-PAGE analysis shows that the rBmGST preparation was obtained in a pure form and its relative molecular mass (25,500) is identical to that of the native protein (Fig. 1). The molecular mass and K_m of rBmGST occur at the same range as those of some insect GSTs (Prapanthadara et al., 1996; Jirajaroenrat et al., 2001).

Insect GSTs are inhibited by organophosphates, organochlorines, and pyrethroids (Hemingway, 2000). The direct participation of GSTs in the mechanism of insecticide detoxification (Prapanthadara et al., 2000) as well as the overexpression of the GST in pesticide-resistant strains of insects (Wei et al., 2001) have been reported. In contrast, tick resistance mechanisms are poorly understood, although pesticide resistance has been detected in routine screening (Aguirre et al., 2000).

This study demonstrated the effect of various acaricides on the rBmGST catalytic properties. The rBmGST sensitivity for acaricides is similar to *Anopheles dirus* GST-5 (Prapanthadara et al., 2000). None of the acaricides tested completely abolished the rBmGST activity. As shown by other authors, the profile of interaction with chemical compounds is characteristic of each GST (Ketterman et al., 2001; Jirajaroenrat et al., 2001). Also, considerable differences have been proven to exist in the interactions between different isoenzymes of GST and the same chemical compounds (Papadopoulos et al., 2000;

Prapanthadara et al., 2000). Moreover, as shown by the double-reciprocal Lineweaver–Burks plots, ethion and flumethrin are non-competitive inhibitors. This lower rBmGST sensitivity to acaricides, when compared to GSTs of other species, may be a characteristic of BmGST or could be derived from a misfolding in the recombinant protein. Interestingly, coumaphos had an activation effect on rBmGST activity. This activation effect is not expected and the biological significance of this observation remains uncertain.

BmGST is expressed in partially and fully engorged female guts as well as in partially engorged female salivary glands (Rosa de Lima et al., 2002). The presence of BmGST in these tissues is in agreement with the role played in cellular detoxification by xenobiotic compounds and/or digestive processes. Since an adult tick ingests more blood from the host than the larvae do, it is conceivable that different GSTs are produced to perform some physiological functions such as protection from the oxidative attack by oxygen and oxygen-associated free radicals, and detoxifications of xenobiotics (Ishibashi et al., 1997; Senjo et al., 1985). This hypothesis concurs with the idea that the feeding success of ticks and xenobiotic detoxication are essential mechanisms to the survival of ticks.

The use, and misuse, of acaricides in tick control programs subject the parasites to a selective pressure and allow the survival of acaricide-resistant *B. microplus* populations. As resistant insect populations have a higher GST activity than non-resistant populations, the same association between acaricide-resistant ticks and higher GST activity seems reasonable, in spite of the fact that the molecular basis of resistance has not yet been described in ticks (He et al., 1999b). Further studies on the GST activity of acaricide-treated ticks as well as comparisons between acaricide-resistant and -susceptible ticks will assist in the understanding of the GST importance in tick acaricide resistance mechanisms.

Acknowledgements

We thank Mario Pulga from Bayer S.A. for providing the flumethrin used in this research.

References

- Aguirre, D.H., Vinabal, A.E., Salatin, A.O., Cafrune, M.M., Volpogni, M.M., Mangold, A.J., Guglielmo, A.A., 2000. Susceptibility to two pyrethroids in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) populations of northwest Argentina. Preliminary results. *Vet. Parasitol.* 88, 329–334.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.* 43, 1–16.
- da Silva Vaz Jr., I., Ozaki, L.S., Masuda, A., 1994. Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissues. *Vet. Parasitol.* 52, 71–78.
- Davey, R.B., George, J.E., 1998. In vitro and in vivo evaluations of a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) selected for resistance to permethrin. *J. Med. Entomol.* 35, 1013–1019.
- Dunn, S.D., 1986. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western-blot by monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* 157, 144–153.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.

- He, H., Chen, A.C., Davey, R.B., Ivie, G.W., George, J.E., 1999a. Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 737–743.
- He, H., Chen, A.C., Davey, R.B., Ivie, G.W., Wagner, G.G., George, J.E., 1999b. Sequence analysis of the knockdown resistance-homologous region of the para-type sodium channel gene from pyrethroid-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 36, 539–543.
- Hemingway, J., 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 1009–1015.
- Hernandez, A., Ruiz, M.T., 1998. An EXCEL template for calculation of enzyme kinetic parameters by non-linear regression. *Bioinformatics* 14, 227–228.
- Ishibashi, M., Akazawa, S., Sakamaki, H., Matsumoto, K., Yamasaki, H., Yamaguchi, Y., Goto, S., Urata, Y., Kondo, T., Nagataki, S., 1997. Oxygen-induced embryopathy and the significance of glutathione-dependent antioxidant system in the rat embryo during early organogenesis. *Free Radical Biol. Med.* 22, 447–454.
- Jamroz, R.C., Guerrero, F.D., Pruett, J.H., Oehler, D.D., Miller, R.J., 2000. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *J. Insect Physiol.* 46, 685–695.
- Jirajaroenrat, K., Pongjaroenkit, S., Krittanai, C., Prapanthadara, L., Ketterman, A.J., 2001. Heterologous expression and characterization of alternatively spliced glutathione S-transferases from a single *Anopheles* gene. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 867–875.
- Jonsson, N.N., Mayer, D.G., Green, P.E., 2000. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Vet. Parasitol.* 88, 79–92.
- Ketterman, A.J., Prommeenat, P., Boonchaay, C., Chanama, U., Leetachewa, S., Promtet, N., Prapanthadara, L., 2001. Single amino acid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 65–74.
- Papadopoulos, A.I., Boukouvala, E., Kakaliouras, G., Kostaropoulos, J., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2000. Effect of organophosphate and pyrethroid insecticides on the expression of GSTs from *Tenebrio molitor* pupae. *Pestic. Biochem. Physiol.* 68, 26–33.
- Prapanthadara, L., Koottathep, S., Promtet, N., Hemingway, J., Ketterman, A.J., 1996. Purification and characterization of a major glutathione S-transferase from the mosquito *Anopheles dirus* (species B). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 277–285.
- Prapanthadara, L., Promtet, N., Koottathep, S., Somboon, P., Ketterman, A.J., 2000. Isoenzymes of glutathione S-transferase from the mosquito *Anopheles dirus* species B: the purification, partial characterization and interaction with various insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 395–403.
- Rosa de Lima, M.F., Sanchez Ferreira, C.A., Joaquim de Freitas, D.R., Valenzuela, J.G., Masuda, A., 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 747–754.
- Senjo, M., Ishibashi, T., Imai, Y., 1985. Purification and characterization of cytosolic liver protein facilitating heme transport into apocytochrome b5 from mitochondria. Evidence for identifying the heme transfer protein as belonging to a group of glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 260, 9191–9196.
- Vontas, J.G., Enayati, A.A., Small, G.J., Hemingway, J., 2000. A simple biochemical assay for glutathione S-transferase activity and its possible field application for screening glutathione S-transferase-based insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 68, 184–192.
- Wei, S.H., Clark, A.G., Syvanen, M., 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyperinsecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 1145–1153.

ANEXO 2

Artigo publicado no periódico *Acta Scientiae Veterinariae*, 31: 01- 11, 2003.

Perspectivas para o controle do carrapato bovino

Alexandre Trindade Leal, Daniela Reis Joaquim de Freitas e Itabajara da Silva
Vaz Jr.



PERSPECTIVAS PARA O CONTROLE DO CARRAPATO BOVINO

PERSPECTIVES FOR CONTROL OF BOVINE TICK

Alexandre Trindade Leal¹, Daniela Reis Joaquim de Freitas¹
& Itabajara da Silva Vaz Jr.²

RESUMO

O carrapato *Boophilus microplus* é um ectoparasita de bovinos, presente em áreas tropicais e subtropicais na América, África, Ásia e Austrália. O método atual para o controle do carrapato bovino *Boophilus microplus* é o uso de acaricidas. Porém, este método é caro devido aos custos das drogas e aos da mão de obra exigida para a sua aplicação. Também, existem relatos de carrapatos resistentes a diversos acaricidas. Além disso, os resíduos químicos na alimentação e a poluição ambiental são uma grande preocupação a ser considerada. Para superar estes problemas, métodos alternativos não-químicos incluem o uso de animais geneticamente resistentes, o desenvolvimento de vacinas, o gerenciamento de pastagem com alternância de espécies e o controle biológico. Neste momento, a proteção induzida por vacinas não é suficiente para permitir o controle do *B. Microplus*. Entretanto, os resultados sugerem ser possível o uso combinado destes métodos para o controle do carrapato a fim de reduzir o uso de acaricidas químicos.

Descritores: *Boophilus microplus*, vacina, controle, acaricida.

ABSTRACT

The tick *Boophilus microplus* is an ectoparasite of bovine, present in tropical and subtropical areas, as America, Asia, Africa and Australia. The current method for the control of the cattle tick *B. microplus* is the use of chemicals. However, this method is expensive due to the costs of both drugs and to the labor required to apply treatment. Moreover, there are observations of tick isolates resistant to the acaricides. In addition, chemical residues in food and environmental pollution are a major concern nowadays. To overcome these problems alternative non-chemical methods to control the cattle tick are under development. The non-chemical methods include the use of genetically resistant cattle, the development of vaccines, pasture management, alternate grazing of different species of hosts and biological control. In this moment, the protection induced by vaccination is not enough to permit the control of the *B. microplus*. However, the results suggest that it is possible to envisage the combined use of these methods for the control of cattle tick in order to reduce the use of chemical acaricides.

Key words: *Boophilus microplus*, vaccine, control, acaricide.

Introdução

O carrapato *Boophilus microplus* é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, cujo principal hospedeiro é o bovino. Encontra-se amplamente distribuído nos grandes rebanhos bovinos da América, África, Ásia e Oceania entre os paralelos 32°N e 32°S [36], sendo um dos principais parasitos que afetam a pecuária destas áreas.

B. microplus acarreta diversos danos econômicos [34], tornando-se o principal alvo de programas de controle e erradicação nos rebanhos da América do Sul [52], pois um carrapato bovino suga, em média, de 2 a 3mL de sangue do seu hospedeiro [26], o que se reflete em grandes perdas na produção de leite e carne [71] e danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato [67]. Também, o carrapato pode atuar como vetor de doenças, como a tristeza parasitária bovina, causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela ricketsia do gênero *Anaplasma* [49, 78]. Além disso, existem diversos prejuízos relacionados à mão-de-obra necessária para o controle desse parasita, despesas com instalações, compra de equipamentos adequados para aplicação de carrapaticida nos rebanhos e aquisição de carrapaticidas [9]. Estudos recentes na Austrália, calculam uma perda anual de 4 milhões de dólares na criação de gado, 49% desta perda devido aos custos do controle do carrapato e 51% devido a perdas na produção de leite, carne e couro [37].

Métodos de controle

O método de controle para o carrapato que mais tem sido utilizado desde a década de 50 é o uso de acaricidas [56]. Apesar de atualmente ser o único método eficaz é também dispendioso, além de poder causar danos ao meio ambiente e à saúde pública, através da contaminação de rios e solos. Ao longo destas décadas, foram utilizados, seqüencialmente, acaricidas baseados em compostos arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamato, formamidas e piretróides. A troca dos princípios ativos tem sido uma necessidade devido ao surgimento de populações resistentes. Os três mais recentes grupos químicos de produtos contra o carrapato que se encontram disponíveis hoje no mercado são: as formamidas, os piretróides e as avermectinas [29]. Diversos autores têm demonstrado a crescente resistência apresentada por carrapatos a compostos químicos presentes nos carrapaticidas [12]. A resistência para organofosforados tem sido reportada desde 1963, quando foi des-

crito, na Austrália, um caso de resistência para dioxation, carbophenothion, diazinon e carbamyl, [66]. O *B. microplus* pode apresentar resistência mais rapidamente que outros carrapatos, presumivelmente, pelo menor período de tempo entre as gerações [40], o que demonstra a necessidade de desenvolver novas formas de controle desta espécie.

Portanto, devido aos problemas de resistência, ao alto custo dos produtos químicos e da mão-de-obra na aplicação dos produtos, bem como o aparecimento de resíduos tóxicos na carne e no leite e a contaminação do ambiente, têm-se procurado novos métodos como formas alternativas de controle do carrapato [53, 56]. Atualmente, os controles biológico e imunológico já constituem parte de programas de controle integrado de ectoparasitas, que ainda exigem a utilização de produtos químicos para maior estabilidade operacional [56].

Controle biológico

Os controles biológicos incluem a seleção de raças menos sensíveis ao carrapato; cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das fases de vida livre [21, 70]; ação de predadores naturais, como a garça vaqueira *Egretta ibis* [1] e formigas [26].

Espécies parasitas também podem contribuir para a manutenção de baixos níveis populacionais de carrapato. Bactérias, como *Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* são naturalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato. Existem relatos de uma diminuição de até 47% na quantidade de ovos postos quando fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* eram imersas em suspensão de *C. lapagei* [6]. A utilização de fungos no controle do carrapato tem sido muito estudada nos últimos anos, como o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, altamente patogênico para o carrapato *Ixodes scapularis* [79]. Demonstrou-se que os fungos *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* induzem uma taxa de mortalidade de aproximadamente 30% em *Rhipicephalus appendiculatus* adultos alimentados em coelhos, enquanto que *M. anisopliae* induzem uma mortalidade de 37% em *Amblyomma variegatum* adultos. E estes fungos não perdem sua capacidade de infecção sobre o carrapato quando são incubados com acaricida por mais de 5 dias, mantendo o crescimento e suas características morfológicas normais [38]. Experimentos *in vitro* com 12 isolados de *M. anisopliae* sobre

fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* mostram que, dependendo da concentração de esporos na suspensão utilizada, alguns isolados de *M. anisopliae* podem causar morte de até 100% dos carrapatos infectados [24]. Já foram identificados isolados de *M. anisopliae* ocorrentes no Brasil infestantes naturais de *B. microplus* [14]. Outros organismos parasitas, tais como nematódeos, tem sido também avaliados como ferramentas no controle biológico de carrapatos, já que têm se mostrado eficientes no controle de insetos [63].

Uma outra estratégia envolvendo controle biológico do carrapato é a utilização de compostos naturais como pesticidas. Davey et al. [18] testaram em bovinos diferentes concentrações de “spinosad”, um acaricida natural de *Sacharopolyspora spinosa* (actinomiceto), advindo da mistura de dois metabólitos deste organismo, espinosina A e D, obtidos sob condições de fermentação. Os resultados mostram uma queda drástica no número de fêmeas ingurgitadas, na massa de ovos e no índice de fecundidade. Guglielmone et al. [28] mostraram que bovinos banhados em moxidectina, um composto endectocida que também atua como anti-helmíntico, tinham um controle de quase 95% na infestação de carrapatos.

Controle imunológico

O controle de ectoparasitas através de vacinação tem sido estudado nas últimas cinco décadas. Aliado a isso, o rápido desenvolvimento da biotecnologia tem alavancado o desenvolvimento de novas vacinas. Para o desenvolvimento de uma vacina é necessário, além da identificação de proteínas capazes de induzir uma resposta imune protetora, o conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica do animal. Bovinos infestados naturalmente com carrapatos desenvolvem linfócitos T e B de memória, que permitem uma resposta mais eficiente em futuras infestações [76]. A importância dos linfócitos T na indução e manutenção de uma resposta eficaz foi bem definida, apesar de não estar totalmente esclarecida a importância de cada tipo de resposta (celular ou humoral) para a proteção contra o carrapato.

A teoria dos “antígenos ocultos”, aqueles não expostos ao sistema imune do hospedeiro durante uma infestação natural e, o achado de uma proteína de intestino (Bm86) com essa característica significaram um grande avanço no desenvolvimento de vacinas contra *B. microplus*. A Bm86 induz resposta

imunológica em bovinos imunizados e é a base de duas vacinas comerciais presentes no mercado: a TickGard, desenvolvida na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO, e a Gavac, desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba. As duas vacinas são produzidas em sistema heterólogo, porém, a proteína da TickGard é obtida em *E. Coli* e a da Gavac em *Pichia pastoris*. Embora essas vacinas estejam comercialmente disponíveis, elas não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas [37, 77]. O grupo australiano descreveu e avaliou um segundo antígeno oculto, denominado Bm91, que foi associado a Bm86 e aumentou a eficácia parcial da vacinação [60, 77].

Embora os antígenos ocultos sejam a base das vacinas comerciais e tenham sido estudados em outros ectoparasitas, como *Lucilia cuprina* e *Pediculus humanus* [75], experimentos com antígenos naturalmente expostos ao sistema imunológico do hospedeiro associado a antígenos ocultos, demonstram o potencial da associação de diferentes alvos em uma mesma vacina [75].

A busca de novos antígenos

Portanto, a identificação de novas moléculas e suas funções bioquímicas representam um campo fértil para o conhecimento dos mecanismos de interação parasita-hospedeiro e para obtenção de novos antígenos com potencial protetor. Além dos antígenos que compõem as vacinas comercialmente disponíveis descritas acima, outras proteínas que também conferem algum grau de imunoproteção ou induzem a produção de anticorpos que interferem no sucesso reprodutivo do carrapato tem sido descritas.

Uma glicolipoproteína de massa molecular 50.000, chamada de BYC (Boophilus Yolk Cathepsina), foi detectada em ovos embrionários de *B. microplus*, onde parece atuar sobre a degradação da vitelina, a principal proteína de reserva dos ovos do carrapato [46]. A BYC é sintetizada no corpo gorduroso, secretada para a hemolinfa e captada pelo ovócito em crescimento e representa entre 5-8 % das proteínas do ovo, sendo ativada por proteólise limitada durante a embriogênese [46]. Bovinos imunizados com BYC produziram imunoglobulinas que apareceram circulantes na hemolinfa de carrapatos que parasitaram estes animais. As imunoglobulinas circulantes na hemolinfa mantiveram sua atividade biológica, medida

pela capacidade de ligação ao antígeno correspondente, o que indicou que os anticorpos podem atravessar o epitélio intestinal, e possivelmente reagir com antígenos localizados nos tecidos do meio interno do carrapato [16]. Esses dados foram reforçados pela inoculação de teleóginas com anticorpos monoclonais anti-BYC [BrBm5], que reduziram a taxa de sobrevivência entre 5,4% e 60% e o peso de ovos entre 2,5% e 52%, respectivamente, para dose de 10µg e 50µg, demonstrando que os efeitos foram dependentes da concentração de anticorpos inoculados [17]. Quando bovinos imunizados com BYC foram desafiados com larvas infestantes houve redução no número de teleóginas, capacidade de postura e na fertilidade dos ovos, com eficácia variando entre 14% e 36% em dois experimentos independentes. Os níveis de anticorpos declinaram gradualmente após a infestação e responderam positivamente a um reforço vacinal, aplicado 11 meses após a infestação, indicando a existência de memória imunológica para esse antígeno [17].

Inibidores de tripsina (BmTIs) foram detectados em concentrações variáveis nas diferentes fases de desenvolvimento do *B. microplus*, indicando um possível papel na interação parasita-hospedeiro. Esses BmTIs, purificados de larvas, tiveram sua atividade inibidora para tripsina comprovada através de zimograma reverso e foram usados como antígeno para imunização de bovinos [2]. Bovinos foram imunizados com BmTIs e após desafiados com larvas de *B. microplus*. Os níveis de IgG anti BmTIs, monitorados por ELISA, tiveram seu pico 40 dias após a primeira imunização (título 8.000) e apresentaram diminuição após a infestação, atingindo 50% do título máximo 3 meses após o desafio. A ausência de anticorpos anti-BmTIs nos bovinos usados como controle sugere que esse antígeno não é reconhecido na infestação natural. Os bovinos imunizados apresentaram redução de 67,9% no número total de carrapatos, 71,3% no peso total de ovos e 69,5% no peso total das fêmeas ingurgitadas, quando comparados aos bovinos controles. Os demais parâmetros (peso dos ovos/número de carrapatos, peso das fêmeas ingurgitadas/ animal, peso dos ovos/peso das fêmeas ingurgitadas) não tiveram diferenças significativas em relação ao grupo controle. A eficácia final da vacinação com BmTIs foi de 72,8% [2].

Visando melhorar os resultados obtidos com a proteína Bm86, foram desenvolvidos 3 peptídeos sintéticos derivados dessa glicoproteína de intestino [55].

A partir de análise da Bm86 e da avaliação de algumas propriedades da proteína, como potencial hidrofóbico e hidrofílico, foram definidos três possíveis determinantes imunogênicos com 14 a 15 aminoácidos. Bovinos foram imunizados com os peptídeos sintetizados e após infestados com 1.500 larvas de *B. microplus*. Anticorpos (IgG) gerados contra os peptídeos sintéticos atingiram títulos entre 400 e 2.400, obtidos após 2 ou 3 imunizações e reconheceram a proteína Bm86 *in situ*, especialmente no interior dos vacúolos digestivos. Os resultados da infestação experimental demonstraram uma eficácia de 72,4%, 81,05% e 35,87% nos bovinos imunizados com peptídeo A (SBm4912), B (SBm7462) e C (SBm19733), respectivamente [55].

O potencial imunogênico da vitelina, principal proteína de reserva do ovo, foi avaliado em experimentos de imunização, usando ovinos como modelo experimental [73]. A espécie ovina tem sido utilizada como modelo para identificação e avaliação de novos antígenos. No referido estudo, foram avaliadas duas glicoproteínas derivadas do complexo vitelina, uma de 87 kDa (VIT87) e outra de 80 kDa (GP80), purificadas a partir de ovos e larvas, respectivamente. VIT 87 e GP80 foram idênticas em no mínimo 11 resíduos de aminoácidos na extremidade aminoterminal, demonstrando serem altamente relacionadas, porém não idênticas [73]. Ovinos imunizados com VIT87 ou GP80 foram desafiados com 10 fêmeas e 10 machos de carrapatos adultos. A eficácia global da imunização, mensurada pela redução no número de larvas após um ciclo completo, foi de 68% com VIT87 e 66% com GP80. No mesmo estudo, os autores relataram a avaliação de uma GP80 expressa em *E. coli*. Entretanto, os resultados obtidos em ovinos imunizados com a proteína recombinante não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Esse resultado pode estar relacionado a ausência de glicosilação ou a estrutura terciária incorreta da proteína recombinante obtida em *E. coli* [73]. Tendo em vista que os antígenos estudados até o momento são glicoproteínas, a ausência de glicosilação das proteínas heterólogas obtidas em sistema procariota é um problema potencial no desenvolvimento vacinas recombinantes contra o *B. microplus*. Porém, essa dificuldade pode ser contornada pela utilização de um sistema de expressão eucarioto.

Outra metodologia utilizada é a produção de anticorpos monoclonais, que têm sido uma valiosa

ferramenta na caracterização de antígenos envolvidos na resposta protetora contra parasitas [39]. Além de auxiliar no estudo da fisiologia do carrapato, a identificação e caracterização de proteínas alvo de monoclonais auxilia a identificação e avaliação do potencial vacinal de novos antígenos. Um anticorpo monoclonal (denominado BrBm2), produzido a partir de extrato de intestino de *B. microplus*, reduziu em até 70% a capacidade de ovoposição e aumentou a mortalidade de teleóginas inoculadas na hemocele [74]. Esses efeitos foram dependentes da concentração de anticorpos inoculada. Outros monoclonais (BrBm1, BrBm3 e BrBm4) foram produzidos a partir da imunização de camundongos com extrato de embrião. O BrBm1 reage com antígenos presentes em diferentes tecidos e afetou a postura em aproximadamente 50%, enquanto BrBm3 e BrBm4 reconhecem a proteína vitelina e não afetaram a eficiência reprodutiva [74].

Antígenos relacionados a funções biológicas definidas

Além dos antígenos já avaliados imunologicamente, descritos anteriormente, várias moléculas envolvidas na fisiologia do carrapato e sua interação com o hospedeiro têm sido descritas por diversos grupos de pesquisa, o estudo dessas proteínas pode permitir a identificação de novos antígenos para vacinas.

Braz et al. [5], demonstraram que o *B. microplus* não sintetiza heme, obtendo da hemoglobina do hospedeiro o heme necessário para o seu desenvolvimento. Como consequência disso, o carrapato bovino desenvolveu, ao longo de sua evolução, mecanismos para obtenção e reciclagem de heme. A existência destes mecanismos foi comprovada pela purificação e caracterização de uma aspártico proteinase ligadora de heme [69]. Esta proteína, denominada THAP (Tick Heme-binding Aspartic Proteinase) foi o primeiro relato de uma proteinase capaz de ligar heme e ter sua atividade regulada por esta molécula. Aparentemente, o substrato natural dessa proteína é a vitelina, que no caso do carrapato, também é uma hemeproteína. A THAP apresenta um único sítio de ligação de heme, distinto do sítio catalítico, e que reconhece os resíduos de ácido propiônico laterais do anel porfirínico. A adição de heme ao meio de incubação inibe a hidrólise da vitelina pela THAP, demonstrando que a enzima é regulada pela disponibilidade de heme. Essa regulação é um provável mecanismo de controle do stress oxidativo

gerado pela degradação de heme [69]. Experimentos *in vitro* para mensurar a capacidade de ligação de heme a vitelina, demonstraram que cada molécula de vitelina é capaz de ligar até 31 moléculas de heme, reforçando a teoria de controle do stress oxidativo [45]. No mesmo estudo, os autores apresentaram evidências de que a vitelina é a principal reservatório de heme que, além de fornecer heme para o desenvolvimento embrionário durante sua degradação, liga-se a qualquer molécula de heme livre que exceda a quantidade necessária para o desenvolvimento embrionário [45].

Glutationa S-transferase (GSTs) é uma família multi-funcional de enzimas presentes em animais e vegetais. Suas funções incluem transporte intracelular, participação em processos digestivos, síntese de prostaglandinas e, principalmente, na detoxificação de substâncias tóxicas e na proteção ao stress oxidativo [44, 61]. Altos níveis de expressão de GST têm sido relacionados à resistência a inseticidas em vários organismos [61], além de estar associada a reações alérgicas mediadas por IgE [54]. Em *B. microplus* a GST foi isolada de larvas [30] e de glândula salivar [61]. Entretanto, ainda não foram demonstradas evidências correlacionando a expressão de GST a resistência frente aos acaricidas. Uma GST clonada a partir de uma biblioteca de cDNA de glândula salivar de partenógina foi usada para expressão de GST recombinante, que apresentou atividade enzimática contra o substrato CDNB. Ensaios de RT-PCR com tecidos de *B. microplus*, indicaram que os sítios de síntese de BmGST são glândulas salivares e intestino de partenógina e teleóquina [61].

Uma cisteíno endopeptidase degradadora de vitelina (VTDCE) foi purificada e caracterizada a partir de ovos de *B. microplus* [68]. Essa enzima é naturalmente associada à vitelina, sendo ativada por acidificação. Essa atividade foi demonstrada em larvas não alimentadas, ovários e ovos de fêmeas ingurgitadas, sugerindo um importante papel na embriogênese do carrapato bovino [68]. Assim como a BYC, o envolvimento na embriogênese associado à capacidade imunogênica fazem dessa cisteíno endopeptidase um antígeno potencial, que poderia ser utilizado em associação com a BYC [68].

Anteriormente, uma cisteíno endopeptidase recombinante já havia sido obtida de uma biblioteca de cDNA de larva de carrapato [58]. A expressão do clone em *E. coli* permitiu a obtenção da proteína recombinante (BmCL1), que foi capaz de hidrolisar diferentes substratos sintéticos assim como, hemoglo-

bina e vitelina, com atividade ótima em pH ácido. Análise por RT-PCR demonstrou que o gene é expresso no estágio larval do carrapato [58]. A proteína recombinante também foi utilizada para obtenção de anticorpo policlonal, que permitiu a localização desta proteína em larvas, partenóginas e teleóginas, através de western-blots. Em experimento de imunolocalização, a enzima foi detectada em células secretoras do intestino. Baseados nesses achados, os autores sugerem que a BmCL1 pode estar envolvida na degradação de hemoglobina no intestino de *B. microplus* [59].

Uma calreticulina (CRT), proteína que se liga a cálcio encontrada em um grande número de espécies e em todas as células nucleadas de mamíferos [50] foi identificada e caracterizada em *B. microplus* [23]. Suas possíveis funções incluem estocagem de cálcio, mediação da função de integrinas, ligação de C1q, lectina extracelular, chaperonina, além de inibir a expressão gênica regulada por esteróides [8]. A calreticulina humana é descrita como capaz de inibir a via clássica do sistema complemento pela sua ligação direta a C1q [42]. No carrapato *Amblyomma americanum* foi demonstrado a secreção de calreticulina pela saliva, sendo sugerido que atue modulando o sistema imune e/ou hemostase do hospedeiro [35]. Também foi citado que neste carrapato a calreticulina pode ser utilizada como biomarcador e que níveis de anticorpos contra esta proteína podem estar diretamente relacionados com índices de ingurgitação [64; 65]. A proteína recombinante (rBmCRT) foi utilizada na imunização de um bovino, porém ela não se mostrou imunogênica. Soro de bovinos naturalmente infestados também não reconheceram a rBmCRT [23]. Análises feitas por RT-PCR demonstraram que o seu mRNA é sintetizado em todos os tecidos e órgãos analisados [23]. A caracterização da presença da atividade anti-complementar na saliva do *B. microplus* poderá representar um significativo avanço na compreensão da importância da evasão do sistema complemento pelo carrapato, e na avaliação da possibilidade de inibindo a calreticulina, afetar sua viabilidade.

A paramiosina foi identificada e localizada em vários invertebrados, incluindo artrópodes, moluscos e nematódeos [47]. A função da paramiosina em músculo de invertebrados não é totalmente conhecida. Altos níveis de paramiosina em músculo de moluscos foram relacionados com o estado fisiológico conhecido como

“catch mechanism”. Esta condição permite longos períodos de tensão muscular com uma quantidade reduzida de energia. A paramiosina de *Schistosoma japonicum* tem sido testada como imunógeno em experimentos de vacinação. Experimentos de transferência passiva de anticorpos antiparamiosina demonstrando atividade protetora, têm estimulado a investigação da paramiosina como componente de uma vacina para esquistossomose [25]. Outra observação interessante é de que a paramiosina inibe ativação de complemento *in vitro*, sugerindo uma função de imunomodulação da resposta do hospedeiro [43]. O cDNA de uma paramiosina de *B. microplus* (BmPRM) foi isolado, caracterizado e expresso em *E. coli*, codificando uma proteína de 102kDa [22]. A sequência obtida mostrou alta similaridade à paramiosina de outros organismos. Anticorpos anti-BmPRM foram utilizados em Western-blots e demonstraram a presença de paramiosina em todos os tecidos e estágios de desenvolvimento do carrapato, mas não foi detectada na saliva. A rBmPRM ligou-se a IgG e ao colágeno. Essas características sugerem o envolvimento dessa proteína na modulação da resposta imunológica do hospedeiro [22].

Uma proteína inibidora de trombina, com massa molecular de 60kDa, foi purificada da saliva de *B. microplus* e teve sua atividade anticoagulante demonstrada [33]. Os resultados obtidos, demonstraram que a saliva do carrapato é capaz de inibir tanto a via intrínscica como extrínscica da coagulação, inibindo a atividade amidolítica da trombina, um fator comum às duas vias. A identificação de anticoagulantes na saliva do carrapato confirma a existência de mecanismos específicos que permitem o hematofagismo e pode ser um alvo para o controle do parasitismo [33].

Após evidenciar a presença de atividade kininase em extrato de glândula salivar de *B. microplus*, Bastiani et al. [3] purificaram e caracterizaram essa enzima, que foi chamada de BooKase. Os ensaios de atividade demonstraram que a BooKase é uma metaloendopeptidase ativada por tiol capaz de hidrolisar bradicinina, um peptídeo biologicamente ativo importante no controle da pressão sanguínea e na resposta inflamatória. Porém, essa atividade cininase não foi observada na saliva de teleóginas parcialmente ingurgitadas. Baseado nisso, os autores sugerem que o papel fisiológico da BooKase pode estar associado a estágios iniciais do parasitismo, como na saliva de larvas recém fixadas [3].

Os estudos realizados até o momento justificam a confiança sobre a viabilidade do desenvolvimento de uma vacina e ou de controle biológico. Porém, uma vacina com reais possibilidades de substituir o uso de acaricidas ainda não está disponível. Por isto, até o momento em que os controles imunológico ou biológico sejam uma realidade totalmente prática, é importante o estudo dos mecanismos que permitem aos carrapatos desenvolverem resistência aos produtos químicos. Desta maneira poderemos compreender as bases moleculares da resistência, criar métodos e orientar práticas de manejo que permitam prolongar a vida útil dos princípios ativos em uso, além de desenvolver drogas menos sensíveis ao desenvolvimento de resistência pelos carrapatos.

Base molecular da resistência aos acaricidas

A base molecular da resistência tem sido estudada em diferentes espécies de artrópodes, principalmente em insetos. Mecanismos de resistência, como redução da penetração do inseticida, aumento do poder seqüestrante de compostos tóxicos e aumento da detoxificação tornam os inseticidas menos efetivos, fazendo com que seja necessário o aumento de dosificação. Três famílias de proteínas são as principais responsáveis pelo metabolismo de inseticidas: os citocromos P450, as carboxilesterases (COEs) e as glutathione S-transferases (GSTs) [57]. As proteínas destas famílias também estão envolvidas na síntese e na quebra de vários metabólitos endógenos, na proteção contra o stress oxidativo, na transmissão de sinais nervosos e no transporte celular [31].

A resistência a inseticidas pode resultar de mudanças na seqüência ou na conformação de proteínas que normalmente se ligariam a estes compostos [31]. A resistência a ciclodienos está relacionada a mutações de um receptor do neurotransmissor GABA, para organofosforados e carbamatos a mutações no sítio ativo da acetilcolinesterase e a amplificação do gene de esterases, para DDT e piretróides a mutações ligadas ao gene de um canal de sódio e ao citocromo P450. Mutações em genes de esterases em moscas domésticas também estão associadas a resistência a organofosforados [57]. As mesmas mutações que causam resistência a um mesmo princípio ativo são encontradas em diferentes espécies de insetos, indicando que o uso dos produtos químicos causa uma pressão ambiental que seleciona mutações nos diferentes genes [7].

Especificamente, para piretróides foram detectadas resistências por diminuição da sensibilidade aos produtos químicos e por aumento da capacidade de detoxificação celular. Alterações nos canais de sódio causam redução na sensibilidade do sistema nervoso central aos princípios ativos [48], e mutações que afetam a expressão dos genes dos citocromos P450, esterases e glutathione S-transferase são responsáveis pelo aumento da capacidade das células de eliminarem os princípios ativos [7].

Em *B. microplus* existem poucos estudos sobre a caracterização dos genes responsáveis pela resistência a diferentes princípios químicos. Existe correlação de enzimas da família das esterases com a resistência a piretróides [19]. No carrapato apenas os genes de esterase [10; 11], carboxilesterase [32], acetil-colinesterase [4], de citocromo P450 [13] e canal de sódio [30], que em outros organismos estão relacionados com a resistência a piretróides, foram parcialmente estudados para determinar a real participação de seus produtos na resistência aos princípios químicos. Ainda sim, diversos trabalhos mostram a resistência de populações *B. microplus* a diferentes pesticidas [20; 40]. A maior parte das populações de *B. microplus* no mundo são resistentes a organofosforados [11] e piretróides. Já foi identificada resistência a amitraz, um acaricida do grupo das formamidinas que age sobre receptores de octopamina, resultando em hiperexcitação neuronal e morte [72], em diversas populações de carrapato [51]. Novos acaricidas estão sendo testados no mercado, entre eles as lactonas macrocíclicas, que agem como bloqueadores da estimulação neural por se ligarem ao neurotransmissor GABA [72], o inibidor de desenvolvimento de carrapato flurazuron e fipronil. Como são relativamente novos no mercado, nenhum caso de resistência relevante ainda foi detectado [62].

Atualmente, a determinação da resistência em carrapatos é feita por testes biológicos a campo ou em laboratório. Os testes baseiam-se na utilização do carrapaticida em diferentes concentrações e na observação da eficiência do princípio ativo em diminuir a população de carrapatos. Guerrero et al. [27], através da técnica de PCR, conseguiram diagnosticar, em linhagens mexicanas de *B. microplus*, mutações por substituição de dois aminoácidos de uma proteína de canal de sódio. Essas mutações, substituições de Phe para Ile e Asp para Asn são responsáveis por conferir a estas linhagens de carrapato resistência a piretróides.

A identificação e caracterização dos genes de *B. microplus* que estão envolvidos na resistência a

carrapaticidas, através da determinação do seu papel sobre a resistência e o estabelecimento de métodos que possam detectar sua presença em amostras de campo poderão fornecer uma importante ferramenta para o monitoramento da presença de resistência ao princípio ativo em populações de carrapatos a campo.

Conclusão

Concluindo, os problemas de resistência, o alto custo dos produtos químicos e da mão-de-obra na aplicação dos produtos, bem como o aparecimento de

resíduos tóxicos na carne e no leite e a contaminação do ambiente, levaram à procura de métodos biológicos e imunológicos como formas alternativas de controle do carrapato, entretanto estes métodos ainda não satisfazem completamente as necessidades da pecuária, por isto uma alternativa em curto prazo é o melhor uso dos acaricidas. Além disso, uma melhor compreensão da biologia do carrapato é essencial para o desenvolvimento tanto, de novas drogas químicas como para vacinas e produtos biológicos.

REFERÊNCIAS

- 1 **Alves-Branco F.P., Echevarria F.A.M. & Siqueira A.S. 1983.** Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. *Comunicado Técnico da EMBRAPA*. 1: 1-4.
- 2 **Andreotti R., Gomes A., Malavazi-Piza K.C., Sasaki S.D., Sampaio C.A. & Tanaka A.S. 2002.** BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International Immunopharmacology*. 2: 557-563.
- 3 **Bastiani M., Hillebrand S., Horn F., Kist T.B., Guimaraes J.A. & Termignoni C. 2002.** Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. *Insect Biochemical and Molecular Biology*. 32: 1439-1446.
- 4 **Baxter G. D. & Barker, S. C. 2002.** Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and organophosphate-resistant cattle ticks. *Insect Biochemical and Molecular Biology*. 32: 815-820.
- 5 **Braz G.R., Moreira M.F., Masuda H. & Oliveira P.L. 2002.** Rhodnius heme-binding protein (RHBP) is a heme source for embryonic development in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). *Insect Biochemical and Molecular Biology*. 32: 361-367.
- 6 **Brum J.G.W. 1988.** Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* Grimont et al., 1981: etiopatogenia e sazonalidade. 200p. Tese (Doutor em ciências). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, R.J.
- 7 **Casida J.E. & Quistad G.B. 1998.** Golden age of insecticide: Past, Present, or Future? *Annual Review of Entomology*. 43:1-16.
- 8 **Coppolino M.G., & Dedhar S. 1998.** Molecules in focus: calreticulin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 30: 553-558.
- 9 **Cordovés C.O. 1999.** Carrapato: controle ou erradicação. Alegrete: Editora Gralha, 130 p.
- 10 **Cossio-Bayugar R., Barhoumi R., Burghardt, R.C., Wagner G.G. & Holman P.J. 2002.** Basal cellular alterations of esterase, glutathione, glutathione S-transferase, intracellular calcium and membrane potentials in coumaphos-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cell lines. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 72: 1-9.
- 11 **Cossio-Bayugar R., Wagner G.G. & Holman P.J. 2002.** *In vitro* generation of organophosphate resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cell lines. *Journal of Medical Entomology*. 39: 278-284.
- 12 **Crampton A.L., Baxter G.D. & Barker S.C. 1999.** Identification and characterisation of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemical and Molecular Biology*. 29: 377-384.
- 13 **Crampton A.L., Miller C., Baxter G.D. & Barker S.C. 1998.** Expressed sequenced tags and news genes from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*. 22: 177-186.
- 14 **Da Costa GL, Sarquis M.I., De Moraes A.M. & Bittencourt V.R. 2002.** Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*. 154: 207-209.

- 15 Da Silva Vaz Jr I., Ozaki S.L. & Masuda A. 1994. Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissues. *Veterinary Parasitology*. 52: 71-78.
- 16 Da Silva Vaz Jr I., Martinez R.H.M., Oliveira A.T.D., Heck A., Logullo C., Gonzales J.C., Dewes H. & Masuda A. 1996. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Veterinary Parasitology*. 62: 155-160.
- 17 Da Silva Vaz Jr. I., Logullo C. J., Sorgine M., Velloso F.F., Gonzales J.C., Masuda H., Oliveira P. L. & Masuda A. 1998. Immunization of bovines with a new protein isolated from egg of *Boophilus microplus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 66: 331-341.
- 18 Davey R.B., George J.E. & Snyder D.E. 2001. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Veterinary Parasitology*. 99: 41-52.
- 19 Dejersey J., Nolan J., Dave P.A. & Riccles P.W. 1985. Separation and characterization of the pyrethroid-hydrolyzing esterases of cattle tick *Boophilus microplus*. *Pesticide and Biochemistry Physiology*. 23: 349-357.
- 20 Drummond R.O., Ernst S.E., Trevino J.L., Gladney W.J. & Graham O.H. 1976. Tests of acaricides for control of *Boophilus annulatus* and *B. microplus*. *Journal of Economic Entomology*. 69:37-40.
- 21 Farias N.A.R., Gonzales J.C. & Saibro J.C. 1986. Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 21: 1313-1320.
- 22 Ferreira C.A., Barbosa M.C., Silveira T.C., Valenzuela J.G., da Silva Vaz Jr. I. & Masuda A. 2002. cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. *Parasitology*. 125: 265-274.
- 23 Ferreira C.A., da Silva Vaz Jr. I., da Silva S.S., Haag K.L., Valenzuela J.G. & Masuda A. 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Experimental Parasitology*. 101: 25-34.
- 24 Frazzon, A. P., da Silva Vaz Jr. I., Masuda, A., Schrank A. & Vainstein, M. H. 2000. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 94: 117-125.
- 25 Gobert G.N. 1998. The role of microscopy in the investigation of paramyosin as a vaccine candidate against *Schistosoma japonicum*. *Parasitology Today*. 14: 115-118.
- 26 Gonzales J.C. 1975. O controle do carrapato bovino. Porto Alegre: Sulina, 104 p.
- 27 Guerrero F.D., Li A.Y., Hernandez R. 2002. Molecular diagnosis of pyrethroid resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical entomology*. 39: 770-776.
- 28 Guglielmone A.A., Mangold A.J., Munoz Cobenas M.E., Scherling N., Garcia Posse F., Anziani O.S. & Ioppolo M. 2000. Moxidectin pour-on for control of natural populations of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 87: 237-241.
- 29 Häuserman W., Friedel T., Hess E.A. & Strong M.B. 1992. A new active ingredient for a new approach to protect cattle against ticks In: *Proceedings of XIX International Congress of Entomology* (Beijing, China). p. 138.
- 30 He H., Chen A.C., Davey R.B., Ivie G.W. & George, J.E. 1999. Characterization and molecular cloning of glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect and Biochemistry and Molecular Biology*. 29: 737-743.
- 31 Hemingway J., Field L. & Vontas J. 2002. An overview of insecticide resistance. *Science*. 298: 96-97.
- 32 Hernandez R., Guerrero F.D., George J.E. & Wagner G.G. 2002. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 1009-1016.
- 33 Horn F., dos Santos P.C., Termignoni C. 2000. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 384: 68-73.
- 34 Horn S.C. & Arteche C.C.P. 1985. Situação parasitária da pecuária no Brasil. *A hora Veterinária*. 23: 12-32.
- 35 Jaworski D. C., Simmen F. A., Lamoreaux W., Coons L. B., Muller M. T. & Needham G. R. 1995. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *Journal Insect Physiology*. 41: 369-375.
- 36 Johnston L.A.Y., Kemp D.H. & Pearson R.D. 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. *International Journal for Parasitology*. 16: 27-34.
- 37 Jonsson N.N., Mayer D.G. & Green P.E., 2000. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Veterinary Parasitology*. 88: 79-92.
- 38 Kaaya G.P., Mwangi E.N. & Ouna E.A. 1996. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 67: 15-20.

- 39 Kelly, E.A.B., Colley, D.G. 1988. *In vivo* effects of monoclonal anti-I3t4 antibody on immune responsiveness of mice infected with *Schistosoma-mansoni* - reduction of irradiated cercariae-induced resistance. *Journal of Immunology*. 140:2737-2745.
- 40 Sabatini G.A., Kemp D.H., Hughes S., Nari A. & Hansen J. 2001. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 95: 53-62
- 41 Kocan K.M. 1995. Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle. *Veterinary Parasitology*. 57: 121-151.
- 42 Kovacs H., Campbell I.D., Strong P., Johnson S., Ward F.J., Reid K.B.M. & Eggleton, P. 1998. Evidence that C1q binds specifically to C_H2-like immunoglobulin g motifs present in the autoantigen calreticulin and interferes with complement activation. *Biochemistry*. 37: 17865-17874.
- 43 Lacleste J.P., Shoemaker C.B., Richter D., Arcos L., Pante N., Cohen C., Bing D. & Nicholson-Weller A. 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *The Journal of Immunology*. 148: 124-128.
- 44 Lee A.J., Huntley J., Van den Broek A., Coates D. & Isaac R.E. 2002. Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*. 105: 49-63.
- 45 Logullo C., Moraes J., Dansa-Petretski M., Da Silva Vaz Jr. I., Masuda A., Sorgine M.H., 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.
- 46 Logullo C., Da Silva Vaz Jr. I., Sorgine M.H.F., Paiva-Silva G.O., Faria F.S., Zingali R., Rosa de Lima M., Abreu L., Oliveira E.F., Alves E.W., Masuda H., Gonzales J.C., Masuda A. & Oliveira P.L. 1998. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*. 116: 525-532.
- 47 Maroto, M., Arredondo, J.J., San Roman, M., Marco, R. & Cervera, M. 1995. Analysis of the paramyosin/miniparamyosin gene. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 4375-4382.
- 48 Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M.S., Darriet F., Bergé J.B., Devonshire A.L., Guillet P., Pasteur N. & Pauron, D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*. 7: 189-184.
- 49 Gonçalves P.M., Passos L. M. F & Ribeiro M. F. B. 1999. Detection of IgM antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Veterinary Parasitology*. 82: 11-17.
- 50 Michalak, M., Milner, R.E., Burns, K., Opas, M. 1992. Calreticulin. *Biochemical Journal*. 285, 681-692.
- 51 Miller, R.J., Davey, R.B., George, J.E. 2002. Modification of the food and agriculture organization larval packet test to measure amitraz-susceptibility against ixodidae. *Journal of Medical Entomology*. 39: 645-651.
- 52 Nari A. 1995. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Veterinary Parasitology*. 57: 153-165.
- 53 Nolan J. 1985. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 18: 155-166.
- 54 O'Neill G.M., Donovan G.R. & Baldo B.A. 1994. Cloning and characterization of a major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1219: 521-528.
- 55 Patarroyo J.H., Portela R.W., De Castro R.O., Pimentel J.C., Guzman F., Patarroyo M.E., Vargas M.I., Prates A.A. & Mendes M.A. 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 88: 163-172.
- 56 Pruett J.H. 1999. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. *International Journal for Parasitology* 29: 25-32.
- 57 Ranson H., Claudianos C., Orтели F., Abgrall C., Hemingway J., Sharakhova M.V., Unger M.F., Collins F.H. & Feyereisen R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*. 298: 179-181.
- 58 Renard G., Garcia J.F., Cardoso F.C., Richter M.F., Sakanari J.A., Ozaki L.S., Termignoni C. & Masuda, A. 2000. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30: 1017-1026.
- 59 Renard G., Lara F.A., de Cardoso F.C., Miguens F.C., Dansa-Petretski M., Termignoni C. & Masuda A. 2002. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Molecular Biology*. 11: 325-328.
- 60 Riding G.A., Jarmey J., Makenna R.V., Pearson R., Cobon G.S. & Willadsen P. 1994. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *Journal of Immunology*. 153: 5158-5166.

- 61 Rosa de Lima M.F., Sanchez Ferreira C.A., Joaquim de Freitas D.R., Valenzuela J.G. & Masuda, A. 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 747-754.
- 62 Sabatini G.A., Kemp D.H., Hughes S., Nari A. & Hansen J. 2001. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 95: 53-62.
- 63 Samish M. & Glazer, I. 2001. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends in Parasitology*. 17: 368-371.
- 64 Sanders M.L., Glass G.E., Nadelman R.B., Wormser G.P., Scott A.L., Raha S., Ritchie B.C., Jaworski D.C. & Schwartz B.S. 1999. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* (Say) and are correlated with tick engorgement indices. *American Journal of Epidemiology*. 149, 777-784.
- 65 Sanders M.L., Jaworski D.C., Sanchez J.L., DeFraitres R.F., Glass G.E., Scott A.L., Raha S., Ritchie B.C., Needham G.R. & Schwartz, B. S. 1998. Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 59: 279-285.
- 66 Seddon H.R. 1967. In: *Diseases of Domestic Animals in Australia, Part 3, Arthropod Infestations, Ticks and Mites*. Ed. and revised: H.E. Albiston, Commonwealth of Australia, Dept. Health, Canberra. p.40.
- 67 Seifert G.W., Springell P.H. & Tatchell R.J. 1968. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*. 58: 415-430.
- 68 Seixas A., Dos Santos P.C., Velloso F.F., Da Silva Vaz Jr. I., Masuda A., Horn F. & Termignoni C. 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*. 126: 155-163.
- 69 Sorgine M.H., Logullo C., Zingali R.B., Paiva-Silva G.O., Juliano L. & Oliveira P.L. 2000. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 28659-28665.
- 70 Sutherst R.W., Jones R.J., Schnitzerling H.J. 1982. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. *Nature*. 295: 320-321.
- 71 Sutherst R.W., Maywald G.F., Kerr J.D. & Siegeman D.A. 1983. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research*. 34: 317-327.
- 72 Taylor M.A. 2001. Recent developments in ectoparasiticides. *The Veterinay Journal*. 161: 253-268.
- 73 Tellam R.L., Kemp D., Riding G., Briscoe S., Smith D., Sharp P., Irving D. & Willadsen, P. 2002. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Veterinary Parasitology*. 103: 141-156.
- 74 Toro-Ortiz R.D., Da Silva Vaz Jr., I., Gonzales J.C. & Masuda, A. 1997. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. *Veterinary Parasitology*. 69: 297-306
- 75 Trimmell A.R., Hails R.S. & Nuttall P.A. 2002. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccin.e* 20: 3560-3568.
- 76 Wikel S.K. 1996. Tick Modulation of Host Cytokines. *Experimental Parasitology*. 84: 304-309
- 77 Willadsen P., Cobon G. & McKenna R.V. 1996. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunology*. 18: 241-246.
- 78 Young A.S. & Morzaria S.P. 1986. Biology of *Babesia*. *Parasitology Today*. 2: 211-219.
- 79 Zhioua E., Browning M., Johnson P.W., Ginsberg H.S. & Lebrun R.A. 1997. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal for Parasitology*. 83: 815-818.



ANEXO 3

Artigo publicado no periódico *Acta Scientiae Veterinariae*. 33: 109-117, 2005.

**Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus
microplus***

Daniela Reis Joaquim de Freitas, Paula Cristiane Pohl e Itabajara da Silva Vaz Jr.



Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus**

Characterization of acaricide resistance in *Boophilus microplus*

Daniela Reis Joaquim de Freitas^{1,2,#}, Paula Cristiane Pohl^{2,#} & Itabajara da Silva Vaz Jr.^{2,3}

RESUMO

Boophilus microplus é um ectoparasita hematófago de bovinos, presente em áreas tropicais e subtropicais no mundo. É causador de enormes perdas econômicas pela espoliação que causa ao hospedeiro, além de ser transmissor de *Anaplasma* sp. e *Babesia* spp. O principal método de controle utilizado atualmente é o controle químico, que, embora eficiente, é caro, causa danos ao meio ambiente e deixa resíduos na carne. Além disso, é crescente o número de relatos que apontam um aumento das populações resistentes de carrapatos a diversos princípios químicos presentes nos acaricidas. As bases moleculares da resistência em *Boophilus microplus* ainda não são claramente conhecidas, mas muitos estudos indicam alguns dos mecanismos. Diferentes grupos de enzimas presentes em diferentes rotas metabólicas compõem os mecanismos de resistência e detoxificação celular, além de uma série de mutações que podem aumentar a tolerância a um determinado composto químico. Neste momento, outros tipos de controle, como o biológico e o imunológico estão sendo trabalhados para evitar a resistência nas populações de carrapato. No entanto, o controle biológico ainda não é viável para grandes rebanhos e a proteção induzida por vacinas não é suficiente para permitir o controle do *B. microplus*. O estudo dos mecanismos de resistência no carrapato pode ser de fundamental importância para seu controle em rebanhos.

Descritores: *Boophilus microplus*, resistência, mecanismos moleculares.

ABSTRACT

The tick *Boophilus microplus* is a hematophagous ectoparasite of bovine, present in tropical and subtropical areas in the world. It is responsible for great economic losses for the host exploitation, moreover it transmits *Anaplasma* sp. and *Babesia* spp. The most important method for the control of the cattle tick used actually is the chemical control, that it is efficient but dispendious, causes damage to environment and contaminates the food. In addition, the number of relates increases and shows the increase in tick resistant populations to several chemical principles present in the acaricides. The molecular basis of resistance in *Boophilus microplus* are not known, but several studies shows the most mechanisms. Different group of enzymes in different metabolic pathways form the cellular resistance mechanisms and detoxification, moreover several mutations can increase the tolerance to a chemical compound. In this moment, other types of control, such as biological and immunological controls has been developed for decrease the resistance in tick populations. But the biological control yet is not viable for large cattle breedings and the protection induced by vaccination is not sufficient to control of *B. microplus*. The study of resistance mechanisms in the tick could be fundamental importance for its control.

Key words: *Boophilus microplus*, resistance, molecular mechanisms.

I. INTRODUÇÃO

II. CONTROLES BIOLÓGICO E IMUNOLÓGICO

III. USO DE ACARICIDAS E AS BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA

1. Bases moleculares da resistência

2. Citocromos P450

3. Esterases

4. Glutathione S-transferases

5. Outros Alvos

IV. DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA

V. CONCLUSÃO

I. INTRODUÇÃO

O carrapato *Boophilus microplus* é um ectoparasita hematófago de bovinos presente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo [43], e representa um dos principais problemas econômicos para criadores de gado, pois os prejuízos econômicos vão desde grandes perdas na produção de leite e carne [80] e danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato [81] a transmissão de doenças das quais o carrapato é vetor, como a tristeza parasitária bovina (causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela rickettsia do gênero *Anaplasma*) [57,87] e prejuízos relacionados à mão-de-obra, despesas com instalações, compra dos carrapaticidas e de equipamentos de suporte para aplicação dos mesmos nos rebanhos [10]. Jonsson *et al.* [44,45] mostraram que na Austrália, o custo total para a criação de gado (excluindo custos associados com a febre do carrapato) baseada nas práticas de manejo de 1998 é de quatro milhões e noventa e seis mil dólares por ano, sendo que 49% deste custo está relacionado aos custos do controle e 51% as perdas na produção. Por isto, a necessidade de métodos de controle adequados e mais baratos é cada vez maior. Dois métodos que têm sido muito estudados nas últimas décadas são os controles biológico e imunológico [2,3,15-17,32].

II. CONTROLES BIOLÓGICO E IMUNOLÓGICO

O controle biológico é baseado em diferentes princípios, que vão desde rodízio de pastagens e/ou cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das fases de vida livre do carrapato [26,79], seleção

de raças menos sensíveis ao carrapato, utilização de predadores naturais (como a garça vaqueira *Egretta ibis* [2] e formigas carnívoras [33]), ou ainda a utilização de espécies parasitas, como bactérias (*Escherichia coli*, *Cedecea lapagei* e *Enterobacter agglomerans* [8], já normalmente encontradas no aparelho reprodutor feminino do carrapato) ou fungos (como o fungo entomo-patogênico *Metarhizium anisopliae*, muito estudado nos últimos anos em diferentes espécies de carrapato [15,32,46,89]). Nematódeos, que têm se mostrado eficientes no controle biológico de insetos [72] também têm sido estudados como ferramentas de controle de carrapatos [20].

Um outro método de controle com efetivo sucesso é o uso de compostos naturais atuando como pesticidas. Em diferentes espécies de insetos, “spinosad”, um pesticida natural composto pela combinação de duas lactonas macrocíclicas (A e D) obtidas de produtos de fermentação isoladas do fungo *Saccharo-lyspora spinosa* [6,41,53,64] tem mostrado excelentes resultados. Davey *et al.* [20] testaram em bovinos diferentes concentrações de “spinosad” e obtiveram uma queda drástica no número de fêmeas ingurgitadas, na massa de ovos e no índice de fecundidade. Em 2000, Guglielmone *et al.* [35] mostraram que em bovinos banhados em moxidectina, outra lactona macrocíclica usada como endectocida, havia um controle de quase 95% na infestação de carrapatos. Posteriormente, em 2003, Aguilar-Tipacamu e Rodriguez-Vivaz constataram um controle acima de 95% em fêmeas adultas ingurgitadas entre 7 e 28 dias após o tratamento dos bovinos com moxidectina e 74,9% no dia 35 após o tratamento. Quando usado com amitraz

o controle chegou a quase 100% [1]. Atualmente, é possível utilizar moxidectina juntamente com acaricidas [35].

O controle imunológico tem sido muito estudado nas últimas cinco décadas. Diversos grupos no mundo todo têm se dedicado ao desenvolvimento de uma vacina contra *B. microplus*. O uso de novas metodologias de biologia molecular e imunologia tem auxiliado na identificação de novos antígenos que possam gerar uma resposta imune protetora, na produção de anticorpos monoclonais, que têm sido uma ferramenta útil na caracterização de antígenos envolvidos na resposta protetora contra parasitas [47], bem como propiciado um maior conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica do animal a ser imunizado.

Um marco no desenvolvimento de vacinas contra *B. microplus* foi a identificação de uma proteína de intestino, nomeada Bm86, base de duas vacinas comerciais presentes no mercado: a TickGard, de origem australiana e produzida em *E. coli* e a Gavac, de origem cubana e produzida em *Pichia pastoris*. Embora disponíveis no mercado, estas vacinas não asseguram um grau de proteção suficiente para serem utilizadas sem o uso concomitante de acaricidas [44,86]. Outros antígenos têm sido associados a Bm86 para aumentar a eficiência da resposta imune em bovinos [68,86].

Além dos antígenos que compõem as vacinas comercialmente disponíveis descritas acima, outras proteínas que também conferem algum grau de imunoproteção ou induzem a produção de anticorpos que interferem no sucesso reprodutivo do carrapato têm sido descritas, como o caso da glicoproteína BYC (*Boophilus* Yolk Cathepsin) [18,53], inibidores de tripsina (BmTIs) [3], e vitelina [82]. Moléculas envolvidas em diferentes funções fisiológicas do carrapato e na sua interação com o hospedeiro também têm sido caracterizadas por diversos grupos de pesquisa, como a THAP (Tick Heme-binding Aspartic proteinase) [76], a glutatona S-transferase (GST) [19,37, 69], a VTDCE [75], a BmCL1 [66,67], a calreticulina (CRT) [28,58], a paramiosina (BmPRM) [27,54] e a BooKase [4,40].

Portanto, embora os controles biológico e imunológico sejam hoje interessantes por uma questão econômica e ambiental, ainda não são totalmente efetivos, exigindo a utilização de produtos químicos para maior estabilidade operacional [64]. Por isto, é importante entender os mecanismos que permitem aos

carrapatos desenvolverem resistência aos diferentes princípios químicos presentes nos acaricidas.

III. USO DE ACARICIDAS E AS BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA

O mais eficaz método de controle para populações de carrapato foi (e é) o uso de acaricidas. O controle com acaricidas teve início nos anos 50 [64], mas na realidade, as propriedades inseticidas do DDT já eram conhecidas desde a década de 30. Seu uso massivo como pesticida, porém, começou nos anos 50. Apesar de ainda hoje o controle químico ser o único método eficaz, já que os controles imunológico e biológico ainda possuem apenas uma função complementar, é também dispendioso, devido o alto custo com a aquisição dos produtos químicos, instalações adequadas e com a mão-de-obra para a aplicação dos produtos. A contaminação com resíduos químicos da carne e do leite e a contaminação do ambiente, através do solo e dos rios têm sido atualmente uma das maiores preocupações quanto a seu uso [60,64]. Uma das maneiras de diminuir o problema da contaminação seria a utilização de biodegradação de compostos xenobióticos, método que vem sendo pesquisado há pelo menos duas décadas [88].

Ainda que seja resolvido o problema da contaminação ambiental, um outro problema ainda persiste com o uso de acaricidas: a seleção de populações de carrapato resistentes aos diferentes princípios químicos utilizados [13]. Isto gera um ciclo vicioso: por estar sendo selecionadas populações resistentes a determinados princípios ativos, há uma necessidade de utilizar sequencialmente acaricidas com diferentes composições; e o uso destes acaricidas com diferentes composições muitas vezes em um curto período de tempo ou concomitantemente acaba por selecionar populações mais resistentes ou resistentes a mais de um princípio ativo. Deve-se destacar que foi mostrado que o *B. microplus* pode apresentar resistência mais rapidamente que outros carrapatos, provavelmente, pelo menor período de tempo entre as gerações [49].

Como ao longo destas últimas cinco décadas têm-se utilizado acaricidas baseados em diferentes princípios químicos [36] (arsenicais, organoclorados, organofosforados, carbamatos, nitroguanidinas, fenilpirazoles, formamidinas, piretróides, avermectinas, lactonas macrocíclicas e fenil uréias) diversos mecanismos de resistência foram sendo desenvolvidos como estratégia de sobrevivência pelo carrapato. A maior

parte das populações de *B. microplus* no mundo é resistente a organofosforados [12] e piretróides. Mas como ocorre esta resistência? Que mecanismos são estes?

1. Bases moleculares da resistência

A base molecular da resistência tem sido estudada em diferentes espécies de artrópodes, principalmente em insetos, mas algo já é conhecido em carrapatos. Artrópodes em geral possuem um curto período de tempo entre uma geração e outra. Isto favorece o surgimento de populações com diferentes características genéticas, de acordo com a pressão seletiva que estão sofrendo. Estas características variam desde a redução do poder de penetração do pesticida, aumento do poder sequestrante de moléculas tóxicas ou mesmo insensibilidade a compostos tóxicos [61] a aumento da detoxificação celular [9,61,65], o que torna os pesticidas utilizados defasados em um curto espaço de tempo e torna necessário o aumento da concentração de uso, mudança de princípio ativo ou a utilização de outros princípios ativos combinados [80]. As bases moleculares da resistência podem ser resumidas em 3 tipos: aumento de expressão de genes ou aumento da atividade de enzimas envolvidas em metabolismo de xenobióticos/detoxificadoras; mutações em neurorreceptores e mutações em canais de sódio [55,61,70]. Três famílias de proteínas são as principais responsáveis pelo metabolismo de inseticidas: os citocromos P450, as esterases (Est) e as glutathiona S-transferases (GSTs) [65]. As proteínas destas famílias também estão envolvidas na síntese e na quebra de vários metabólitos endógenos, na proteção contra o estresse oxidativo, na transmissão de sinais nervosos e no transporte celular [38].

2. Citocromos P450

Os citocromos P450 são uma superfamília ubíqua de enzimas que catalisam uma grande variedade de reações químicas e agem sobre diferentes substratos [30,38]. Estão envolvidas no metabolismo de compostos endógenos como esteróides, ácidos graxos e colesterol, e de compostos exógenos como drogas e pesticidas [22,55]. Simplificando, P450 liga-se a compostos tóxicos oxidando-os, tornando-os mais solúveis e, portanto, mais fáceis de excretar [38]. P450 monooxigenases são responsáveis pela detoxificação de piretróides e organofosforados em artrópodes, inclusive em *B. microplus* [50]. Em *Drosophila* foi verificada que a superexpressão de dois genes P450 genes,

Cyp6g1 e Cyp12d1 são responsáveis pela sua resistência a DDT, um organoclorado [29].

3. Esterases

As esterases estão envolvidas na detoxificação de organofosforados, em especial as fosfotriesterases (PTEs), acetilcolinesterases (AChE) e as carboxilesterases. Os organofosforados inibem esterases por fosforilação no sistema nervoso. Algumas moléculas de esterase, no entanto, são hábeis em remover, sem aparente efeito tóxico, moléculas de organofosforado [77,78]. A bem conhecida síndrome colinérgica é causada por forte inibição de AChE, que interrompe os estímulos colinérgicos. Mutações no sítio ativo da acetilcolinesterase e a superexpressão de genes de esterases para organofosforados e carbamatos têm sido recentemente relatados, principalmente em moscas domésticas [65] e em outras espécies [9]. Existe, ainda, correlação de atividade e expressão de genes de esterases com a resistência a piretróides [21].

4. Glutathiona S-transferases

Para completar o quadro das principais enzimas envolvidas na metabolização de pesticidas, as glutathiona S-transferases (GSTs) são uma família multifuncional de enzimas presentes ubiquamente em organismos aeróbicos e entre suas funções pode-se destacar transporte intracelular, participação em processos digestivos, síntese de prostaglandinas e, principalmente, detoxificação de substâncias tóxicas e proteção contra stress oxidativo [50,69]. O mecanismo de ação das GSTs é, basicamente, ligar-se a grupamentos eletrofílicos e conjugá-los a uma molécula de glutathiona reduzida, que ao ligar-se a tal grupamento eletrofílico, passará do estado reduzido para o estado oxidado, e formará um composto mais solúvel e mais fácil de ser excretado [25].

Altos níveis de expressão de GST tem sido relacionado à resistência a inseticidas em vários organismos [70], além de estar associada a reações alérgicas mediadas por IgE [62]. Em *B. microplus* a GST foi isolada de larvas [37] e de glândula salivar [69]. Da Silva Vaz Jr. *et al.* em 2004 demonstraram *in vitro* o efeito de diferentes acaricidas sobre a atividade de uma GST [19]. Entretanto, ainda não foram demonstradas evidências correlacionando a expressão de GST a resistência frente aos acaricidas. Em outros artrópodes, já foi verificado um aumento de expressão e/ou de atividade de GSTs [25,69,70], que agem princi-

palmente sobre organoclorados como DDT e organofosforados, estes últimos por duas vias distintas: O-dealquilação ou O-dearilação [85]. Embora não se tenha ainda dados concretos sobre o papel das GSTs na resistência a piretróides, alguns autores apontam para um papel de seqüestro das moléculas de inseticida ou de metabolização de produtos de peroxidação de lipídios causados por inseticidas [84].

5. Outros Alvos

A resistência a inseticidas também pode advir de mudanças na seqüência ou na conformação de proteínas que normalmente se ligam a estes compostos [38]. A resistência a ciclodienos está relacionada a mutações de um receptor do neurotransmissor GABA [70]. Mutações em genes de canal de sódio também são responsáveis por resistência a DDT e piretróides [61,65,70], pois causam alterações nos canais de sódio causando redução na sensibilidade do sistema nervoso central aos princípios ativos [56]. Já foram identificadas mutações em receptores de receptores de octopamina, o que causa resistência a amitraz, uma das formamidas mais utilizadas hoje [81].

Novos acaricidas estão sendo testados no mercado, entre eles as lactonas macrocíclicas, que agem como bloqueadores da estimulação neural [81], e os inibidores de desenvolvimento de carrapato flurazuron e fipronil. Como são relativamente novos no mercado, nenhum caso de resistência relevante ainda foi detectado [71].

IV. DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA

Pode-se determinar de uma maneira bastante refinada a resistência em carrapatos, através de dife-

rentes testes biológicos a campo ou em laboratório. Um dos testes baseia-se na utilização do carrapaticida em diferentes concentrações e no índice de sobrevivência de larvas expostas a estas concentrações. Este teste é conhecido como o teste do pacote ("Larval Packet Test" - LPT) [51]. Guerrero *et al.* [34] através da técnica de PCR conseguiu identificar mutações em linhagens mexicanas de *B. microplus* que ocorrem por substituição de dois aminoácidos em uma proteína de canal de sódio. Essas mutações, com as substituições de Phe para Ile e Asp para Asn são responsáveis por conferir a estas linhagens de carrapato resistência a piretróides.

Através de PCR, é possível detectar uma mutação específica em genes de canal de sódio associada com resistência a permetrina utilizando um único carrapato em qualquer estágio de desenvolvimento e em poucas horas. Também por PCR, é possível detectar um gene esterase responsável pela metabolização de permetrina, CzEst9 [31]. Outros métodos também têm sido desenvolvidos para detectar rapidamente resistência, baseados em ensaios utilizando DNA ou ELISA para genotipagem de carrapatos a fim de obter um perfil de susceptibilidade a vários pesticidas [31].

V. CONCLUSÃO

Para concluir, pode-se salientar que através de uma maior compreensão dos mecanismos moleculares da resistência é que poderá criar, no futuro, novos métodos de manejo que permitam prolongar a vida útil dos princípios ativos em uso, além de desenvolver drogas menos sensíveis ao desenvolvimento de resistência pelos carrapatos.

REFERÊNCIAS

- 1 **Aguilar-Tipacamu G. & Rodriguez-Vivas R.I. 2003.** Effect of moxidectin against natural infestation of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*. 111: 211-216.
- 2 **Alves-Branco F.P., Echevarria F.A.M. & Siqueira A.S. 1983.** Garça vaqueira *Egretta ibis* e o controle biológico do carrapato *Boophilus microplus*. Comunicado Técnico da EMBRAPA. 1: 1-4.
- 3 **Andreotti R., Gomes A., Malavazi-Piza K.C., Sasaki S.D., Sampaio C.A. & Tanaka A.S. 2002.** BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International Immunopharmacology*. 2: 557-563.
- 4 **Bastiani M., Hillebrand S., Horn F., Kist T.B., Guimarães J.A. & Termignoni C. 2002.** Cattle tick *Boophilus microplus* salivary gland contains a thiol-activated metalloendopeptidase displaying kininase activity. *Insect Biochemical and Molecular Biology*. 32: 1439-1446.
- 5 **Baxter G.D. & Barker S.C. 2002.** Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and organophosphate-resistant cattle ticks. *Insect Biochemical and Molecular Biology*. 32: 815-820.

- 6 **Bond J.G., Marina C.F. & Williams T. 2004.** The naturally derived insecticide spinosad is highly toxic to *Aedes* and *Anopheles* mosquito larvae. *Medical Veterinary Entomology*. 1: 50-56.
- 7 **Braz G.R., Moreira M.F., Masuda H. & Oliveira P.L. 2002.** *Rhodnius* heme-binding protein (RHBP) is a heme source for embryonic development in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). *Insect Biochemical and Molecular Biology*. 32: 361-367.
- 8 **Brum J.G.W. 1988.** Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* Grimont *et al.*, 1981: etiopatogenia e sazonalidade. 200f. Tese (Doutor em Ciências). Instituto de Biologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, R.J.
- 9 **Casida J.E. & Quistad G.B. 1998.** Golden age of insecticide: Past, Present, or Future? *Annual Review of Entomology*. 43: 1-16.
- 10 **Cordovés C.O. 1999.** Carrapato: controle e erradicação. Alegre: Gralha, 130p.
- 11 **Cossio-Bayugar R., Barhoumi R., Burghardt R.C., Wagner G.G. & Holman P.J. 2002.** Basal cellular alterations of esterase, glutathione, glutathione S-transferase, intracellular calcium and membrane potentials in coumaphos-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cell lines. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 72: 1-9.
- 12 **Cossio-Bayugar R., Wagner G.G. & Holman P.J. 2002.** *In vitro* generation of organophosphate resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cell lines. *Journal of Medical Entomology*. 39: 278-284.
- 13 **Crampton A. L., Baxter G.D. & Barker S.C. 1999.** Identification and characterisation of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemical and Molecular Biology*. 29: 377-384.
- 14 **Crampton A.L., Miller C., Baxter G.D. & Barker S.C. 1998.** Expressed sequenced tags and news genes from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*. 22: 177-186.
- 15 **Da Costa G.L., Sarquis M.I., De Moraes A.M. & Bittencourt V.R. 2002.** Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*. 154: 207-209.
- 16 **Da Silva Vaz Jr. I., Ozaki S.L. & Masuda A. 1994.** Serum of *Boophilus microplus* infested cattle reacts with different tick tissues. *Veterinary Parasitology*. 52: 71-78.
- 17 **Da Silva Vaz Jr. I., Martinez R.H.M., Oliveira A.T.D., Heck A., Logullo C., Gonzales J.C., Dewes H. & Masuda A. 1996.** Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Veterinary Parasitology*. 62: 155-160.
- 18 **Da Silva Vaz Jr. I., Logullo C.J., Sorgine M., Velloso F.F., Gonzales J.C., Masuda H., Oliveira P.L. & Masuda A. 1998.** Immunization of bovines with a new protein isolated from egg of *Boophilus microplus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 66: 331-341.
- 19 **Da Silva Vaz Jr. I., Torino Lermen T., Michelon A., Sanchez Ferreira C.A., Joaquim de Freitas D.R., Termignoni C. & Masuda A. 2004.** Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*. 119: 237-245.
- 20 **Davey R.B., George J.E. & Snyder D.E. 2001.** Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Veterinary Parasitology*. 99: 41-52.
- 21 **Dejersey J., Nolan J., Dave P.A. & Riccles P.W. 1985.** Separation and characterization of the pyrethroid-hydrolyzing esterases of cattle tick *Boophilus microplus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 23: 349-357.
- 22 **Denholm I., Devine G.J. & Williamson M.S. 2002.** Evolutionary genetics. Insecticide resistance on the move. *Science*. 297: 2222-2223.
- 23 **De Oliveira Vasconcelos V., Furlong J., de Freitas G.M., Dolinski C., Aguilera M.M., Rodrigues R.C. & 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.
- 24 **Drummond R.O., Ernst S.E., Trevino J.L., Gladney W.J. & Graham O.H. 1976.** Tests of acaricides for control of *Boophilus annulatus* and *B. microplus*. *Journal of Economic Entomology*. 69: 37-40.
- 25 **Enayati A.A., Ranson H. & Hemingway J. 2005.** Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*. 1: 3-8.
- 26 **Farias N.A.R., Gonzales J.C. & Saibro J.C. 1986.** Antibiose e antixenose entre forrageiras em larvas de carrapato do boi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 21: 1313-1320.
- 27 **Ferreira C.A., Barbosa M.C., Silveira T.C., Valenzuela J.G., Da Silva Vaz Jr. I. & Masuda A. 2002.** cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. *Parasitology*. 125: 265-274.

- 28 Ferreira C.A., Da Silva Vaz Jr. I., Da Silva S.S., Haag K.L., Valenzuela J.G. & Masuda A. 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Experimental Parasitology*. 101: 25-34.
- 29 Festucci-Buselli R.A., Carvalho-Dias A.S., De Oliveira-Andrade M., Caixeta-Nunes C., Li H.M., Stuart J.J., Muir W., Scharf M.E. & Pittendrigh B.R. 2005. Expression of Cyp6g1 and Cyp12d1 in DDT resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*. 1: 69-77.
- 30 Feyereisen R., Koener J.F., Farnsworth D.E. & Nebert D.W. 1989. Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P-450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 86: 1465-1469.
- 31 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.
- 32 Frazzon A.P., Da Silva Vaz Jr. I., Masuda A., Schrank A. & Vainstein M.H. 2000. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 94: 117-125.
- 33 Gonzales J.C. 1975. O controle do carrapato bovino. Porto Alegre: Sulina, 104p.
- 34 Guerrero F.D., Li A.Y. & Hernandez R. 2002. Molecular diagnosis of pyrethroid resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 39: 770-776.
- 35 Guglielmo A.A., Mangold A.J., Munoz Cobenas M.E., Scherling N., Garcia Posse F., Anziani O.S. & Ioppolo M. 2000. Moxidectin pour-on for control of natural populations of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 87: 237-241.
- 36 Häuserman W., Friedel T., Hess E.A. & Strong M.B. 1992. A new active ingredient for a new approach to protect cattle against ticks In: *Proceedings of XIX International Congress of Entomology* (Beijing, China). p.138.
- 37 He H., Chen A.C., Davey R.B., Ivie G.W. & George J.E. 1999. Characterization and molecular cloning of glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect and Biochemistry and Molecular Biology*. 29: 737-743.
- 38 Hemingway J., Field L. & Vontas J. 2002. An overview of insecticide resistance. *Science*. 298: 96-97
- 39 Hernandez R., Guerrero F.D., George J.E. & Wagner G.G. 2002. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 1009-1016.
- 40 Horn F., dos Santos P.C. & Termignoni C. 2000. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 384: 68-73.
- 41 Huang F., Subramanyam B. & Toews M.D. 2004. Susceptibility of laboratory and field strains of four stored-product insect species to spinosad. *Journal of Economic Entomology*. 6: 2154-2159.
- 42 Jaworski D.C., Simmen F.A., Lamoreaux W., Coons L.B., Muller M.T. & Needham G.R. 1995. A secreted calreticulin protein in ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *Journal Insect Physiology*. 41: 369-375.
- 43 Johnston L.A.Y., Kemp D.H. & Pearson R.D. 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. *International Journal for Parasitology*. 16: 27-34.
- 44 Jonsson N.N., Mayer D.G. & Green P.E. 2000. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Veterinary Parasitology*. 88: 79-92.
- 45 Jonsson N.N., Davis R. & De Witt M. 2001. An estimate of the economic effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on Queensland dairy farms. *Australian Veterinary Journal*. 79: 826-831.
- 46 Kaaya G. P., Mwangi E. N. & Ouna E. A. 1996. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 67: 15-20.
- 47 Kelly E.A.B. & Colley D.G. 1988. *In vivo* effects of monoclonal anti-I3t4 antibody on immune responsiveness of mice infected with *Schistosoma mansoni* - reduction of irradiated cercariae-induced resistance. *Journal of Immunology*. 140: 2737-2745.
- 48 Kemp D.H., Gale K.R., Nari A. & Sabatini G.A. 1998. Acaricide resistance in the cattle-ticks *Boophilus microplus* and *B. decoloratus*: review of resistance data; standartization of resistance tests and recommendations for the intergrated parasite control to delay resistance. Report to the animal health services, AGAH. Rome, FAO. 37 pp.

- 49 Kocan K.M. 1995. Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle. *Veterinary Parasitology*. 57: 121-151.
- 50 Lee A.J., Huntley J., Van den Broek A., Coates D. & Isaac R.E. 2002. Expression and characterisation of a *Psoroptes ovis* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*. 105: 49-63.
- 51 Li A.Y., Davey R.B., Miller R.J. & George J.E. 2003. Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. *Journal of Medical Entomology*. 4: 482-490.
- 52 Liu S. & Li Q.X. 2004. Photolysis of spinosyns in seawater, stream water and various aqueous solutions. *Chemosphere*. 11: 1121-1127.
- 53 Logullo C., Da Silva Vaz Jr. I., Sorgine M.H.F., Paiva-Silva G.O., Faria F.S., Zingali R., Rosa de Lima M., Abreu L., Oliveira E.F., Alves E.W., Masuda H., Gonzales J.C., Masuda A. & Oliveira P.L. 1998. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*. 116: 525-532.
- 54 Maroto M., Arredondo J.J., San Roman M., Marco R. & Cervera M. 1995. Analysis of the paramyosin/miniparamyosin gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 4375-4382.
- 55 Martin T., Ochou O.G., Vaissayre M. & Fournier D. 2003. Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hubner) to triazophos in West Africa. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 9: 883-887.
- 56 Martinez-Torres D., Chandre F., Williamson M.S., Darriet F., Bergé J.B., Devonshire A. L., Guillet P., Pasteur N. & Pauron D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*. 7: 189-184.
- 57 McCosker P.L. 1975. Control of piroplasmiasis and anaplasmosis in cattle. A practical manual. Rome, FAO. 64 pp.
- 58 Michalak M., Milner R.E., Burns K. & Opas M. 1992. Calreticulin. *Biochemical Journal*. 285: 681-692.
- 59 Miller R.J., Davey R.B. & George J.E. 2002. Modification of the food and agriculture organization larval packet test to measure amitraz-susceptibility against ixodidae. *Journal of Medical Entomology*. 39: 645-651.
- 60 Nolan J. 1985. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 18: 155-166.
- 61 Oakeshott J.G., Home I., Sutherland T.D. & Russell R.J. 2003. The genomics of insecticide resistance. *Genome Biology*. 4: 202.
- 62 O'Neill G.M., Donovan G.R. & Baldo B.A. 1994. Cloning and characterization of a major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, homologous with glutathione S-transferase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1219: 521-528.
- 63 Pineda S., Budia F., Schneider M. I., Gobbi A., Vinuela E., Valle J. & Del Estal P. 2004. Effects of two biorational insecticides, spinosad and methoxyfenozide, on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. *Journal of Economic Entomology*. 6: 1906-1911.
- 64 Pruet J.H. 1999. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. *International Journal for Parasitology*. 29: 25-32.
- 65 Ranson H., Claudianos C., Orтели F., Abgrall C., Hemingway J., Sharakhova M.V., Unger M.F., Collins F.H. & Feyereisen R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*. 298: 179-181.
- 66 Renard G., Garcia J.F., Cardoso F.C., Richter M.F., Sakanari J.A., Ozaki L.S., Termignoni C. & Masuda A. 2000. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30: 1017-1026.
- 67 Renard G., Lara F.A., Cardoso F.C., Miguens F.C., Dansa-Petretski M., Termignoni C. & Masuda A. 2002. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Molecular Biology*. 11: 325-358.
- 68 Riding G.A., Jarmey J., Makenna R.V., Pearson R., Cobon G.S. & Willadsen P. 1994. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *Journal of Immunology*. 153: 5158-5166.
- 69 Rosa de Lima M.F., Sanchez Ferreira C.A., Joaquim de Freitas D.R., Valenzuela J.G. & Masuda A. 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 747-754.
- 70 Rufingier C., Pasteur N., Lagnel J., Martin C. & Navajas M. 1999. Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Homoptera: Aphididae) from France. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 4: 385-391.

- 71 Sabatini G.A., Kemp D.H., Hughes S., Nari A. & Hansen J. 2001. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 95: 53-62.
- 72 Samish M. & Glazer I. 2001. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends in Parasitology*. 17: 368-371.
- 73 Sanders M.L., Glass G.E., Nadelman R.B., Wormser G.P., Scott A.L., Raha S., Ritchie B.C., Jaworski D.C. & Schwartz B.S. 1999. Antibody levels to recombinant tick calreticulin increase in humans after exposure to *Ixodes scapularis* (Say) and are correlated with tick engorgement indices. *American Journal of Epidemiology*. 149: 777-784.
- 74 Sanders M.L., Jaworski D.C., Sanchez J.L., DeFraitas R.F., Glass G.E., Scott A.L. Raha, S. Ritchie B.C., Needham G.R. & Schwartz. B.S. 1998. Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 59: 279-285.
- 75 Seixas A., Dos Santos P.C., Velloso F.F., Da Silva Vaz Jr., I., Masuda A., Horn F. & Termignoni C. 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*. 126: 155-163.
- 76 Sorgine M.H., Logullo C., Zingali R.B., Paiva-Silva G.O., Juliano L. & Oliveira P.L. 2000. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 28659-2865.
- 77 Sogorb M.A. & Vilanova E. 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*. 128: 215-228.
- 78 Sogorb M.A., Vilanova E., Quintanar J.L. & Viniegra S. 1996. Bovine chromaffin cells in culture show carboxylesterase activities sensitive to organophosphorus compounds. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 9: 983-989.
- 79 Sutherst R.W., Jones R.J. & Schnitzerling H.J. 1982. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. *Nature* 295: 320-321.
- 80 Sutherst R.W., Maywald G.F., Kerr J.D. & Siegeman D.A. 1983. The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research*. 34: 317-327.
- 81 Taylor M.A. 2001. Recent developments in ectoparasiticides. *The Veterinary Journal*. 161: 253-268.
- 82 Tellam R.L., Kemp D., Riding G., Briscoe S., Smith D., Sharp P., Irving D. & Willadsen P. 2002. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Veterinary Parasitology*. 103: 141-156.
- 83 Trimmell A.R., Hails R.S. & Nuttall P.A. 2002. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine*. 20: 3560-3568.
- 84 Vonta, J.G., Small G.J., Nikou D.C., Ranson H. & Hemingway J. 2002. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochemistry Journal*. 362: 329-337.
- 85 Wei S.H., Clark A.G. & Syvanen M. 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31: 1145-1153.
- 86 Willadsen P., Cobon G. & McKenna R.V. 1996. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunology*. 18: 241-246.
- 87 Young A.S. & Morzaria S.P. 1986. Biology of *Babesia*. *Parasitology Today*. 2: 211-219.
- 88 Zhang C. & Bennett G.N. 2005. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67: 600-618.
- 89 Zhioua E., Browning M., Johnson P.W., Ginsberg H.S. & Lebrun R.A. 1997. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal for Parasitology*. 83: 815-818.



Eradication of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* from a chicken flock by antimicrobial injections in eggs and chicks

Erradicação de *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* de um plantel de galinhas pela injeção de antimicrobianos em ovos e pintos

Elmiro Rosendo do Nascimento¹, Maria da Graça Fichel do Nascimento², Maria Wanda dos Santos³, Paulo Genaro de Oliveira Dias⁴, Osvaldo de Almeida Resende⁴ & Rita de Cássia Figueira Silva³

ABSTRACT

A chicken breeding flock of 3,464 hens, naturally infected with *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *M. synoviae* (MS), was subjected to a mycoplasma eradication scheme, based on antimicrobial treatment of eggs and their hatched day-old chicks. The egg injection sites utilized were the air cell and the small end (albumen), and the antibiotics used were tylosin at two different doses (3 mg or 5 mg per egg) and gentamicin (0.6 mg/egg). For the chicks treatment, a combination of spectinomycin and lincomycin, diluted in dextrose-vitamin complex solution, was employed. The differences in hatchability for the egg air cell-embryo (17.2%), egg small end (albumen)-3mg tylosin (72.4%) and egg small end (albumen)-5mg tylosin (42.1%) injection procedures were significantly different by Chi-square analysis ($p < 0.0001$). Injection of antimicrobials into the air cell resulted in the highest drop in hatchability, followed by tylosin dose of 5 mg plus 0.6 mg of gentamicin into the egg small end, compromising the further genetic use of their hatched chickens. The best performance on hatchability (72.4%) was obtained when preincubated eggs were injected into the albumen with a combination of 3 mg of tylosin plus 0.6 mg of gentamicin. The difference in hatchability from 75.0% to 70.0% obtained, respectively, between lines A and B was not statistically significant. The F1 progenies from the antibiotic treated eggs stayed free from MG and MS until they reached the age of 12 months, when they were eliminated and replaced by their respective F2 substitutes.

Key words: chicken, *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, egg and embryo treatment, antimicrobial injection.

RESUMO

Um plantel de galinhas reprodutoras com 3.464 fêmeas, infectadas naturalmente por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *M. synoviae* (MS), foi submetido a um processo de erradicação de micoplasma, com base no tratamento antimicrobiano de ovos e de seus respectivos pintos de um-dia de idade. Os sítios de injeção utilizados foram a câmara de ar e a ponta fina (albumina), sendo que os antimicrobianos usados foram tilosina em duas doses (3 mg ou 5 mg por ovo) e gentamicina (0,6mg/ovo). Para o tratamento dos pintos, uma combinação de espectinomicina e lincomicina, diluídos numa solução dextrose-complexo vitamínico, foi empregada. As diferenças em eclodibilidade para injeções na câmara de ar de cada ovo embrionado (17,2%), na ponta fina do ovo (albumina)-3mg tilosina (72,4%) e na ponta fina do ovo (albumina)-5mg tilosina (42,1%) foram significativamente diferentes pelo teste de Qui-quadrado ($p < 0.0001$). A injeção de antimicrobianos na câmara de ar resultou na mais elevada queda de eclosão, seguida pela dose de 5,0 mg de tilosina mais 0,6 mg de gentamicina na ponta fina do ovo, comprometendo utilizações genéticas futuras das galinhas nascidas desses ovos. O melhor desempenho em eclodibilidade (72,4%) foi obtido quando ovos pre-incubados foram injetados na ponta fina com uma combinação de 3,0 mg de tilosina mais 0,6 mg de gentamicina. A diferença em eclodibilidade de 75,0% para 70,0% obtida, respectivamente, entre as linhas A e B não foi estatisticamente significante. As progênes F1 dos ovos tratados com antimicrobianos permaneceram livres de MG e MS até a idade de 12 meses, quando foram eliminadas e substituídas por suas respectivas progênes F2.

Descritores: galinha, *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, egg and embryo treatment, antimicrobianos.

INTRODUCTION

Mycoplasma gallisepticum (MG), responsible for chronic respiratory disease (CRD), and *M. synoviae* (MS), that causes synovitis, are also the main cause of airsacculitis in poultry [6,13]. MG and MS infections can be transmitted horizontally (bird to bird), and vertically (through the egg), hence, affecting the breeding flocks [10]. The economic losses caused by mycoplasmosis are generally attributed to decreased laying performance, increased mortality and carcass condemnation rates, high medication cost, and synergistic effect associated with diseases or other factors [3,6]. Eradication of mycoplasma, based on its elimination into the egg, it is done without affecting the embryo development and subsequent hatchability of the mycoplasma-free progeny [3,5,6,9,14]. Informations on antimicrobial injection into the egg air cell, are found for chicken [10,11], but with respect to egg small end (albumen) it is found for turkey hatching eggs [1,5]. Published studies on injection of chicken eggs to eliminate mycoplasma are scarce, because this procedure is mostly conducted within the commercial poultry premises [14]. Tylosin is very efficient against mycoplasmas, while spectinomycin, lincomycin and gentamicin are broad-spectrum anti-microbials that work, preferably, against *Enterobacteriaceae* [8,9,15].

The objective of this study was to eradicate MG and MS from two chicken genetic stock lines, using procedures that included the injection of antibiotic into eggs, via small end and air cell, of MG and MS infected chicken, combined with antimicrobial treatment of day-old chicks, in order to provide an unbiased breeding selection, due to these mycoplasmas.

MATERIALS AND METHODS

Chicken flock informations

The chickens used were from a genetic stock of white-egg fowls (leghorn)¹. When the egg treatment began, there were 3,464 hens in the flock, which were being used for genetic improvement research, with age ranging from 45 to 53 weeks old (average of 48 weeks), and a laying production ranging from 37.0% to 48.0% (average of 42.0%). They were kept caged and artificially inseminated with semen from about 350 caged males. Out of these 3,462 hens, 1,929 constituted a sort of primary breeding flock (parent flock), which was divided into line "A" with

1,155 hens (father line) and line B with 774 (mother line). The others 1,535 hens were crosses between lines A and B, i.e., the multiplier breeding flock. These hens were housed in seven different groups, three of line A, two of line B, and two of A x B lines, of about 400 chickens, according to their exact ages. Prior to the beginning of this eradication scheme, all hens were tested for MG and MS infections by serum agglutination reaction (SAR) and hemagglutination inhibition (HI), as described [12]. Isolation of MG and MS in this flock was also accomplished [7,12], besides the history informations on the diagnosis of other disease [2].

Drugs and their doses used

For egg treatment, tylosin¹ and gentamicin sulfate² were diluted in 85.0% saline. A volume of 0.1 mL of saline solution with 3.0 mg or 5.0 mg of tylosin and 0.6 mg of gentamicin was inoculated per egg. Additionally, each day-old chick received a subcutaneous injection, containing 0.2 mL of a Linco-Spectin solution³ (5.0 mg of lincomycin and 10 mg of spectinomycin); 0.05 mL of 5.0% dextrose solution, and 0.05 mL of vitamin complex⁴.

Injection procedures

The eggs in trays were carefully inspected and dry-cleaned, whenever any dirt was seen on them. They were put air cell up or down, according to the chosen site of inoculation. The injection area of each egg, i.e., air cell or small end, were disinfected with iodine-alcohol solution applied gently with the help of a swab. Following disinfection, egg shell holes were made with a portable electric dentist drill⁵, attempting not to damage the shell membrane. The drills used were very small, and that made possible the absence of holes of 0.5-0.8 mm in diameter. An automatic syringe⁶ of 1.0 mL with needle of 4 mm x 5 gauges in size was used to deliver the antimicrobial solution into the drilled eggs. Between injections, the needle was scoured in iodine-alcohol soaked gauze, being the gauze exchanged whenever drying was taking place. Albumen expressed during injection was wiped from the injection site with the help of gauze soaked in alcohol. After injection, the eggs holes were sealed with melted paraffin wax.

The automatic syringe as described above with needle of 5 mm x 10 gauges in size was used to inject a solution of antimicrobial and dextrose-vitamin, sub-

cutaneously, in the dorsal region of the neck of each day-old chick.

Egg handling and treatment procedures

Eggs for each incubation/treatment batch were collected daily during a two-weeks interval. After each collection/day, the eggs were stored in a room with controlled temperature and humidity, where they received fumigation desinfection (formaldehyde gas) once or twice. Thereafter, the eggs were sent to the hatchery, located on the same premise, when they were fumigated again.

Eggs were treated and incubated in seven different batches, spaced about one week apart from each other. The numbers of eggs treated, the number of batches per line, the egg injection sites, and the combined doses of each antimicrobial used are presented under results (Table 1). The incubator and hatchery were cleaned thoroughly and disinfected before receiving the treated eggs. All eggs were fumigated at the entrance of the incubation room, after anti-microbial treatment, and when transferred to the hatchery. Incubated eggs in trays were removed from the incubation place, treated with antimicrobials, fumigated and immediately returned to their previous location. Eggs subjected to preincubation treatment, i.e., the albumen injected ones, were incubated about two hours after finishing the injection procedure. The

eggs were subjected to candling prior to incubation, and every four days from 4-17 post-incubation days, for the elimination of un-fertile eggs and/or dead embryos.

Management of the FI Progenies

Not all hatched chicks were used for subsequent breeding purpose. All saved chicks were subjected to sexing and most of the males were culled. The selected chicks were put in a chicken house located about 1,000 meters away from their mother hens, where they stayed until about 100 days, being, then, caged. By this time, their parents had already been culled, slaughtered and marketed a month before. The FI progenies were placed in houses and cages that had been cleaned, disinfected, and emptied for at least a month before use. Biosecurity measures, which included control of personnel, ration, vehicles, fomites, etc. were adopted.

Monitoring scheme

All pipped embryos from treated eggs were bled, sacrificed, necropsied and inspected for air sac lesions. All embryos with lesions, and only five without, from each incubation batch were subjected to culturing for mycoplasma isolation [7,12]. The sera obtained from the pipped embryos were pooled in groups of five and subjected to SAR and HI for MG and MS. SAR was

Table 1. Egg Parameters by Injection site and Treatment Procedure (0.6 mg of gentamicin plus tylosin at 3mg or 5mg).

Egg parameters	Egg treatment procedure			Total eggs used
	Air cell ¹ Tylosin 3mg	Albumen ² Tylosin 3mg	Albumen ³ Tylosin 5mg	
Layed	789	6,792	8,004	15,585
Fertiles	517	6,127	7,576	14,220
Hatched	89	4,436	3,194	7,719
Fertility	65.5%	90.2%	94.6%	91.2%
Pipped, # and (%) ⁴	7 (8.0%)	127 (2.9%)	180 (5.6%)	314 (4.0%)
Hatchability ⁵	17.2%	72.4%	42.1%	54.3%

1. One incubation with embryos, treated on the 8th incubation day, from line A hens.

2. Two incubations for line A eggs and two others for line B.

3. Two incubations with eggs from lines A x B hens.

4. Chi-square analysis, not significant (p=0.132)

5. Chi-square analysis, (P<0.0001).

performed with commercial antigens for MG⁷ and MS⁷ and the HI was conducted with laboratory made antigen⁹, with four hemagglutinating units, according to standard procedures [6,12].

The F1 progenies were monitored for MG and MS infections by serology (SAR and HI) and culturing. Culturing was performed on specimens from birds that appeared dead, sick, and from those apparently healthy, by the tracheal swab procedure [12]. Serology was performed when the chickens (100% of them) were aging 2-3 months, 5-6 months and 11-12 months (replacement time).

Statistical analysis

Chi Square test for heterogeneity with confidence interval of 95% [4] was used to compare the proportions of hatched, pipped and unhatched eggs from the three treatment groups under trial, as well as to investigate the genetic effect on hatchability, using eggs injected in the small end, and under the same antimicrobial dose (3 mg of tylosin plus 0.6 mg of gentamicin), from lines A and B.

RESULTS

Of the 3,464 hens tested prior to the beginning of the egg treatment, 3,118 (90.0%) and 2,078 (60.0%) were, respectively, positive for MG and MS by SAR and HI. These and other untyped mycoplas-

monellosis. Non-bacterial diseases had also been diagnosed as coccidiosis, aspergillosis, Marek's disease, Lymphoid leukosis, Newcastle disease, and Infectious Bursal Disease.

A total of 15,584 eggs with fertility rates ranging from 65.5% to 94.6% were subjected to antimicrobial treatment, and data pertaining to fertility, and hatching performance per treatment scheme (injection site and dose of tylosin) is being presented (Table 1). The hatchability for the air cell treated embryos (8-days of incubation) was drastically smaller (χ^2 analyzes, $p < 0.0001$) than that obtained for the small end, i.e., albumen site of preincubated eggs (Table 1). Increasing the tylosin dose from 3 mg to 5 mg reduced the hatchability from 72.4% to 42.1%, difference also statistically significant ($p < 0.0001$) by χ^2 analyzes (Table 1). The treatment scheme used, had no effect on pipped embryo frequency (Table 1).

The effect of the antimicrobial treatment, by the albumen route, on chickens from the lines A and B was investigated by χ^2 analyzes, but there was no statistical differences (table 2), although the hatchabilities obtained was 75.0% for line A, and 70.0% for line B (Table 2).

DISCUSSION

The antimicrobial egg treatment scheme described herein, which included the treatment of day-old chicks and biosecurity measures, was sufficient for the obtention of MG and MS-free chickens with only one application.

Tylosin was used because of its proven efficiency against mycoplasmas [8,15] and gen-

tamicin was used because of its broad-spectrum activity against bacteria and its low toxicity to host cells [15]. The use of gentamicin was justified also by the information on bacterial diseases, including non-pullorum salmonellosis, diagnosed in this genetic flock in previous years. Tylosin can be toxic for eggs when used in high doses as evidenced by the drop in hatchability, observed when the dose of this antibiotic was increased from 3 mg to 5 mg/egg.

The positive reactions obtained for sera from pipped embryos on the HI test can be explained by the

Table 2. Effect of egg treatment (3.0 mg of tylosin plus 0.6 mg of gentamicin) on two chicken lines¹

Line Incubated	Egg parameters, number and (%)				
	Fertiles	Hatched	Pipped	Fertility	Hatchability ²
A	3,457	2,998	2,247	66 (87.0)	(75.0)
B	3,515	3,129	2,189	61 (89.0)	(70.0)

1. Eggs injected into albumen.

2. Chi-square analysis, not significant ($p=0.429$).

mas had been isolated from necropsied birds from this flock several times in the past, prior to this eradication trial. The diagnosis of Chronic Respiratory Disease (CRD) and/or Airsacculitis with and without the possible involvement of *Escherichia coli* was also obtained in necropsied chickens, culled prior to this antimicrobial treatment trial.

As to the records of other diseases that were diagnosed in previous years, informations were available on other bacterial diseases, such as Infectious Coryza (*Haemophilus parallinarum*) and non-pullorum sal-

presence of maternal antibodies transmitted from hens to their eggs. The use of uninoculated eggs to serve as a control group was not employed due to the risk of compromising the eradication scheme adopted. The variation in fertility rates observed on different incubation batches of eggs may be explained by the way these hens were fertilized, i.e., by artificial insemination.

The better hatchability results obtained for eggs treated in the small end (albumen) over the air cell route has also been observed in the case of turkey eggs [5]. Because of the drastic mortality of embryos treated by the air cell route, this procedure was discontinued and the chicks hatched were not saved for breeding purposes. Besides, chicks hatched from eggs treated with 5 mg of tylosin, due also to high mortality, were not saved for breeding purposes, due to the fear of losing genetic variability, hence, compromising future crossings.

The antimicrobial treatment of eggs alone should not be judged responsible for the success of this eradication scheme, as day-old chick antibiotic treatment, biosecurity, and flock monitoring were also adopted. With the eradication of MG and MS, the genetic selection and breeding improvement can be carried out in this chicken genetic stock without the nega-

tive effects caused by the presence of MG and MS infections.

CONCLUSION

Antimicrobial treatment of preincubated eggs at the small end (albumen), in conjunction with treatment day-old chicks hatched from treated eggs, was sufficient to eliminate MG and MS from a genetic chicken stock flock with only one application.

SOURCES AND MANUFACTURERS

- ¹Experimental Station of Rio de Janeiro State Research Agricultural Organization-PESAGRO/RIO, Itaguaí, RJ, Brazil.
- ²Tylosin – “Tylan Soluvel, Elanco Química LTDA/Eli Lilly do Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil”.
- ³Gentamicin Sulfate – Gentocin, “Indústria Química e Farmacêutica Schering S/A, Rio de Janeiro, RJ, Brasil”.
- ⁴Linco-Spectin solution – TUCO, “Divisão de Upjohn Produtos Farmacêuticos LTDA, São Paulo, SP, Brasil”.
- ⁵Vitamin Complex – “Poli Vitaminico SM-Forte, Laboratório Santa Marina”, Brasil”.
- ⁶Electric dentist drill – Dentalwerk Burmoos, GES. M.B.H., Salzburg, Austria.
- ⁷Automatic syringe – FHK PISTOR 1-FJ-96, Fujihira Industry Co. Inc., Japan.
- ⁸Commercial antigens for MG and MS – BIOVET S/A, Vargem Grande Paulista, SP, Brazil.
- ⁹Projeto Saúde Animal (PSA)/Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, Brazil.

REFERENCES

- 1 **Ghazikhanian G., Yamamoto R., McCapes H., Dungan W.M. & Ortmayer H.B. 1980.** Combination dip and injection of turkey eggs with antibiotic to eliminate *Mycoplasma meleagridis* infection from a primary breeding stock. *Avian Diseases*. 24: 57-70.
- 2 **Hitchner S.B., Domermuth C.H., Purchase C.G. & Williams J.E. 1980.** *Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 2nd edn. New York: Creative Printing Company Inc. Endwell, 155p.
- 3 **Lay D.H. & Yoder Jr. H.W. 1997.** *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Calnek B.W., Barnes H., Beard C.W., McDougald L.R. & Saif Y.M. (Eds). *Diseases of Poultry*. Ames: Iowa State University Press, pp.194-207.
- 4 **Martin S. W., Meek A. H. & Willeberg P. 1994.** *Veterinary Epidemiology: Principles and Methods*. Ames: Iowa State University Press, pp.121-148..
- 5 **McCapes R.H., Yamamoto R., Ghazikhanian G., Dungan W.M. & Ortmayer H.B. 1977.** Antibiotic egg injection to eliminate disease. I. Effect of injection methods on turkey hatchability and *Mycoplasma meleagridis* infection. *Avian Diseases*. 19: 57-68.
- 6 **Nascimento E.R. 2000.** Mycoplasmoses. In: Macari M. & Berchieri Jr. A. (Eds). *Doenças das Aves*. Campinas: FACTA, pp. 217-240.
- 7 **Nascimento M.G.F. & Nascimento E. R. 1986.** Infectious sinusitis in coturnix quails in Brazil. *Avian Diseases*. 30: 228-230.
- 8 **Prescott J.F. 1990.** Antimicrobial Chemotherapy. In: Biberstein E.L. & Zee Y.C. *Review of Veterinary Microbiology*. Chicago: Blackwell Scientific Publications, pp.56-90.
- 9 **Stipkovits L. & Kempf I. 1996.** Mycoplasmoses in poultry. *Revue Scientifique et Technique de l' Office Internationale des Épizooties*. 15: 1495-1525.
- 10 **Truscott R.B. & Fergusson A.E. 1975.** Studies on the control of *Mycoplasma gallisepticum* in hatching eggs. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 39: 235-239.

- 11 **Tudor D.C. & Woodward H. 1968.** A mass method for chicken embryo inoculation with tylosin. *Avian Diseases*. 12: 379-382.
- 12 **USA. 1997.** United States Department of Agriculture. *National Poultry and Improvement Plan and Auxiliary Provisions*. Washington, DC: USDA, 98p.
- 13 **Yoder Jr. H.W. 1991.** Avian mycoplasmosis. In: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., Reid W. M. & Yoder Jr. H.W. (Eds). *Diseases of Poultry*. 9th edn. Ames: Iowa State University Press, pp.197-198.
- 14 **Yoder Jr. H.W. 1991.** *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., Reid W.M., & Yoder Jr. H.W. (Eds). *Diseases of Poultry*. 9th edn. Ames: Iowa State University Press, pp.198-212.
- 15 **Youmans G.R., Patterson P.Y. & Sommers H.M. 1985.** *The biological and clinical basis of infectious diseases*. 3rd edn. Philadelphia: Saunders Co, pp.814-815.

ANEXO 4

Artigo publicado na Revista *Brahman Repórter*, v. 16, p. 32-36, 01 nov. 2005.

Estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra carrapato

Daniela Reis Joaquim de Freitas e Itabajara da Silva Vaz Jr

Estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra carrapato

Daniela Reis Joaquim de Freitas (1) e Itabajara da Silva Vaz Junior (1, 2)

1) Estudante de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS, Porto Alegre. Bolsista CNPq.

2) Professor da Faculdade de Veterinária e pesquisador do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre.

Autor para correspondência

Itabajara da Silva Vaz Junior

Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul UFRGS

CP. 15005

91501-970, Porto Alegre, RS

e-mail: ita@cbiot.ufrgs.br

Devido à alta qualificação dos produtores, à tecnologia e aos investimentos realizados nas últimas décadas, o setor pecuário brasileiro mantém uma produtividade que lhe garante destaque na balança comercial brasileira, apesar das barreiras comerciais e sanitárias de outros países. Entretanto, o parasitismo do carrapato *Boophilus microplus* acarreta diversos danos econômicos, tornando-se o principal alvo de programas de controle.

O *B. microplus* é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, cujo principal hospedeiro é o bovino, e encontra-se amplamente distribuído nos grandes rebanhos bovinos da América, África, Ásia e Oceania. Ele causa grandes perdas na produção de leite e carne e danos no couro devido às reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato, e por atuar como vetor de doenças, como a tristeza parasitária bovina, causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela rickétsia do gênero *Anaplasma*. Além disso, existem diversos prejuízos relacionados à mão-de-obra necessária para o controle desse parasita, despesas com instalações, compra de equipamentos adequados para aplicação de carrapaticida nos rebanhos e aquisição de carrapaticidas.

O método de controle para o carrapato que mais tem sido utilizado desde a década de 50 é o uso de acaricidas. Apesar de ser, atualmente, o único método eficaz é um método dispendioso, além de poder causar danos ao meio ambiente e à saúde pública, através da contaminação de rios e solos. Ao longo destas décadas, foram utilizados, seqüencialmente, acaricidas baseados em compostos arsenicais, organoclorados,

37 organofosforados, carbamato, formamidas e piretróides. A troca dos princípios ativos
38 tem sido uma necessidade devido ao surgimento de populações resistentes. Os três mais
39 recentes grupos químicos contra o carrapato que se encontram disponíveis no mercado
40 são: as formamidas, os piretróides e as avermectinas. Diversos autores têm
41 demonstrado a crescente resistência apresentada por carrapatos a compostos químicos
42 presentes nos carrapaticidas. O *B. microplus* pode apresentar resistência mais
43 rapidamente que outros carrapatos, presumivelmente, pelo menor período de tempo entre
44 as gerações, o que demonstra a necessidade de desenvolver novas formas de controle
45 desta espécie.

46 Atualmente, os controles biológico e imunológico já constituem parte de programas
47 de controle integrado de ectoparasitas, que ainda exigem a utilização de produtos
48 químicos para maior estabilidade operacional. Os principais métodos em estudo para um
49 controle biológico baseiam-se na utilização de raças menos sensíveis ao carrapato,
50 pastagens que dificultam a sobrevivência dos carrapatos e parasitas capazes de infectá-los
51 (bactérias, fungos e nematóides).

52 Vacinas

53 O controle de parasitas através do uso de vacinas tem sido pesquisado nas últimas
54 cinco décadas e torna-se cada vez mais importante como alternativa ao uso de pesticidas,
55 que são tóxicos para o homem e perigosos para o ambiente. Aliado a isso, o rápido
56 desenvolvimento da biotecnologia tem facilitado o desenvolvimento de novas vacinas. É
57 importante ressaltar que para o desenvolvimento de uma vacina é necessário, além da
58 identificação de proteínas capazes de induzir uma resposta imune protetora, o
59 conhecimento dos mecanismos de resposta imunológica do animal.

60 Após infestações naturais com carrapato, os bovinos desenvolvem linfócitos T e B
61 de memória (memória imunológica), que permitem uma resposta mais eficiente em
62 futuras infestações. A importância dos linfócitos T na indução e manutenção de uma
63 resposta eficaz foi bem definida, apesar de não estar totalmente esclarecida a importância
64 de cada tipo de resposta (celular ou humoral) para a proteção contra o carrapato.

65 A teoria dos "antígenos ocultos", aqueles não expostos em uma infestação natural, e
66 o achado de uma proteína (Bm86) com essa característica significaram um grande avanço
67 no desenvolvimento de vacinas contra *B. microplus*. A Bm86, uma proteína de intestino,
68 induz resposta imunológica em bovinos imunizados e serve de base para duas vacinas
69 comerciais lançadas no mercado: a vacina TickGard, desenvolvida na Austrália pela
70 Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO; e a vacina Gavac, desenvolvida no
71 Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba. Os antígenos das duas vacinas
72 são produzidos em microorganismos, porém, a proteína da TickGard é obtida em

73 *Escherichia. coli* (bactéria) e a da Gavac em *Pichia pastoris* (levedura). Embora os
74 “antígenos ocultos” sejam a base das vacinas comerciais e tenham sido estudados em
75 outros ectoparasitas, como *Lucilia cuprina* (mosca varejeira) e *Pediculus humanus*
76 (piolho da cabeça), experimentos com antígenos naturalmente expostos ao sistema
77 imunológico do hospedeiro associado a antígenos ocultos, demonstram o potencial da
78 associação de diferentes alvos em uma mesma vacina.

79 A identificação de novas moléculas e suas funções bioquímicas representa um
80 campo fértil para o conhecimento dos mecanismos de interação parasita-hospedeiro e
81 para obtenção de novos antígenos com potencial protetor. O nosso grupo purificou e
82 caracterizou uma glicolipoproteína (BYC -*Boophilus* Yolk Catepsina) purificada de ovos
83 de *B. microplus*, onde parece atuar sobre a degradação da vitelina, a principal proteína de
84 reserva dos ovos do carrapato. A BYC é sintetizada no corpo gorduroso, secretada para a
85 hemolinfa e captada pelo ovo em crescimento e representa entre 5-8 % das proteínas do
86 ovo, sendo ativada por proteólise limitada durante a embriogênese. Bovinos imunizados
87 com BYC produziram imunoglobulinas que apareceram circulantes na hemolinfa de
88 carrapatos que parasitaram estes animais. Os anticorpos circulantes na hemolinfa
89 mantiveram sua atividade biológica, medida pela capacidade de ligação ao antígeno
90 correspondente, o que indicou que os anticorpos bovinos podem atravessar o epitélio
91 intestinal, e possivelmente reagir com antígenos localizados nos tecidos internos do
92 carrapato. Quando bovinos imunizados com BYC foram desafiados com larvas
93 infestantes de carrapato houve redução no número de teleóginas, capacidade de postura e
94 na fertilidade dos ovos, com eficácia variando entre 14% e 36%. Os níveis de anticorpos
95 declinaram gradualmente após a infestação e responderam positivamente a uma nova
96 vacinação, aplicada 11 meses após a infestação, indicando a existência de memória
97 imunológica para esse antígeno.

98 Visando melhorar os resultados obtidos com a proteína Bm86, o grupo do
99 pesquisador Joaquim H. Patarroyo desenvolveu, a partir de análise computacional, três
100 peptídeos sintéticos derivados da Bm86. Os resultados da infestação experimental
101 demonstraram uma eficácia entre 72.4% e 35.87% nos bovinos imunizados.

102 A produção de anticorpos monoclonais tem sido uma valiosa ferramenta na
103 caracterização de antígenos envolvidos na resposta protetora contra parasitas. Além de
104 auxiliar no estudo da fisiologia do carrapato, a identificação e caracterização de
105 proteínas-alvo de anticorpos monoclonais auxiliam a identificação e avaliação do
106 potencial vacinal de novos antígenos. Um anticorpo monoclonal (denominado BrBm2),
107 produzido pelo nosso grupo de pesquisa a partir de extrato de intestino de *B. microplus*,

108 reduziu em até 70% a capacidade de ovoposição e aumentou a mortalidade de teleóginas
109 inoculadas com o referido anticorpo.

110 Além dos antígenos já avaliados imunologicamente, descritos anteriormente, várias
111 moléculas envolvidas na fisiologia do carrapato e sua interação com o hospedeiro têm
112 sido descritas por diversos grupos de pesquisa. Os estudos realizados até o momento
113 justificam a confiança sobre a viabilidade do desenvolvimento de uma vacina e/ou de
114 controle biológico. Até o momento em que os controles imunológico e biológico sejam
115 uma realidade totalmente prática, é importante o estudo dos mecanismos que permitem
116 aos carrapatos desenvolverem resistência aos produtos químicos. Desta maneira
117 poderemos compreender as bases moleculares da resistência, criar métodos e orientar
118 práticas de manejo que permitam prolongar a vida útil dos princípios ativos em uso, além
119 de desenvolver drogas menos susceptíveis ao desenvolvimento de resistência pelos
120 carrapatos.

121 A base molecular da resistência tem sido estudada em diferentes espécies de
122 artrópodes, principalmente em insetos. Mecanismos de resistência, como redução da
123 penetração do inseticida, aumento do poder seqüestrante de compostos tóxicos e aumento
124 da detoxificação tornam os inseticidas menos efetivos, fazendo com que seja necessário o
125 aumento de dosificação. Três famílias de proteínas são as principais responsáveis pelo
126 metabolismo de inseticidas: os citocromos P450, as carboxilesterases (COEs) e as
127 glutathione S-transferases (GSTs).

128 Em *B. microplus* foram realizados poucos estudos sobre a caracterização dos genes
129 responsáveis pela resistência a diferentes princípios químicos, entretanto existe a
130 correlação de enzimas da família das esterases com a resistência a piretróides e diversos
131 trabalhos mostram a resistência de populações *B. microplus* a diferentes pesticidas. A
132 maior parte das populações de *B. microplus* no mundo são resistentes a organofosforados
133 e piretróides. Já foi identificada resistência a amitraz, um acaricida do grupo das
134 formamidinas que age sobre receptores de octopamina, resultando em hiperexcitação
135 neuronal e morte, em diversas populações de carrapato. Novos acaricidas estão sendo
136 testados no mercado, entre eles as lactonas macrocíclicas, que agem como bloqueadores
137 da estimulação neural por se ligarem ao neurotransmissor GABA e os inibidores de
138 desenvolvimento de carrapato flurazuron e fipronil.

139 Atualmente, a determinação da resistência em carrapatos é feita por testes
140 biológicos em campo ou em laboratório. Os testes baseiam-se na utilização do
141 carrapaticida em diferentes concentrações e a observação da eficiência do princípio ativo
142 em diminuir a população de carrapatos. A identificação e caracterização dos genes de *B.*
143 *microplus* que estão envolvidos na resistência a carrapaticidas, através da determinação

144 do seu papel sobre a resistência e o estabelecimento de métodos que possam detectar sua
145 presença em amostras de campo poderão fornecer uma importante ferramenta para o
146 monitoramento da presença de resistência ao princípio ativo em populações de carrapatos
147 no campo.

148 Concluindo, diversos problemas levam à procura de métodos biológicos e
149 imunológicos como formas alternativas de controle do carrapato, entretanto estes
150 métodos ainda não satisfazem completamente as necessidades da pecuária, por isto uma
151 alternativa a curto prazo é o uso mais racional dos acaricidas disponíveis hoje no mercado.
152 Além disso, uma melhor compreensão da biologia do carrapato é essencial para o
153 desenvolvimento tanto de novas drogas químicas como de vacinas e produtos biológicos.

154

155 Agradecimentos:

156 Este trabalho recebeu apoio financeiro de PADCT, PRONEX, FAPERGS e CNPq.

157 Ciclo Biológico do *B. microplus*

158

159 O *Boophilus microplus* é uma espécie com um único hospedeiro no seu ciclo e
 160 normalmente parasita bovinos, sendo raramente encontrado em outros animais. No ciclo
 161 biológico do *B. microplus* a fêmea ingurgitada (repleta de sangue) se desprende do
 162 hospedeiro e procura um esconderijo nas pastagens, onde põe de 2.500 a 3.000 ovos. Ao
 163 terminar a postura, a fêmea morre. Os ovos são pequenos, esféricos e de coloração
 164 castanha. Os ovos eclodem e dão origem as larvas, que sobem pelas gramíneas e arbustos
 165 e esperam a passagem dos hospedeiros para iniciar a fase parasitária. Após fixar se e
 166 alimentar se nos hospedeiros, durante alguns dias, a larva sofre muda da cutícula e se
 167 transforma em ninfa, que por sua vez, se ingurgita, sofre ecdise (muda da cutícula) e se
 168 transforma em macho ou fêmea. Após a cópula, e a fêmea se ingurgita e se desprende do
 169 hospedeiro. No solo, após um período de descanso inicia a postura. Os machos
 170 permanecem mais tempo no hospedeiro. A duração da fase parasitária no bovino é de
 171 aproximadamente 21 dias, com um grande aumento da massa corpórea nas ultimas 24
 172 horas do ingurgitamento.

173 No Brasil, altas temperaturas e alta umidade relativa do ar durante o verão e
 174 primavera estão associadas com a diminuição da fase não parasitária. Deste modo, altos
 175 índices de produção de ovos e eclosão e conseqüentemente uma maior abundância de
 176 larvas são observados nesse período. No outono e inverno, o prolongamento da fase não
 177 parasitária e a diminuição da eficiência reprodutiva e taxas de eclosão contribuem para
 178 uma menor presença de larvas. Entretanto, neste momento, baixas temperaturas são
 179 associadas com um acréscimo na sobrevivência das larvas, resultando em uma
 180 manutenção da larva nos campos, apesar em menor número. Como resultado, podemos
 181 detectar 3 a 4 gerações anuais de carrapato no Brasil.

182

183 Tabela 1. **Principais eventos no estudo para uma vacina contra carrapato.**

184

<i>Ano/ Pesquisador</i>	<i>Descoberta</i>
1918 Johnston <i>et al</i>	Observação de resistência em carrapatos de campo
1939 Trager	Cobaias resistentes à <i>Dermacenter variabilis</i>
1962 Riek	Determinação da resposta cutânea alérgica
1976 Roberts & Kerr	Transferência passiva de anticorpos
1976 Brossard	Imunização com antígenos de glândula salivar
1982 Wikel	Caracterização da imunidade mediada por células
1988 Willadsen <i>et al</i>	Purificação da Bm86
1994 Riding <i>et al.</i>	Purificação e clonagem da Bm91
1994/1995	Testes de campo com Bm86 (vacina comercial)
1996 Willadsen <i>et al.</i>	Imunização com Bm86-Bm91

1998 Willadsen <i>et al.</i>	Purificação e imunização com BMA7
1998 Logullo <i>et al.</i>	Purificação da BYC
1998 Da Silva Vaz <i>et al.</i>	Imunização com BYC
1999 De Rose <i>et al.</i>	Vacina de DNA (gene da Bm86)
2000 García-García <i>et al.</i>	Imunização com Bm95
2002 Andreotti <i>et al.</i>	Imunização com inibidores de proteinases
2002 Patarroyo <i>et al.</i>	Imunização com peptídeos sintéticos de Bm86
2005 Guerrero <i>et al.</i>	Planejamento de um Projeto Genoma do <i>B. microplus</i>

185

186

187 Figura 1: Regiões (em verde) de ocorrência do carrapato *Boophilus microplus*.188 Figura 2: Ovos e fêmeas do carrapato *Boophilus microplus*.189 Figura 3: Macho (E) e fêmea (D) do carrapato *Boophilus microplus*.190 Figura 4: Fêmea do carrapato *Boophilus microplus*.

191